

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Monika Křížová

**Cirkadiánní změny cholinergního systému v různých oblastech centrální
nervové soustavy**

**Circadian changes of the cholinergic system in various areas of the central
nervous system**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.

Praha, 2022

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. srpna 2022

Podpis:

Poděkování:

Mé největší poděkování patří panu profesorovi MUDr. Jaromírovi Myslivečkovi, Ph.D. za jeho drahocenný čas, velkou ochotu a cenné rady, které mi po celou dobu studia věnoval. Dále bych chtěla poděkovat paní inženýrce Kateřině Janišové za její nekonečnou trpělivost při učení laboratorní práce a vlídný osobní přístup. Děkuji také mé rodině a nejbližším za neuvěřitelnou podporu a laskavá slova, která mi věnovali.

Abstrakt

Muskarinové acetylcholinové receptory typu 4 jsou jedním z pěti podtypů metabotropních muskarinových receptorů, jejichž vyřazení u myších samic vedlo k narušení biorytmu reprezentovaného lokomocí. V této diplomové práci jsme se pokusili určit biorytmickou aktivitu vybraných komponent cholinergního systému ve strukturách centrální nervové soustavy, jež se pravděpodobně účastní regulace cirkadiánní lokomoční aktivity. Těmito zvolenými strukturami byla oblast striata, motorický kortex, thalamus, intergenikulární lístek, subparaventrikulární zóna a posteriorní hypotalamická oblast. Na samicích myši běžného typu a samicích myši s vyřazenými M₄ receptory jsme za pomoci autoradiografie sledovali změny denzity muskarinových receptorů v průběhu dne. V oblasti striata, motorického kortexu a thalamu byla také autoradiografií měřena denzita muskarinových receptorů typu 1 a za využití Ellmanovy metody i aktivita acetyl- a butyrylcholinesteráz. Ve všech námi vybraných strukturách byly zaznamenány rytmické oscilace denzity muskarinových receptorů u obou typů myši. Jako hlavní mozková struktura zodpovědná za rozdílnosti v biologickém rytmu myši běžného typu a myši bez M₄ receptorů byla určena oblast striata a motorického kortexu, kde bylo procentuální zastoupení M₄ receptorů nejvyšší. Denní oscilace rovněž vykazovaly i muskarinové receptory typu 1 a cholinesterázy, ovšem bez větších významných rozdílů mezi myšmi obou typů. Tyto výsledky by mohly být přínosné pro lepší pochopení vztahu mezi M₄ receptory a cirkadiánními rytmy.

Klíčová slova: M₄ muskarinové receptory, cholinergní systém, cirkadiánní rytmy, centrální nervová soustava, lokomoční aktivita

Abstract

Muscarinic acetylcholine receptors type 4 are one of the five subtypes of metabotropic muscarinic receptors whose knockout led to disruption of the biorhythm represented by locomotion in female mice. In this thesis, we attempted to determine the biorhythmic activity of selected components of the cholinergic system in structures of the central nervous system which are suspected to regulate circadian locomotion. These selected structures were the striatum, motor cortex, thalamus, intergeniculate leaflet, subparaventricular zone and posterior hypothalamic area. Changes of muscarinic receptor density in wild type and M₄ receptor knockout female mice were measured by using autoradiography throughout the day. In the striatum, motor cortex, and thalamus, the density of muscarinic receptors type 1 and the activity of acetyl- and butyrylcholinesterases were also measured by autoradiography and the Ellman's method. Rhythmic oscillations of muscarinic receptor density were observed in all structures selected in both types of mice. The main brain structure responsible for the differences in the biological rhythm of wild type and M₄ receptor knockout mice was identified as the striatum and motor cortex region, where the percentage of M₄ receptors was highest. Diurnal oscillations were also exhibited by muscarinic type 1 receptors and cholinesterases, but without any major significant differences between mice of either type. These results could be beneficial for a better understanding of the relationship between M₄ receptors and circadian rhythms.

Key words: M₄ muscarinic receptors, cholinergic system, circadian rhythm, central nervous system, locomotor activity

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
1 ÚVOD	3
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
2.1 Cirkadiánní systém	4
2.1.1 Molekulární mechanismus	4
2.1.2 Suprachiasmatická jádra	6
2.1.3 Biorytmus a lokomoce	7
2.2 Cholinergní systém v CNS	9
2.2.1 Cholinesterázy	11
2.2.2 Muskarinové receptory	13
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	19
4 MATERIÁL A METODY	20
4.1 Experimentální zvířata	20
4.2 Metody	21
4.2.1 Muskarinové receptory	21
4.2.2 Cholinesterázy	23
5 VÝSLEDKY	26
5.1 Muskarinové receptory	26
5.1.1 Striatum	26
5.1.2 Motorický kortex	28
5.1.3 Thalamus	30
5.1.4 Intergenikulární lístek	32
5.1.5 Subparaventriculární zóna	34
5.1.6 Posteriošní hypotalamická oblast	36
5.2 Muskarinové receptory typu 1	39

5.2.1	Striatum	39
5.2.2	Motorický kortex.....	41
5.3	Acetylcholinesterázy	44
5.3.1	Striatum	44
5.3.2	Motorický kortex.....	46
5.3.3	Thalamus	48
5.4	Butyrylcholinesterázy	51
5.4.1	Striatum	51
5.4.2	Motorický kortex.....	53
5.4.3	Thalamus	55
6	DISKUZE.....	58
6.1	Muskarinové receptory	58
6.2	Muskarinové receptory typu 1	61
6.3	Cholinesterázy	62
7	ZÁVĚR.....	63
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylátcykláza (<u>a</u> denylyl <u>c</u> yclase)
ADHD	syndrom poruchy pozornosti s hyperaktivitou (<u>a</u> ttention <u>d</u> eficit <u>h</u> yperactivity <u>d</u> isorder)
ACh	acetylcholin (<u>a</u> cetyl <u>ch</u> oline)
AChE	acetylcholinesteráza (<u>a</u> cetyl <u>ch</u> olin <u>e</u> sterase)
Acro 24	akrofáze čtyřadvacetihodinového rytmu (<u>a</u> crophase <u>24</u> hours)
Amp 24	amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (<u>a</u> mplitude <u>24</u> hours)
AVP	arginin-vazopresin (<u>a</u> rginine <u>v</u> asopressin)
BMAL1	mozkový a svalový protein 1 podobný ARNT (<u>b</u> rain and <u>m</u> uscle <u>A</u> RNT-like <u>1</u>)
BuChE	butyrylcholinesteráza (<u>b</u> utyryl <u>ch</u> olin <u>e</u> sterase)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (<u>c</u> yclic <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate)
CLOCK	cirkadiánní regulační protein (<u>c</u> ircadian <u>l</u> ocomotor <u>o</u> utput <u>c</u> ycles <u>k</u> aput)
CK1	kasein kináza 1 (<u>c</u> asein <u>k</u> inase <u>1</u>)
CNS	centrální nervová soustava (<u>c</u> entral <u>n</u> ervous <u>s</u> ystem)
ColQ	kolagen Q (<u>c</u> ollagen <u>Q</u>)
CRE	cAMP responzivní sekvence (<u>c</u> AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement)
CREB	protein vážící cAMP responzivní sekvenci (<u>c</u> AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement- <u>b</u> inding protein)
CRY	protein cryptochrom (<u>c</u> ryptochrome)
D mean	denní aritmetický průměr (<u>d</u> ay <u>m</u> ean)
DAG	diacylglycerol (<u>d</u> iacylglycerol)
DBP	D-box albuminu vážící protein (albumin <u>D</u> -box- <u>b</u> inding protein)
DM	<u>d</u> orzomediální
Domnt PL	dominující délka periody (<u>d</u> ominating period length)
D ₁	dopaminové receptory typu 1 (<u>d</u> opamine receptors <u>1</u>)
D–N mean	rozdíl aritmetických průměrů (<u>d</u> ay mean – <u>n</u> ight <u>m</u> ean)
ERK1/2	kináza regulovaná extracelulárním signálem (<u>e</u> xtracellular signal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase <u>1/2</u>)
GABA	γ-aminomáselná kyselina (<u>g</u> amma- <u>a</u> mino <u>b</u> utyric <u>a</u> cid)
GRK	receptorové kinázy spřažené s G-proteiny (<u>G</u> protein-coupled <u>r</u> eceptor <u>k</u> inase)
GRP	gastrin uvolňující peptid (<u>g</u> astrin- <u>r</u> eleasing peptide)
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (<u>G</u> -protein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptors)
ChAT	cholinacetyltransferáza (<u>ch</u> oline <u>a</u> cetyl <u>t</u> ransferase)
ChE	cholinesteráza (<u>ch</u> olin <u>e</u> sterase)

CHT	vysokoafinitní cholinový transportér (high-affinity <u>ch</u> oline <u>tr</u> ansporter)
IgL	intergenikulární lístek (<u>i</u> ntergeniculate <u>l</u> ea <u>f</u> let)
ipRGC	fotosenzitivní gangliové buňky sítnice (<u>i</u> ntrinsically <u>p</u> hotosensitive <u>r</u> etinal <u>g</u> anglion <u>c</u> ell)
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát (<u>i</u> nositol-1,4,5- <u>tr</u> is <u>p</u> hosphate)
MAPK	proteinkinázy aktivované mitogenem (<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inases)
Mesor	střední hodnota rytmu
MR	muskarinové receptory (<u>m</u> uscarinic <u>r</u> eceptors)
M ₄ MR	muskarinové receptory typu 4 (<u>M</u> ₄ <u>m</u> uscarinic <u>r</u> eceptors)
M ₄ KO	organismus s inaktivovaným genem pro muskarinové receptory typu 4 (<u>M</u> ₄ <u>k</u> nock <u>o</u> ut)
N mean	noční aritmetický průměr (<u>n</u> ight <u>m</u> ean)
NFIL3	jaderný faktor regulovaný interleukinem 3 (<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>i</u> nter <u>l</u> eukin 3-regulated)
P lengths	počet period (period <u>l</u> engths)
PACAP	polypeptid aktivující hypofyzární adenylátcyklázu (<u>p</u> ituitary <u>a</u> denylate <u>c</u> yclase- <u>a</u> ctivating polypeptide)
PKA/C	proteinkináza A/C (protein <u>k</u> inase <u>A</u> / <u>C</u>)
PAS	periferní anionické místo (<u>p</u> eripheral <u>a</u> nionic <u>s</u> ite)
PER	periodický protein (<u>p</u> eriod)
PHA	posteriórní hypotalamická oblast (<u>p</u> osterior <u>h</u> ypothalamic <u>a</u> rea)
PLC	fosfolipáza C (<u>p</u> hospholipase <u>C</u>)
PNS	periferní nervová soustava (<u>p</u> eripheral <u>n</u> ervous <u>s</u> ystem)
PRAD	na prolin bohatá doména (<u>p</u> roline- <u>r</u> ich <u>a</u> ttachment <u>d</u> omain)
PRiMA	na prolin bohatá membránová kotva (<u>p</u> roline- <u>r</u> ich <u>m</u> embrane <u>a</u> ncor)
SCN	suprachiasmatická jádra (<u>s</u> uprachiasmatic <u>n</u> uclei)
SPVZ	subparaventrikulární zóna (<u>s</u> ubparaventricular <u>z</u> one)
RHT	retinohypotalamický trakt (<u>r</u> etino <u>h</u> ypothalamic <u>t</u> ract)
ROR	sirotčí receptor příbuzný kyselině retinové (<u>r</u> etinoic acid-related <u>o</u> rphan <u>r</u> eceptor)
RORE	ROR responzivní sekvence (<u>R</u> OR <u>r</u> esponse <u>e</u> lement)
T mean	celkový aritmetický průměr všech naměřených hodnot (<u>t</u> otal <u>m</u> ean)
t Peak	čas nejvyšší hodnoty z fitované křivky (<u>t</u> ime of <u>p</u> ea <u>k</u>)
TM	transmembránová doména (<u>t</u> rans <u>m</u> embrane domain)
VAcHT	vezikulární acetylcholinový přenašeč (<u>v</u> esicular <u>a</u> cetyl <u>ch</u> oline <u>t</u> ransporter)
VIP	vazoaktivní intestinální peptid (<u>v</u> asoactive <u>i</u> ntestinal <u>p</u> eptide)
VL	<u>v</u> entro <u>l</u> aterální
%Rhythm	koeficient určenosti neboli procento variace v datech vysvětlitelné modelem fitování

1 ÚVOD

Acetylcholin je jedním z nejvýznamnějších neurotransmiterů a neuromodulátorů mozku. V centrální nervové soustavě ovlivňuje excitabilitu neuronů, plasticitu synapsí, podílí se na behaviorálních a kognitivních procesech, účastní se regulace spánku a mnoho dalšího. Právě z těchto důvodů je očekávatelné, že narušení cholinergního systému je spojováno s duševními onemocněními, jako je například Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba nebo schizofrenie. Porušená rovnováha mezi cholinergním a dopaminergním systémem je také spojována s Parkinsonovou poruchou, jež je doprovázena poruchami lokomoce. Všechna tato onemocnění ještě do dnešní doby nejsou plně pochopena a neexistuje na ně zatím účinná léčba.

Cirkadiánní rytmy jsou přirozenou vlastností téměř každého organismu a svými zásahy do fyziologických procesů synchronizují organismus s podmínkami vnějšího prostředí. Narušení těchto vnitřních rytmů je v poslední době spojováno s neurodegenerativními onemocněními mozku. Muskarinové acetylcholinové receptory jsou důležitou komponentou cholinergního systému mozku. Muskarinové receptory typu 4 jsou hojně lokalizovány ve strukturách zapojených do ovlivňování lokomoční aktivity, a právě lokomoční aktivita je jedním z hlavních dějů kontrolovaných a upravovaných přirozenou cirkadiánní rytmitou organismu. Bližší zkoumání změn biologických rytmů muskarinových receptorů typu 4 by tak mohlo pomoci k lepšímu pochopení vlivu, který tyto receptory mají na řízení lokomoce.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Cirkadiánní systém

Cirkadiánní rytmus je vrozená schopnost organismu vnitřně ovládat základní fyziologické procesy v závislosti na čase. Tato endogenní vlastnost organismu se vyskytuje jak u jednobuněčných, tak i u mnohobuněčných organismů. Cirkadiánní rytmus je přirozený samoudržitelný rytmus charakteristický svým tzv. volným během podle vnitřní periody (τ). Tato vnitřní perioda se liší v závislosti na organismu. I když se vnitřní perioda organismů často pohybuje okolo 24 hodin, ve většině případů neodpovídá přesné délce dne. Aby došlo k synchronizaci vnitřního biorytmu organismu s přirozeným periodickým okolním prostředím a střídáním dne a noci, jsou hlavní generátory cirkadiánního rytmu ovlivnitelné vnějšími vlivy prostředí. Tyto vlivy se obecně nazývají *zeitgeber* a upravují vnitřní biorytmus tak, aby odpovídal periodě dne (Roenneberg et al., 2007). U savců jsou hlavním generátorem rytmu suprachiasmatická jádra hypotalamu (SCN), která jsou citlivá na světlo okolního prostředí. Informace o míře světla v okolí jsou k nim dopravovány skrze retinohypotalamický trakt z fotoreceptorů sítnice oka (Moore & Lenn, 1972; Stephan & Zucker, 1972). Takto ovlivněná suprachiasmatická jádra poté synchronizují ostatní pomocné vedlejší generátory rytmu vyskytující se na periférii a skrze ně poté rytmicky řídí základní fyziologické procesy. Není proto překvapením, že narušení cirkadiánního rytmu je spojováno s metabolickými poruchami typu diabetes mellitus (Tasali et al., 2008) nebo s patologiemi centrální nervové soustavy, jako je například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba (Sharma et al., 2020), či hyperkinetická porucha ADHD (Tonetti et al., 2018).

2.1.1 Molekulární mechanismus

Molekulární podstatou vytváření rytmů v suprachiasmatických jádrech je genová exprese tzv. hodinových genů a vzájemné působení jejich proteinových produktů ve zpětnovazebném transkripčním a translačním systému smyček. Mezi hlavní hodinové geny patří *Bmal1* a *Clock*, jejichž proteinové produkty spolu v cytoplazmě vytváří heterodimer BMAL1/CLOCK, který slouží jako transkripční faktor a ovlivňuje po vazbě na E-box sekvenci v promotoru expresi dalších hodinových genů, jako je například *Period (Per)*, či *Cryptochrome (Cry)*. Proteinové produkty těchto genů PER1 a 2 a CRY1 a 2 poté tlumí hladinu BMAL1/CLOCK snížením jejich exprese. K tomuto snížení exprese dochází na konci světelné fáze dne, kdy jsou proteiny PER a CRY fosforylovány kasein kinázami CK1 ϵ či CK1 δ . V průběhu noci postupně ubývá

exprese BMAL1/CLOCK, což má za následek slábnutí inhibice nafosforylovaných CRY a PER proteinů. Ke konci cyklu jsou proteiny PER a CRY ubiquitinovány a zdegradovány v proteasomu (Gekakis et al., 1998; Kume et al., 1999; Lee et al., 2001; Reppert & Weaver, 2001; Eide et al., 2002; Etchegaray et al., 2010).

Heterodimer BMAL1/CLOCK dále také iniciuje transkripci genu jaderného receptoru *Rev-Erba*, jehož produkt tlumí expresi *Bmal1* skrze vazbu na RORE sekvenci v promotoru *Bmal1* genu. O místo na promotoru soupeří s proteinovým produktem genu *Rora*, jenž po vazbě naopak expresi podněcuje. Množství exprimovaného BMAL1 se tedy v průběhu dne liší, přičemž k nejvyšší míře transkripce dochází v tmavé části dne. Oproti tomu CLOCK je exprimován kontinuálně (King et al., 1997; Preitner et al., 2002).

Dalším produktem transkripce iniciované heterodimerem BMAL1/CLOCK je DBP, který následně dimerizuje s NFIL3 a spolu se váží na D-box sekvenci v promotoru dalších hodinových genů, jejichž expresi tak spouští. Exprese genu pro NFIL3 je podnícena stejným mechanismem, jako tomu je u exprese genu *Bmal1* (Lopez-Molina et al., 1997; Mitsui et al., 2001).

Tato soustava navzájem se ovlivňujících interakcí nakonec vede k expresi tzv. hodinami řízených genů, jejichž produkty slouží jako výstupní informace předávající cirkadiánní rytmus z hlavního oscilátoru do periferie a následně ovlivňující fyziologické procesy podmíněné rytmiticitou.

Genovou expresi některých hodinových genů ovlivňují mimo systém zpětnovazebných smyček i vnější podmínky prostředí, přičemž hlavní vliv mají nepochybně podmínky světelné. Konkrétně se jedná o míru světelného záření v době přechodu světlé a tmavé fáze dne neboli období úsvitu a soumraku. Tyto podněty vnějšího prostředí jsou schopné posunout fázi vlastního rytmu SCN a pomocí ovlivnění genové exprese upravují délku subjektivního dne a noci tak, aby odpovídala vnějšímu prostředí. Světelné impulzy mimo přechodné fáze dne nemají na přirozenou oscilaci suprachiasmatických jader žádný vliv (Khalsa et al., 2003; Roenneberg et al., 2007).

Primárním aspektem propojení SCN s vnějším prostředím je informace ze světločivných buněk na sítnici. Nejdůležitějším druhem fotoreceptorů jsou v tomto případě melanopsin obsahující fotosenzitivní gangliové buňky sítnice (z anglického *intrinsically photosensitive retinal ganglion cell* neboli ipRGC). Pro správnou světelnou synchronizaci rytmu je ovšem potřeba integrace informace o světle i z tyčinek a čípků (Berson et al., 2002). Po fotostimulaci poté

dochází k přenosu informace retinohypotalamickým traktem, což má za následek vylití neurotransmiterů na synapsi mezi zakončením RHT a suprachiasmatických jader. Neuropřenašeči jsou v tomto případě glutamát a speciální polypeptid aktivující hypofyzární adenylátcyklázu (PACAP z anglického *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (Hannibal et al., 2000). Tento výlev má za následek aktivaci glutamátových receptorů na povrchu SCN, jež vede ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, a také ke zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) skrze aktivaci adenylátcyklázy díky stimulaci PACAP (Hannibal et al., 2000). Navýšením těchto tzv. druhých posílů v buňce dochází k zapojení signálních kaskád vedoucích k aktivaci proteinkináz, jako je například proteinkináza A (PKA) a C (PKC) či mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK), které tak mohou svou fosforylací aktivovat transkripční faktor CREB (z anglického *cAMP response element-binding protein*). Aktivovaný CREB pak zvyšuje skrze promotor CRE (*cAMP response element*) expresi hodinových genů *Per1* a *Per2*, čímž dochází k úpravě endogenního systému zpětnovazebných smyček a fázovému posunu (Ginty et al., 1993; Travnickova-Bendova et al., 2002; Esvald et al., 2020).

Regulace vlivu světelných podmínek na vnitřní rytmickou oscilaci probíhá pravděpodobně skrze načasování fosforylace transkripčního faktoru CREB a také skrze snížení aktivity kináz spojených s extracelulárním signálem (ERK1/2), které zvyšují alternativní cestou expresi hodinového genu *Per2* (Ding et al., 1997). K tomuto snížení dochází zřejmě na základě signalizace zprostředkované vazoaktivním intestinálním peptidem (VIP), jenž je produkován buňkami suprachiasmatických jader, kde poté slouží k vzájemné synchronizaci oscilací jednotlivých buněk SCN. Přesný molekulární mechanismus regulace vlivu světla ovšem zatím není plně do všech detailů objasněn (Hamnett et al., 2019).

2.1.2 Suprachiasmatická jádra

Jak již bylo zmíněno, sídlem centrálních cirkadiánních hodin jsou u savců suprachiasmatická jádra. Jedná se o shluky neuronů umístěné v hypothalamu po stranách třetí mozkové komory nad překřížením drah zrakových nervů, přičemž tato párová struktura je u hlodavců tvořena přibližně 10 000 neurony v jednom jádře (Moore et al., 2002). Mimo neurony obsahují suprachiasmatická jádra i populaci gliových buněk, které stejně jako neurony exprimují cirkadiánní geny (Prolo et al., 2005). SCN lze morfologicky i funkčně rozdělit na dvě části, a sice na ventrolaterální jádro (VL) a dorzomediální obal (DM). Ventrolaterální oblast jader slouží k přijímání informací ze sítnice o světelných podmínkách v okolí přímou cestou skrze

vylití glutamátu z retinohypotalamického traktu (Moore et al., 2002). Tato část SCN ovšem dokáže také přijímat informace o světle nepřímo prostřednictvím aktivity intergenikulárního listku (IgL), což je struktura umístěná v thalamu, jež výlevem γ -aminomáselné kyseliny (GABA) a neuropeptidu Y předává stav světelných podmínek dál do VL SCN (Moore & Card, 1994). Za další nepřímou cestu se dá považovat serotonergní přenos informace z *nuclei raphe* (Selim et al., 1993; Moga & Moore, 1997). Přijaté informace poté VL jádro předává dál DM obalu a SCN se takto sesynchronizují se světelnými podmínkami. Mimo VL část přijímá dorzomediální oblast i signály z ostatních struktur mozku, jako jsou například limbické oblasti (Moga & Moore, 1997).

Neurony suprachiasmatických jader mezi sebou komunikují prostřednictvím sítí chemických a elektrických synapsí. Ty jsou zprostředkovány pomocí tzv. *gap junctions* neboli vodivých spoju. Těmito spoji je také zajišťována komunikace mezi neurony a gliovými buňkami (Prosser et al., 1994). Druh chemické synapse závisí na oblasti jader, ve které se vyskytují. Neurony ventrolaterální oblasti jader komunikují mezi sebou a DM obalem pomocí VIP a PACAP, jež se oba váží na VPAC2 receptor spářený s G-proteiny (Chen et al., 1999; Hannibal et al., 2000). Mimo to může být chemická synapse zprostředkována také proteinem uvolňující gastrin (GRP). Neurony dorzomediálního obalu spolu naopak komunikují převážně výlevem arginin-vazopresinu (AVP). Suprachiasmatická jádra pak mezi sebou komunikují hlavně díky výlevu neurotransmiteru GABA, jenž je hlavním neuropřenašečem zodpovědným za výstup signálů vedoucích ze suprachiasmatických jader (Moore & Speh, 1993).

Kromě těchto již zmíněných přenašečů jsou v SCN detekovány i ostatní neurotransmitery typické pro centrální nervovou soustavu a jejich receptory, jako je například acetylcholin a muskarinové receptory (viz dále), přičemž do SCN vedou projekce neuronů vycházející z cholinergních jader bazálního předního mozku a mozkového kmene (Bina et al., 1993).

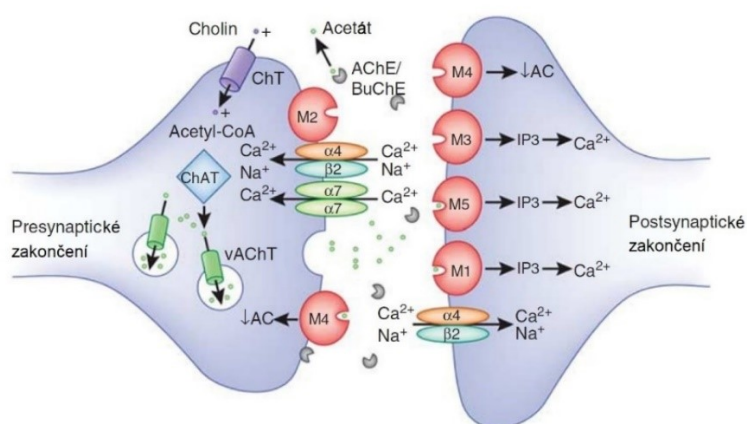
2.1.3 Biorytmus a lokomoce

Lokomoční aktivita je jedním z hlavních aspektů regulovaných cirkadiánní rytmitou organismu. Spolu s potravou se jedná o nejsilnější nesvětelný *zeitgeber* působící na vnitřní periodu rytmu. V experimentálních metodách zabývajících se cirkadiánními rytmy u zvířat je lokomoční aktivita základním sledovaným parametrem, jenž vypovídá o integritě a stavu biorytmu zkoumaného zvířete. Kromě suprachiasmatických jader se koordinace lokomoční aktivity účastní i ostatní mozkové struktury. Mezi tyto struktury patří například již zmíněný se SCN propojený intergenikulární listek thalamu. Tato přepojovací struktura se ukázala být

zodpovědná nejen za fotické určování rytmu, ale i za předávání informace o nefotických podnětech, jako je lokomoce (Muscat & Morin, 2006). O podílu IgL na biorytmickém řízení lokomoční aktivity nasvědčuje i snížení lokomoce, ke kterému došlo v důsledku vyřazení IgL lézí (Wickland & Turek, 1994). Další strukturou podílející se na biologické lokomoční aktivitě je se SCN propojená subparaventriculární zóna (SPVZ), jejíž léze snížila lokomoci až na čtvrtinu původní aktivity (Lu et al., 2001). SPVZ je také propojená nejen s IgL, ale i s posteriorní hypotalamickou oblastí (PHA) (Vujovic et al., 2015), přičemž elektrickou stimulací této hypotalamické oblasti bylo dosaženo zvýšení lokomoční aktivity (Sławińska & Kasicki, 1995). Velmi významnou mozkovou strukturou z hlediska lokomoce je také striatum (blíže popsáno dále) (Gomez et al., 1999). Tyto zmiňované struktury jsou více či méně ovlivňované cholinergním systémem, ať už v podobě cholinergních vstupů, výstupů či interneuronů (Myslivecek et al., 2017).

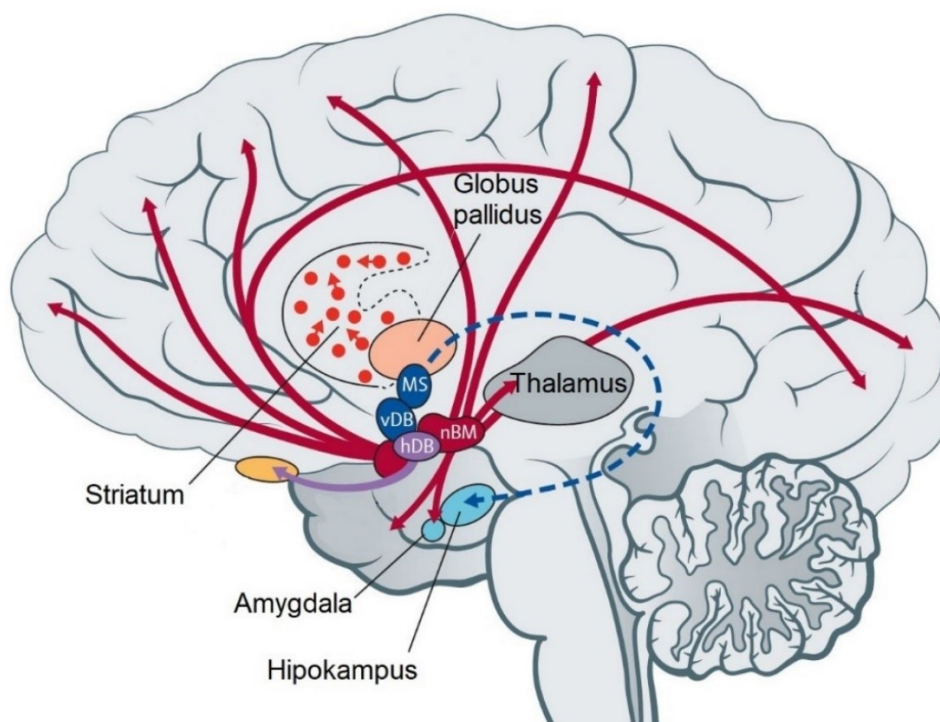
2.2 Cholinergní systém v CNS

Acetylcholin (ACh) je jedním z hlavních neuropřenašečů nervové soustavy. Hojně se vyskytuje jak v centrální, tak i v periferní nervové soustavě, a je prvním objeveným neurotransmiterem vůbec. Chemicky se jedná o ester kyseliny octové a cholinu, jehož syntéza z cholinu a acetylkoenzymu A probíhá v zakončení neuronů cholinergního systému za pomoci enzymatické aktivity cholinacetyltransferázy (ChAT) (Amenta & Tayebati, 2008). Dostupnost cholinu je zásadním krokem při tvorbě ACh, přičemž většina cholinu se do zakončení dostává vysokoafinitním na sodíku závislým cholinovým transportérem (CHT), který přenáší cholin ze synaptické štěrbin, jenž zde vzniká z vylitého ACh účinkem cholinesteráz (ChE) (Yamamura & Snyder, 1972; Ferguson et al., 2003). Mimo recyklaci je dalším zdrojem cholinu rozklad fosfatidylcholinu fosfolipázou D (Zhao et al., 2001). Syntetizovaný ACh je poté pomocí vezikulárního acetylcholinového přenašeče (VACHT) transportován do synaptických váček, které mohou být po depolarizaci neuronu zprostředkované vápenatými ionty vylity do synaptické štěrbin, kde se ACh váže na nikotinové či muskarinové receptory (obr. 1) (Nguyen et al., 1998).



Obr. 1 Schéma cholinergní synapse: Acetylcholin (zeleně) je tvořený cholinacetyltransferázou (ChAT) z acetylkoenzymu A (Acetyl-CoA) a cholinu. Pomocí vezikulárního acetylcholinového přenašeče (vAChT) je acetylcholin přesunut do váčky. Po vylití váčky z presynaptického neuronu se pak acetylcholin může vázat na muskarinové receptory (M1-5) postsynaptického zakončení, či na presynapticky umístěné autoreceptory (M2 a M4), jež následně skrze utlumení adenylátcyklázy (AC) regulují další výlev acetylcholinu. Postsynapticky umístěné muskarinové receptory následně zvyšují koncentraci intracelulárního vápníku skrze aktivaci druhého posla inositoltrifosfátu (IP3), či snižují aktivitu AC v závislosti na typu receptoru. Uvolněný acetylcholin může také působit na pre- i postsynaptické nikotinové receptory ($\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$), které slouží jako iontové kanály pro kationty sodíku a vápníku. Acetylcholin je v synaptické štěrbině degradován cholinesterázami (AChE, BuChE) na cholin a acetát. Cholin je poté pomocí vysokoafinitního cholinového transportéru (ChT) přesunut do presynaptického zakončení a zrecyklován pro tvorbu nového acetylcholinu. (Převzato a upraveno z Jones et al., 2012)

Cholinergní projekce v mozku (obr. 2) lze na základě imunohistochemické detekce exprese enzymu ChAT v neuronech rozdělit na dvě hlavní větve a osm skupin cholinergních neuronů (Ch1 – 8). Hlavní skupinou cholinergních drah jsou rozsáhlé projekce vycházející ze spodiny předního mozku. Druhá skupina drah zase projikuje z oblasti mozkového kmene. První dvě skupiny neuronů vycházejí z jadra mediálního septa (Ch1) a vertikálního svazku diagonálního Brocova pásu (Ch2) a zajišťují hlavní cholinergní inervaci hipokampu. Oproti tomu dráhy z horizontálního svazku Brocova pásu (Ch3) směřují spolu s drahami Ch4 z bazálního magnocelulárního jádra do oblasti neokortexu a limbického systému, přičemž se hlavně jedná o oblasti čichového laloku a amygdaly. Dráhy Ch5 z pedunkulopontinního jádra a Ch6 z laterodorzálního tegmentálního jádra mozkového kmene vedou do oblasti thalamu. Projekce Ch7 z mediálního habenula vede do interpedunkulárního jádra, a nakonec skupina Ch8 směřuje z parabigeminálního jádra do oblasti *colliculi superior*. Rozsáhlá cholinergní inervace je zastoupena také v bazálních gangliích. Ve striatu je tato inervace zajišťována hlavně vnitřními cholinergními interneurony (Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1983b; Mufson et al., 1986; Mesulam & Geula, 1988).



Obr. 2 Cholinergní systém v lidském mozku: Cholinergní projekční dráhy (barevné šipky) vycházející ze spodiny předního mozku (Meynertových jader (nBM), mediálního jádra septa (MS), horizontálního (hDB) a vertikálního (vDB) Brocova pásu) do frontálního, parietálního, temporálního a okcipitálního laloku kortexu. Dráhy (červeně) také projikují do thalamu, amygdaly, hipokampu a čichového laloku (žlutě). Oranžově jsou na obrázku naznačeny oblasti *globus pallidus* a šipkami striatální cholinergní interneurony. (Převzato a upraveno z Bohnen et al., 2022)

2.2.1 Cholinesterázy

Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE) jsou dva hlavní enzymy zodpovědné za rozštěpení acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Hydrolýzou acetylcholinu tak může v důsledku jejich aktivit dojít k ukončení aktivace vyvolané uvolněním ACh z presynaptického zakončení. Oba tyto enzymy patří do rodiny α/β proteinových hydroláz, konkrétně do skupiny serinových hydroláz, pro které je v katalytickém místě typická přítomnost tří konzervovaných aminokyselin, a sice serinu (Ser), histidinu (His) a glutamátu (Glu) (Sussman et al., 1991; Perrier et al., 2002).

Strukturně lze obě tyto hydrolázy cholinových esterů v rámci své funkce rozdělit do tří částí. První částí je periferní anionické místo (PAS), které je tvořeno zbytky aromatických aminokyselin a vyskytuje se na ústí aromatického žlábků, jenž tvoří druhou významnou strukturní část cholinesteráz. Tento hluboký žlábek vede až do katalytického aktivního místa, třetí a nejvýznamnější části enzymu, kde probíhá samotné štěpení. Katalytické centrum se skládá z α anionického místa, kam se váže kvartérní dusík substrátu, a místa esterového obsahující triádu Ser-His-Glu, kde probíhá hydrolýza esterové vazby. Acetylcholin je v esterázách štěpen postupně na cholin a meziprodukt acetyl-enzym, který se poté přeměňuje na kyselinu octovou (Sussman et al., 1991; Schrag et al., 1991; Dvir et al., 2010).

Kromě katalytické funkce hrají AChE a BuChE také roli v buněčné adhezi a růstu neuritů, přičemž na těchto procesech se pravděpodobně tyto enzymy podílejí skrze své PAS místo (Grifman et al., 1998; Johnson & Moore, 1999). Mimo acetylcholin se do katalytického místa mohou vázat i látky, které se chovají jako reverzibilní, či ireverzibilní inhibitory. Právě látky vyvolávající reverzibilní inhibici jsou často využívány jako farmaka pro onemocnění vyvolané poruchou neurotransmise zprostředkované acetylcholinem, příkladem je hlavně Alzheimerova choroba, myasthenia gravis a Parkinsonova choroba (Soreq & Seidman, 2001). Obě ChE se kromě substrátové specifity liší i svou citlivostí na inhibitory (Colović et al., 2013).

Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7) je oproti BuChE v centrální nervové soustavě mnohem více zastoupena a na hydrolýze ACh má díky své vysoké katalytické aktivitě hlavní podíl (Li et al., 2000). AChE a BuChE jsou v lidském genomu kódovány různými geny (*ACHE* a *BCHE*), přičemž exprese AChE je podnícena nejen buněčnou diferenciací a nízkou hladinou samotného enzymu, ale také i při intoxikaci acetylcholinesterázovými inhibitory, stresové zátěži, či úrazu hlavy (Shapira et al., 2000; Kaufer et al., 1998; Shohami et al., 2000). Alternativním sestřihem

transkribované prekurzorové mediátorové ribonukleové kyseliny (pre-mRNA) dochází na jejím 3' konci k vytvoření několika variant AChE s jinak dlouhým C-koncovým řetězcem a rozlišnými vlastnostmi (Li et al., 1991). Hlavní variantou je tzv. T (z anglického *tailed*) varianta, pro kterou je typická specifická sekvence označovaná jako t peptid na svém C konci. Tyto varianty jsou schopny oligomerizovat na homo-, či hetero- mono-, di-, či tetramery (Bon & Massoulié, 1997).

T peptid zajišťuje interakci cholinesteráz s membránovými kotevními proteiny, jako je kolagenu Q podobná (ColQ) kotva a na prolin bohatá PRiMA kotva (*proline-rich membrane anchor*) (Krejci et al., 1997; Perrier et al., 2002). K této interakci dochází skrze navázání t peptidu na PRAD doménu kotev (*proline-rich attachment domain*). ColQ kotva nejčastěji váže tetramery ChE na neurosvalové ploténce a její mutace je spojena s kongenitálními myastenickými syndromy (Donger et al., 1998). Ukotvení skrze PRiMA kotvu je typické hlavně pro centrální nervovou soustavu. Stejně jako ColQ i PRiMA váže ChE spojené do tetramerů a vyskytuje se ve dvou proteinových variantách PRiMA I a II (Perrier et al., 2003). Při vyřazení funkce PRiMA kotvy dochází k narušení funkce AChE, která se projeví zvýšením extracelulární koncentrace ACh, jež vyvolá významné snížení počtu muskarinových receptorů (Farar et al., 2012; Farar et al., 2013).

AChE se nachází především v centrální nervové soustavě, konkrétně v oblastech cholinergních projekcí. AChE se ovšem vyskytuje i v necholinergních neuronech, ale také i v neuronech dopaminergních. Při vyřazení aktivity AChE dochází k narušení dopaminergního systému v mozku snížením počtu dopaminových receptorů (Hrabovska et al., 2010).

Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza (EC 3.1.1.8), neboli pseudocholinesteráza, se vyskytuje hlavně na periferii, především v játrech, střevě, plicích a krevní plazmě. V centrální nervové soustavě se vyskytuje oproti AChE mnohem méně (Li et al., 2000). V mozku je BuChE převážně lokalizována v hipokampu, amygdale a thalamu (Darvesh et al., 1998; Darvesh & Hopkins, 2003). Stejně jako AChE se i BuChE váže na proteinové kotvy. BuChE se objevuje pouze v jedné globulární formě, a sice jako monomer, dimer, či tetramer (Atack et al., 1987).

Butyrylcholinesteráza je schopna kromě ACh hydrolyzovat i jiné látky, jako je heroin (Lockridge et al., 1980), či kyselina salicylová (Masson et al., 1998). Tato její vlastnost je patrná u lidí, kteří mají přirozenou mutaci v genu *BCHE*, jehož produktem je BuChE se sníženou aktivitou, či plně nefunkční. V takovém případě mají tito jedinci problémy s odbouráváním

BuChE substrátů, které se projeví například jako problémy s dýcháním po podání sukcinylcholinu jakožto anestetika. Vyřazená aktivita BuChE je ovšem plně slučitelná se životem a bez zdravotních problémů (Li et al., 2008). Předpokládá se, že BuChE zastává roli hlavní cholinesterázy při vyřazení AChE, jelikož ztráta funkce AChE není neslučitelná se životem (Li et al., 2000).

2.2.2 Muskarinové receptory

Muskarinové acetylcholinové receptory (MR) patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR), konkrétně do třídy A, kam se řadí receptory podobné rhodopsinu. Jedná se o membránové metabotropní receptory, pro které je charakteristická jejich transmembránová doména skládající se ze sedmi α -helikálních řetězců (TM1 – 7) navzájem propojených třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami, a také jejich extracelulární N- a intracelulární C-koncové oblasti (Haga et al., 2012).

K aktivaci MR dochází po vazbě endogenního agonisty, v tomto případě neurotransmiteru acetylcholinu, z extracelulární strany do vazebné kapsy utvořené v prostoru mezi transmembránovými doménami. Toto ortosterické vazebné místo obsahuje vysoce konzervovaný záporně nabitý aspartát (Asp105) (Curtis et al., 1989), jenž se spolu s aromatickými zbytky tyrozinů a threoninů ukázal být klíčovým pro vazbu terciálního atomu dusíku v molekulách pozitivně nabitého agonisty. Navázání agonisty vede ke změně vzájemné polohy transmembránových řetězců TM3, TM5, TM6 a TM7, jejichž vzájemným pootočením dojde ke změně konformace kanálu a aktivaci G-proteinu (Burgen, 1965; Hulme et al., 2003; Kruse et al., 2012).

Mimo ortosterické vazebné místo se na MR vyskytují i prostorově odlišná alosterická místa, přičemž každý podtyp muskarinového receptoru obsahuje alespoň jedno alosterické místo, které je umístěno v extracelulární části receptoru mezi druhou a třetí smyčkou (Huang et al., 2005; Kruse et al., 2013). Látky vážící se do těchto alosterických míst mohou sloužit jako modulátory, které následně posilují či zeslabují účinek látek navázaných do ortosterického místa (Wess, 2005). Mimo to mohou tyto látky také ovlivňovat typ signální kaskády (viz dále) spuštěné aktivním receptorem. Ukázalo se, že některé látky vážící se do ortosterického místa jsou schopny se navázat i do místa alosterického, ovšem ve vysoké koncentraci (Redka et al., 2008). Tvorba léčiv, které jsou schopné navázat se pouze na specifický podtyp receptoru skrze alosterické místo a zároveň jsou schopné skrze ortosterické místo ovlivnit aktivitu receptoru,

takzvaných bitopických ligandů (Valant et al., 2008), představuje v dnešní době farmakologicky atraktivní cíl terapie onemocnění spojených s určitými druhy MR.

Signální kaskády

Agonisty aktivované MR přenášejí do buňky signál především skrze signální kaskády zprostředkované G-proteiny. Typ G-proteinu, který je receptorem aktivován, je závislý na podtypu MR, se kterým je spřažen. Do dnešní doby bylo rozlišeno celkem pět genomicky i krystalograficky odlišných podtypů MR (M_{1-5}) (Bonner et al., 1987; Caulfield & Birdsall, 1998). Muskarinové receptory lichého typu se váží převážně s $G_{q/11}$ proteiny. Takto aktivované proteiny poté stimulují fosfolipázu C (PLC). Aktivní PLC štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP_3) a 1,2-diacylglycerol (DAG). Tyto molekuly následně způsobí zvýšení intracelulární koncentrace vápníku (IP_3) a aktivaci proteinkinázy C (DAG), jež může skrze fosforylaci předávat signál dál do buňky. Oproti tomu MR sudého typu aktivují preferenčně $G_{i/o}$ proteiny. Tento typ G-proteinů inhibuje aktivitu adenylátcyklázy (AC), což má za následek snížení intracelulární koncentrace cAMP, který AC štěpí z adenosintrifosfátu (Jakubík et al., 2011; Kow & Nathanson, 2012). Mimo to aktivují MR sudého typu skrze β podjednotku těchto inhibičních G-proteinů dovnitř usměřující K^+ kanály (Brown & Adams, 1980) a též inhibují napětově závislé kanály pro vápník (Yan & Surmeier, 1996).

Kromě těchto typických G-proteinových interakcí se mohou MR spojovat i s G_s neboli stimulačními proteiny, které mají přesně opačnou funkci, než mají $G_{i/o}$ proteiny, a tudíž stimulují AC, což vede ke zvýšení koncentrace cAMP a aktivaci proteinkinázy A (Mistry et al., 2005; Michal et al., 2007). MR ovšem mohou aktivovat i další G-proteiny, například M_1 receptory mohou aktivovat mimo $G_{q/11}$ proteinů i inhibiční $G_{i/o}$ proteiny. Oba typy G-proteinů mohou aktivovat i M_2 receptory (Santiago & Abrol, 2019), M_4 oproti tomu aktivují mimo G_i a G_s i G_{15} proteiny (Figueroa et al., 2009).

Muskarinové receptory jsou jakožto GPCR schopné aktivovat i signální kaskádu cytosolických β -arrestinů. Tato signální kaskáda začíná fosforylací aktivních MR kinázami spřaženými s G-proteiny (GRK). Na fosforylované MR se následně váží β -arrestiny, které aktivní receptor desenzitizují, pomocí klathrinem zprostředkované endocytózy internalizují a také aktivují signální kaskádu mitogenem aktivovaných proteinkináz, jež regulují buněčné procesy jako je například apoptóza, či chemotaxe (Ahn et al., 2003). Konkrétně se jedná o proteinkinázy ERK1/2, jejichž aktivací dochází k sekvestraci GPCR a snížení odpovědi buňky na receptorové

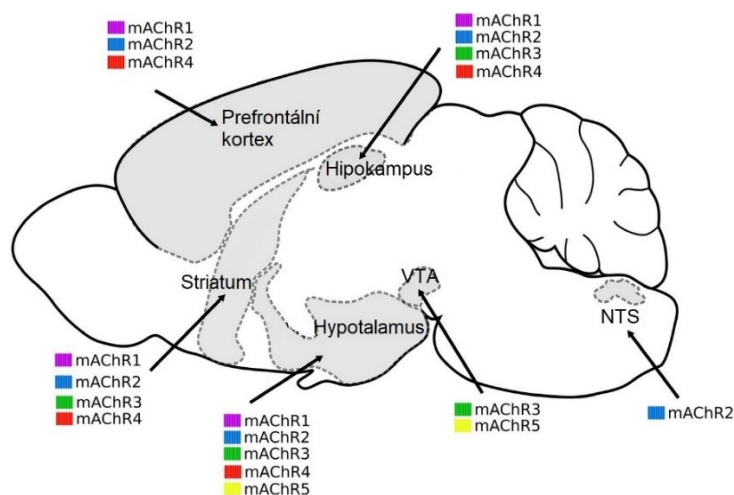
stimuly (Paradis et al., 2015). Přítomnost G-proteinů se ovšem pro signalizační funkci β -arrestinů ukázala být jako nezbytná (Grundmann et al., 2018).

Muskarinové receptory typu 1

M₁ receptory jsou pravděpodobně jedním z nejprobádanějších MR. Vyskytují se jak v centrální nervové soustavě (CNS), tak i v nervové soustavě periferní (PNS). Na periférii nejsou tyto receptory příliš zastoupeny, jelikož hlavními MR periferie jsou hlavně muskarinové receptory typu 3 a 2. V PNS se M₁ MR vyskytují v podčelistních slinných žlázách (Gautam et al., 2004), ovšem pouze v malé míře (Ito et al., 2009). V převaze oproti ostatním typům MR se vyskytují v epitelu žláz prostaty (Ruggieri et al., 1995) a mají zásadní vliv na sekreci v tlustém střevě (Haberberger et al., 2005). V menší míře se spolu s M₃ receptory vyskytují v buňkách pankreatu (Boschero et al., 1995) a v plicích, kde se pravděpodobně podílejí na bronchokonstrikci vyvolané působením cholinergního systému (Struckmann et al., 2003). Dále se M₁ receptory vyskytují také v močovém měchýři (Somogyi et al., 1994) a v srdci, kde jejich aktivitou dochází k výlevu katecholaminů a následné stimulaci srdeční aktivity (Hardouin et al., 2002).

V mozku jsou jedním z nejvíce zastoupených podtypů (obr. 3). Vyskytují se nejvýrazněji v oblasti neokortexu a hipokampu (Porter et al., 2002), kde se podílejí na procesech učení a kognice. Mimo to se v menší míře vyskytují také v bazolaterální amygdale. V hipokampu se vyskytují ve všech oblastech Ammonova rohu (*cornu Ammonis*, CA), ovšem s největší denzitou v oblastech CA2 a CA3. Jejich lokalizace na pyramidových neuronech jim pravděpodobně umožňuje regulovat glutamatergní neurotransmisi. Dále se také nacházejí i v oblastech gyru dentatu a to na neuronech granulární, pyramidové i multifonní vrstvy a též v oblasti *stratum radiatum* (Scarr et al., 2016). V bazolaterální amygdale jsou M₁ MR exprimovány v blízkosti glutamátových NMDA receptorů, a to hlavně na dendritech pyramidových neuronů (McDonald, 2022). V hipokampu se aktivita M₁ receptorů ukázala být důležitá pro zvýšení kognice v podobě vlivu na inkorporaci glutamátových AMPA receptorů do membrány postsynaptického zakončení (Zhao et al., 2018). V prefrontálním kortexu se dále podílí na modulaci pracovní paměti skrze aktivaci KNCQ iontových kanálů pro draslík (Galvin et al., 2020) a jsou lokalizovány na tělech pyramidových a inhibičních neuronů a taktéž i astrocytů (Oda et al., 2018). MR typu 1 se nalézají také ve striatu na GABAergních ostnatých neuronech, kde modulují GABAergní a glutamatergní vstupy (Alcantara et al., 2001). Exprimovány jsou taktéž v suprachiasmatických jádrech (Yang et al., 2010).

Muskarinové M_1 receptory jsou pro svou roli v procesech tvorby, uchovávání a vyvolávání paměti zkoumány jakožto potenciální cíl léčby onemocnění, jež se projevují narušením těchto procesů. Jednou z těchto patologií je Alzheimerova choroba. Tato neurodegenerativní porucha se vyznačuje narušením acetylcholinového systému v mozku a jejím hlavním příznakem je kognitivní dysfunkce projevující se jako předčasná demence. Během toho onemocnění dochází ke snížení počtu M_1 receptorů v korové a hipokampální oblasti, a sice v případě hipokampu až téměř na polovinu (Flynn et al., 1995). Úbytek M_1 receptorů v hipokampu byl kromě Alzheimerovy choroby zaznamenán i v případě demence s Lewyho tělísky (Shiozaki et al., 2001). Současná léčba Alzheimerovy demence je z důvodu nespecifického ovlivňování cholinergního systému v mozku, ale i na periferii, stále doprovázena velkým množstvím nežádoucích účinků, jako je například nadměrné slinění a slzení, poruchy močení, gastrointestinální problémy a také stavy podobné epileptickým záchvatům. Z těchto důvodů se současný výzkum snaží cílit na M_1 receptory v CNS hlavně skrze vysoce selektivní alosterické modulátory (Felder et al., 2018). Jinou možností specifického cílení na M_1 receptory naskytuje takzvané ektopické vazebné místo, jež je specifické pouze pro MR typu 1 (Spalding et al., 2002). Další možností designu účinných léčiv s minimalizovanými nežádoucími projevy by mohlo být cílení na výběr signální kaskády M_1 receptorů, jelikož signální dráha spojená s fosforylací receptoru a arrestinovou kaskádou se ukázala býti spojena s nižším výskytem vedlejších účinků, než je tomu u signální dráhy aktivující spážené G-proteiny (Bradley et al., 2020).



Obr. 3 Expresa muskarinových receptorů v myším mozku: Muskarinové receptory jsou v mozku nejvýrazněji exprimovány v šedě vyznačených oblastech (VTA – ventrální tegmentální oblast, NTS – nucleus tractus solitarius). Za dominantní MR mozku jsou považovány M_1 receptory (fialové), jejichž hlavním místem výskytu jsou korové oblasti, hipokampus, hypotalamus a striatum. V CNS jsou velmi často koexprimovány s M_4 MR (červeně), se kterými pravděpodobně také sdílí některé své funkční role. (Převzato a upraveno z Falk et al., 2020)

Muskarinové receptory typu 4

Muskarinové receptory M₄ jsou podobně jako M₁ zastoupeny jak v periferní, tak i v centrální nervové soustavě. V soustavě periferní se jakožto autoreceptory podílejí na inervaci močového měchýře a spolu s MR typu 2 na inervaci srdeční síně (Zhou et al., 2002). V menší míře se M₄ MR také vyskytují i v buňkách pankreatu (Ito et al., 2009) a podílejí se na procesech slinění (Bymaster et al., 2003).

Mnohem výrazněji než v periferní soustavě, se ale tyto receptory vyskytují v CNS (obr. 3). Nejvíce se vyskytují ve striatu, konkrétně na středních ostnatých GABAergních neuronech, kde se nacházejí spolu s M₁ MR postsynapticky na asymetrických synapsích, a také na somatech cholinergních interneuronů (Hersch et al., 1994). Ve striatu jsou lokalizovány jak na neuronech přímé striatonigrální dráhy vedoucí do *substantia nigra pars compacta*, tak i na neuronech nepřímé striatopallidální dráhy směřující do *globus pallidus*, i když v několikanásobně menším množství (Santiago et al., 2001). Kromě striata se M₄ receptory nacházejí v hipokampu (Levey et al., 1995), kortexu, thalamu (Pancani et al., 2014) a suprachiasmatických jádrech (Yang et al., 2010).

Ve striatu se muskarinové receptory typu 4 pravděpodobně podílí na regulaci lokomoční aktivity. Tato funkce je patrně zprostředkována skrze M₄ receptorový inhibiční efekt na aktivitu dopaminových receptorů typu 1, které se v oblasti striatonigrálních drah vyskytují v těsné blízkosti s M₄ MR, jelikož při vyřazení M₄ receptorů nejen že došlo ke zvýšení lokomoční aktivity, ale tento efekt byl navíc i umocněn po podání selektivních agonistů dopaminových receptorů typu 1 (D₁ receptorů) (Gomez et al., 1999). K tomuto tlumicímu efektu dochází na buněčné úrovni pravděpodobně prostřednictvím snížení hladiny cAMP vyvolané aktivitou D₁ receptorů na středních ostnatých neuronech (Nair et al., 2019). K umocnění lokomoce došlo také při experimentálním vyřazení M₄ receptorů na striatálních neuronech obsahujících D₁ receptory, kdy po podání agonistů receptorů D₁, amfetaminu a kokainu došlo ke znásobení lokomoci navýšujícího efektu. Mimo zvýšení lokomoce došlo také k umocnění psychostimulancie vyvolané behaviorální senzibilizací a navýšení výlevu dopaminu v *nucleus accumbens* (Jeon et al., 2010). Podobné výsledky ovšem byly naměřeny i v případě muskarinových receptorů typu 1, kdy vyřazením M₁ MR došlo ke zvýšení lokomoce, k nárůstu hladin dopaminu ve striatu a k umocnění lokomotorické aktivity po podání amfetaminu, z čehož vyplývá, že regulace lokomoce se účastní i M₁ receptory (Gerber et al., 2001). Podíl na regulaci dopaminergního výlevu ve striatu není ovšem výsadou pouze MR typu 4 a 1, ale i MR typu 3 a 5, přičemž modulační vliv M₄ a M₃ receptorů je pravděpodobně

zprostředkováván skrze uvolňování neurotransmiteru GABA (Zhang et al., 2002). Diskutovaný význam M₄ lokomoční funkce podporuje počet těchto receptorů, který se ve striatu v průběhu vývoje mozku oproti ostatním typům MR postupně navyšuje (Tice et al., 1996). Pro svůj potencionální vliv na regulaci lokomoce jsou M₄ receptory zkoumány v souvislosti s poruchami motoriky, které jsou jedním z hlavních příznaků Parkinsonovy poruchy, přičemž blokace M₄ MR přinesla utlumení těchto parkinsonismu podobných motorických poruch navozených lézí nigrostriálních oblastí (Ztaou et al., 2016).

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo pozorovat, jaký vliv má vyřazení muskarinových receptorů typu 4 na denzitu ostatních MR a aktivitu ChE, a jak se tyto sledované komponenty cholinergního systému mění v průběhu 24 hodin.

Zvláštní důraz v rámci pozorování denzity muskarinových receptorů byl kladen na MR typu 1, jelikož tento typ receptoru je v CNS spolu s M₄ MR ve velmi těsném funkčním i prostorovém vztahu. Jelikož bylo dříve prokázáno, že změny lokomoce u myši s vyřazeným genem pro M₄ MR se vyskytují pouze u samic, byly pro tuto studii použity pouze samice, nikoliv samci.

Hlavní otázkou bylo zkoumání sledovaných entit cholinergního systému v mozkových strukturách zapojených do koordinace přirozené biorytmické lokomoční aktivity. Těmito vybranými soustavami jsou motorický kortex, striatum, thalamus, intergenikulární lístek, posteriorní hypotalamická oblast a subparaventriculární zóna.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Experimentální zvířata

Pro tento pokus byly použity myši se zcela vyřazeným receptorem (M_4KO) a myši běžného typu (WT – linie C57Bl/6NTac). Myši M_4KO byly původně vytvořeny ve Wessově laboratoři (Gomeza et al., 1999) a následně chovány a množeny v chovné stanici Centra pro experimentální biomodely 1. lékařské fakulty UK (Praha, Česká republika). Zde byly myši chovány v souladu s legislativou České republiky a Evropské unie, podmínky chovu byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK. Pokusy probíhaly na základě rozhodnutí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy pod číslem MSMT-2409/2017-3.

Z chovné stanice byly myši přeneseny do experimentálních prostor Laboratoře neurofyzologie a chování Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze a ponechány alespoň 14 dní k adaptaci na nové prostředí. Zde byly myši chovány ve standardních nádobách s plochou dna 840 cm^2 při teplotě $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ve světelných podmínkách s režimem 12/12 hodin světlo/tma (světlo 6:00 – 18:00). Potrava a voda byla zvířatům zajištěna *ad libitum*.

Před počátkem experimentu byly všechny myši genotypizovány (vzorek tkáně byl získán odběrem z prstu), přičemž pro experiment byly použity pouze myši genotypově homozygotní. Pro tento experiment byla použita zvířata z plně zpětně (14 generací) zkřížených $M_4-/-$ a $M_4+/+$ vrhů. Celkem bylo do experimentu zahrnuto 36 M_4KO a 36 WT samic ve věku 3-6 měsíců o hmotnosti 20-26 g, ne sourozenci. Pro zajištění hormonální homogenity byly samice chovány odděleně od samců, na základě čehož došlo k potlačení estrálního cyklu (Lee-Bootův efekt, Ma et al., 1998). Myši byly náhodně rozděleny do skupin po 6 zvířatech, polovina myší z každé skupiny byla použita pro stanovení M_4 MR a druhá polovina pro stanovení ChE.

4.2 Metody

4.2.1 Muskarinové receptory

Příprava vzorků

Myši byly usmrceny dekapitací v průběhu 24 hodin bez použití anestezie v časech 2:00, 6:00, 10:00, 14:00, 18:00 a 22:00 h. Po dekapitaci byl mozek vyjmut exkochleačním nástrojem z lebky a ihned přenesen na suchý led. Mozek byl dále uchováván při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby krájení vzorků na kryostatu.

Před krájením byly mozky přesunuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 120 minut a poté připevněny fixačním médiem Tissue OCT (Labonord, Templemars, Francie) na krájecí stojánek kryostatu. Mozky byly krájeny na $16\mu\text{m}$ frontální řezy na kryostatu Leica CM3050 S (Leica Biosystems, Nußloch, Německo) při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (teplota destičky $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$). Řezy byly následně přeneseny na podložní sklíčka SuperFrost Plus (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo). Mozky byly odebírány po třech sadách tak, aby zahrnovaly námi zvolené struktury. První sada obsahovala motorický kortex a striatum, druhá sada motorický kortex, striatum, thalamus a subparaventriculární zónu a třetí sada intergenikulární lístek, posteriorní hypotalamickou oblast a thalamus. Každá sada obsahovala 10 sklů se třemi řezy. Po oschnutí nanesených vzorků byla sklíčka přenesena do skladovacích krabiček a uchována při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do další manipulace.

Nisslovo barvení

Pro ověření zvolených struktur mozku bylo vybráno v každé sadě vždy první podložní sklíčko od každého zvířete, které bylo obarveno Nisslovým barvením. V případě nejasností bylo obarveno také páté sklíčko sady. Rozmražené a suché vzorky byly ponořeny do 70%, 80% a 96% ethanolu vždy po dobu dvou minut. Následně byla podložní skla ponořena do Nisslova barvicího roztoku po dobu 20 minut. Sklíčka byla poté dvakrát opláchnuta ponořením do destilované vody a ponořena do 96%, 80% a 70% ethanolu po jedné minutě. Nakonec byly vzorky ponořeny do xylenu (p.a., Penta s.r.o., Praha, Česká republika) na 5 minut a následně do xylenu na dobu minimálně 45 minut pro vytěsnění ethanolu.

Barvící roztok:

0,5 g kresyl violet acetát ($C_{18}H_{15}N_3O_3$, $M_r = 321,34$ g/mol; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)

+ 475 ml destil. H_2O + 25 ml kys. octové (CH_3COOH 99% p.a., $M_r = 60,05$ g/mol; Penta s.r.o., Praha, Česká republika)

Po smíchání reagensů byl roztok minimálně hodinu míchán, pH bylo případně upraveno na hodnotu 3,5 pomocí 0,1M octanu sodného. Roztok byl následně přefiltrován přes filtrační papír.

Pro zachycení vybraných struktur mozku byly tkáňové řezy průběžně během krájení, a i po Nisslově barvení, kontrolovány mikroskopováním (zvětšení 100x, AxioStar, ZEISS, Německo) a porovnávány s atlasem myšího mozku (Paxinos & Franklin, 2008).

Autoradiografie

Sklička se vzorky byla vyndána z -80 °C a ponechána 20 až 30 minut při pokojové teplotě (22 °C), dokud nebyla suchá. Pro odstranění endogenních ligandů byla sklička preinkubována v 50mM draselno-fosfátového pufru (pH = 7,4) po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky přeneseny do inkubačního roztoku 50mM draselno-fosfátového pufru s 2nM [^3H]-QNB (L-Quinuclidinyl [phenyl-4- ^3H] benzilát, specifická aktivita: 30 Ci/mmol). Zde byly inkubovány s radioligandem při pokojové teplotě 90 minut. Nespecifická vazba [^3H]-QNB byla určena stejným způsobem, ale samostatně za přítomnosti 10 μ M atropin-sulfátu. Pro kontrolu vazby bylo s atropinem inkubováno celkem 6 skel (3 WT a 3 KO) na jednu inkubaci. Vzorky byly následně dvakrát promyty od nenávaného ligandu v ledově vychlazeném fosfátovém pufru, vždy po dobu 5 minut. Nakonec byly vzorky krátkým ponořením do ledově vychlazené destilované vody opláchnuty a rychle usušeny mírným proudem studeného vzduchu.

Stejný postup byl dodržován pro inkubaci řezů s 5nM [^3H]-pirenzepinem ([N-methyl- ^3H] pirenzepin, specifická aktivita: 82 Ci/mmol).

Suchá sklička s řezy pak byla spolu s negativní kontrolou a ^3H standardy o známé radioaktivitě (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Luis, USA) přiložena na ^3H citlivé zobrazovací desky Fuji Bas (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, Německo) a uložena do autoradiografických kazet Kodak BioMax (Carestream Health, New York, USA) po dobu 6 dní.

Zobrazovací desky byly následně naskenovány a digitalizovány prostřednictvím snímače Fuji Bio-Imaging Analyzer BAS-5000 (FUJIFILM, Tokio, Japonsko). Vzorky byly dále analyzovány v programu MCID Analysis Software (InterFocus GmbH, Mering, Německo). Pro další vyhodnocení byla vždy použita data alespoň ze tří řezů každé oblasti mozku na každé zvíře s výjimkou IgL a PHA (viz dále).

Statistická analýza

Výsledky naměřené denzity MR byly následně zanalyzovány programem Chronos-Fit (verze 1.06, Heidelberg, Německo) a vyhodnoceny jednocestnou ANOVA metodou s post hoc testem dle Šidáka. Biorytmické křivky byly vytvořeny pomocí Fourierovy transformace a metody stupňovité regrese. Statistická analýza dat i grafické zobrazení křivek bylo vytvořeno v programu GraphPad Prism (verze 8.4.3, GraphPad Software, San Diego, USA).

4.2.2 Cholinesterázy

Příprava vzorků

Myši byly usmrceny dekapitací v průběhu 24 hodin bez použití anestezie v časech 2:00, 6:00, 10:00, 14:00, 18:00 a 22:00 h. Po dekapitaci byl mozek vyjmut exkochleačním nástrojem z lebky a ihned přenesen na suchý led. Mozek byl dále uchováván při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby krájení vzorků na kryostatu.

Před krájením byly mozky přesunuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 120 minut. Mozky byly na chlazené destičce (teplota destičky $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota kryokomory přístroje $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) kryostatu Leica CM3050 S (Leica Biosystems, Nußloch, Německo) nakrájeny žiletkou frontálně na 4 části tak, aby bylo možné punkční jehlou odebrat vybrané struktury (motorický kortex, striatum, thalamus). Části mozku byly vloženy do 0,5ml mikrozkušavek, umístěny do skladovacích krabiček a uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do další manipulace.

Těsně před začátkem stanovení aktivity cholinesteráz byla provedena homogenizace vzorků. Vzorky byly vychlazenou pinzetou přeneseny do 1,5ml mikrozkušavek uložených na ledu, obsahujících 300 μl roztoku 0,32M z lednice vychlazené sacharózy. Za neustálého chlazení nadrceným ledem byly vzorky homogenizovány po dobu 20 s na stupeň č. 4 homogenizátorem Ultra-Turrax T10 basic (Vitrum Praha s.r.o., Praha, Česká republika). Mezi jednotlivými vzorky byl homogenizátor propláchnut v sacharóze, denaturovaném ethanolu a následně

v čistém roztoku sacharózy, aby nedošlo ke kontaminaci předchozí tkání. Vzorky v mikrozkuvkách byly až do dalšího postupu uchovávány na ledu.

Aktivita cholinesteráz

Stanovení aktivity cholinesteráz bylo provedeno na základě Ellmanovy kolorimetrické metody (Ellman et al., 1961) upravenou na 96 jamkovou mikrotitrační destičku.

Inkubační roztok:

AChE:

- destil. H₂O.....9,47 ml
- 0,1M DNTB.....70 µl
- 2M MgCl₂.....70 µl
- 0,5M HEPES.....140 µl
- 10mM iso-OMPA.....140 µl

BuChE:

- destil. H₂O.....9,47 ml
- 0,1M DNTB.....70 µl
- 2M MgCl₂.....70 µl
- 0,5M HEPES.....140 µl
- 10mM BW284C51.....7 µl

Aktivační roztok:

AChE:

- destil. H₂O.....4,2 ml
- 0,138M ATCh.....70 µl

BuChE:

- destil. H₂O.....4,2 ml
- 0,138M BTCh.....70 µl

Množství uvedeno na 70 jamek mikrotitrační destičky.

Chemikálie (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA): 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DNTB, $M_{DNTB} = 396,35$ g/mol), tetraisopropyl pyrofosforamid (iso-OMPA, $M_{iso-OMPA} = 342,4$ g/mol),

1,5-bis(4-alkyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-dibromid (BW284C51, $M_{BW284C51} = 566,4$ g/mol), acetylthiocholin iodid (ATCh, $M_{ATCh} = 289,18$ g/mol), *S*-butyrylthiocholin chlorid (BTCh, $M_{BTCh} = 225,8$ g/mol), N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina) (HEPES, $M_{HEPES} = 238,31$ g/mol)

Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno 20 μ l na jamku homogenizovaného vzorku v duplikátech. Jako první byla nanášena ve stejném objemu 0,32M sacharóza, jež sloužila jako blank. Následně bylo do každé jamky přidáno 140 μ l inkubačního roztoku. Destička byla poté nechána po dobu 30 minut při pokojové teplotě k inkubaci. Po uplynulé době bylo přidáno do každé jamky 60 μ l aktivačního roztoku a absorbance vzorků na destičce byla poprvé změřena (čas $t = 0$ min). Absorbance byla měřena ve spektrofotometru Tecan Sunrise (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při vlnové délce 412 nm v časech $t = 0, 5, 10, 20$ a 30 min od počátku reakce, přístroj byl před každým měřením nastaven na protřepání destičky po dobu 1 s mimo zařízení.

Stanovení proteinu

Množství proteinu v homogenizovaném vzorku bylo stanoveno BCA metodou pomocí testovací sady QuantiPro BCA assay kit (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA), přičemž jako kalibrační protein byl použit hovězí sérový albumin. Mikrotitrační destička byla po nanášení reagensů v duplikátech inkubována po dobu 30 minut ve vodní lázni (GFL, Burgwedel, Německo) o teplotě 37 °C. Destička byla poté změřena na spektrofotometru Tecan Sunrise při 562 nm, protřepání destičky slabě po 3 s mimo zařízení. Množství proteinu v tkáni bylo konstantní pro všechny vybrané části mozku.

Ke zpracování dat ze spektrofotometru byl použit program KIM 32 (Microplate Evaluation KIM Verze 5.26, Dan Kittrich). Množství aktivity ChE (nmol/min/mg proteinu) ve vzorcích bylo vypočteno dle Lambert-Beerova zákona ze zprůměrované naměřené absorbance duplikátů a vztaženo na mg proteinu odebrané tkáně.

Statistická analýza

Výsledky naměřené aktivity ChE byly následně zanalyzovány programem Chronos-Fit (verze 1.06, Heidelberg, Německo) a vyhodnoceny jednocestnou ANOVA metodou s post hoc testem dle Šidáka. Biorytmické křivky byly vytvořeny pomocí Fourierovy transformace a metody stupňovité regrese. Statistická analýza dat i grafické zobrazení křivek bylo vytvořeno v programu GraphPad Prism (verze 8.4.3, GraphPad Software, San Diego, USA).

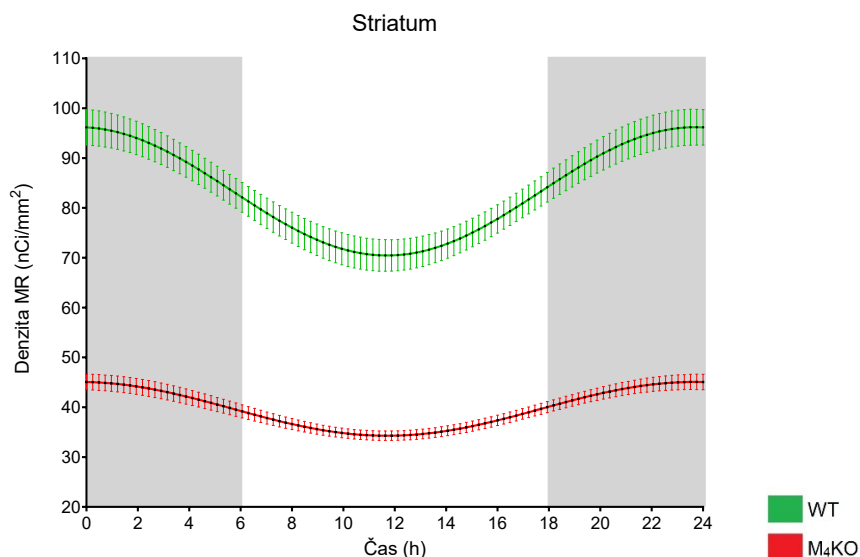
5 VÝSLEDKY

5.1 Muskarinové receptory

Ve vybraných oblastech mozku byla zkoumána denzita muskarinových receptorů značených [³H]-QNB v průběhu dne a byla pozorována její změna v důsledku absence muskarinových receptorů typu 4. Hlavními porovnávanými chronobiologickými parametry byly celkový aritmetický průměr všech naměřených hodnot (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti (procento variace v datech, které je vysvětlitelné modelem fitování, %Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor) a amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24). Hodnoty jsou uvedeny jako průměrná naměřená hodnota ± S.E.M.

5.1.1 Striatum

V oblasti striata byl naměřen nejvyšší počet MR ze všech námi vybraných struktur mozku. Jak u myši běžného typu (WT), tak i u myši s vyřazenými M₄ receptory (M₄KO) byly zaznamenány rozdíly v denzitě MR v průběhu 24 hodin (viz obr. 4). Maximální hodnoty denzity bylo v případě WT myši dosaženo v aktivní (temné) fázi dne, a sice v čase 22:00, u M₄KO myši byla maximální naměřená hodnota zaznamenána taktéž v aktivní fázi, ovšem v čase 2:00 (WT: 82,66 ± 3,213 nCi/mm², n = 15; M₄KO: 42,51 ± 1,929 nCi/mm², n = 14). Minimální hodnoty denzity byly naměřeny u myši WT na přelomu aktivní a inaktivní (světelné) fáze v 6:00 (WT: 66,78 ± 2,761 nCi/mm², n = 20). Oproti tomu u myši bez M₄ receptorů byla minimální průměrná denzita v MR naměřena v první polovině inaktivní fáze v 10:00 (M₄KO 35,39 ± 0,6927 nCi/mm², n = 24). Celková denzita MR byla u myši typu KO o 46,62 % nižší, přičemž tento rozdíl je u WT myši reprezentován chybějícími M₄ receptory. V průběhu 24 hodin poklesla denzita MR u myši typu WT o 19,2 %, u myši s vyřazenými M₄ receptory byl tento rozdíl menší, a sice o 14,4 %.



Obr. 4 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti striata: Denzita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 16$) v průběhu 24 hodin ve striatu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je dobře patrná jedna dominantní čtyřadvacetihodinová perioda s globálním maximem ve 23,8 h v aktivní fázi dne (šedě) a minimem v 11,6 h v inaktivní fázi. Rozdíly v denzitě mezi křivkami WT a M₄KO myši jsou reprezentovány MR typu 4 geneticky vyřazenými u KO myši.

Mimo rozdíly v hladinách denzity MR se M₄KO a WT myši lišily také rytmitou výskytu MR (tab. 1; jednofaktorová ANOVA: $F(15, 240) = 351,9$, $p < 0,0001$ ($F(DFn, DFd)$, kde F je testovací kritérium ANOVA, DFn je stupeň volnosti skupin, DFd je stupeň volnosti jednotlivých subjektů)). Celkový aritmetický průměr byl u myši typu WT o 55,95 % vyšší než u myši KO (WT: $83,06 \pm 2,824$ nCi/mm²; M₄KO: $39,59 \pm 1,163$ nCi/mm²; $n = 16$). U myši běžného typu byl zaznamenán o 51,98 % vyšší aritmetický denní a o 52,68 % vyšší aritmetický noční průměr (D mean WT: $75,63 \pm 2,991$ nCi/mm²; D mean M₄KO: $36,32 \pm 1,005$ nCi/mm²; N mean WT: $90,80 \pm 3,167$ nCi/mm²; N mean M₄KO: $42,97 \pm 1,353$ nCi/mm²; $n = 16$). Rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů byl u WT myši o 56,19 % vyšší než u KO myši (WT: $-15,17 \pm 2,445$ nCi/mm²; M₄KO: $-6,646 \pm 0,5382$ nCi/mm²; $n = 16$). Koeficienty určenosti rytmu byly u obou typů myši přibližně stejné (WT: $93,68 \pm 0,8549$; M₄KO: $94,79 \pm 0,8284$; $n = 16$). Střední hodnota rytmu u WT myši byla vyšší o 52,37 % (WT: $83,33 \pm 2,83$ nCi/mm²; M₄KO: $39,69 \pm 1,16$ nCi/mm²; $n = 16$). Amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu byla u myši běžného typu o 59,4 % vyšší než u myši s vyřazenými M₄ receptory (WT: $14,18 \pm 1,39$ nCi/mm²; M₄KO: $5,758 \pm 0,4727$ nCi/mm²; $n = 16$). U obou typů myši byla zaznamenána pouze jedna dominantní 24hodinová perioda.

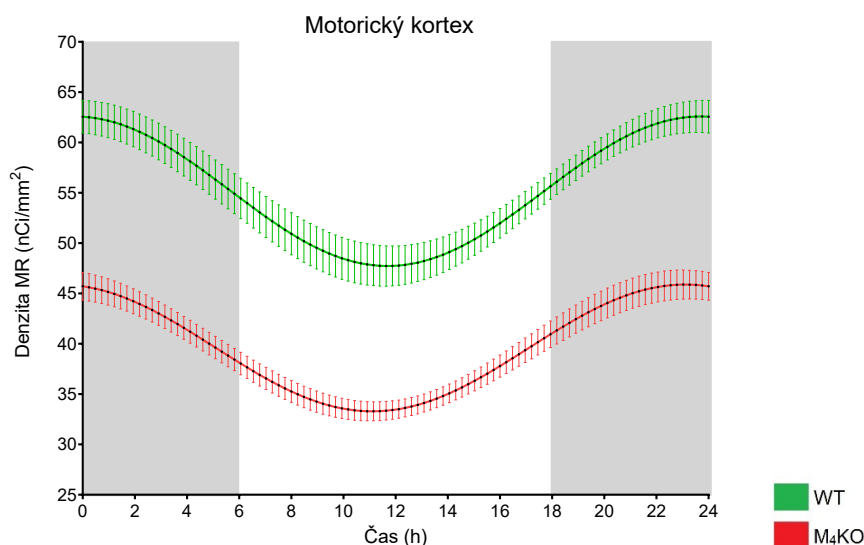
Tab. 1 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – striatum):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	Amp 24
významnost	****	****	****	*	ns	****	*
% M₄KO vs. WT	52,34	51,98	52,68	56,19	–1,18	52,37	59,39

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 16): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24), * p<0,05, **** p<0,0001, ns nesignifikanční.

5.1.2 Motorický kortex

Podobně jako ve striatu došlo v průběhu aktivní fáze dne ke zvýšení denzity MR (obr. 5). Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u myší WT stejně jako ve striatu ve 22:00 v aktivní fázi, ovšem v případě KO myší byla nejvyšší denzita zaznamenána v 18:00 na přelomu inaktivní a aktivní fáze dne (WT: $58,13 \pm 1,226$ nCi/mm², n = 15; M₄KO: $42,44 \pm 0,557$ nCi/mm², n = 24). Minimálních hodnot bylo dosaženo opět v inaktivní fázi, u KO myší v 10:00, u WT na přelomu fází v 6:00 (WT: $51,75 \pm 1,464$ nCi/mm², n = 18; M₄KO: $37,61 \pm 1,152$ nCi/mm², n = 23). Množství naměřených receptorů u myší bez M₄ MR bylo oproti množství MR u WT myší nižší o 27,83 %. Rozdíly množství MR v průběhu dne činí 11 % u WT myší a 11,4 % u KO myší.



Obr. 5 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti motorického kortexu: Denzita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 15$) v průběhu 24 hodin v motorickém kortexu myši WT (zeleně) a myši M4KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je dobře patrná jedna dominantní čtyřiačtyřhodinová perioda s globálním maximem biorytmické křivky ve 23,8 h v případě WT myši a ve 23,0 h v případě M4KO myši v aktivní fázi dne (šedě). Minimálních hodnot dosahovaly křivky v 11,6 h (WT myši) a v 11,1 h (M4KO myši) v inaktivní fázi. Rozdíly v denzitě mezi křivkami WT a M4KO myši jsou reprezentovány MR typu 4 geneticky vyřazenými u KO myši.

V rytmických parametrech došlo v motorickém kortexu taktéž u KO myši ke změně (tab. 2; jednofaktorová ANOVA: $F(15, 224) = 444,5$, $p < 0,0001$). Celkový aritmetický průměr byl u WT myši o 28,27 % vyšší než u myši KO (WT: $55,12 \pm 1,511$ nCi/mm²; M4KO: $39,64 \pm 0,918$ nCi/mm²; $n = 15$). Denní aritmetický průměr byl u WT myši o 29,82 % vyšší než u myši KO, noční průměr byl vyšší o 26,79 % (D mean WT: $50,77 \pm 1,888$ nCi/mm²; D mean M4KO: $35,63 \pm 0,91$ nCi/mm²; N mean WT: $59,42 \pm 1,41$ nCi/mm²; N mean M4KO: $43,5 \pm 1,196$ nCi/mm²; $n = 15$). Rozdíl denních a nočních průměrů se u obou typů myši lišil o 8,97 % (WT: $-8,648 \pm 1,139$ nCi/mm²; M4KO: $-7,872 \pm 1,055$ nCi/mm²; $n = 15$). Koeficient určenosti byl u obou typů myši přibližně stejný (WT: $94,87 \pm 0,923$; M4KO: $93,32 \pm 0,866$; $n = 15$). Střední hodnota rytmu se lišila o 28,23 % (WT: $55,16 \pm 1,55$ nCi/mm²; M4KO: $39,59 \pm 0,9261$ nCi/mm²; $n = 15$). Amplituda 24hodinového rytmu byla u WT myši o 13,51 % vyšší než u myši KO (WT: $7,86 \pm 0,8948$ nCi/mm²; M4KO: $6,798 \pm 0,8281$ nCi/mm²; $n = 15$). Dominantní perioda (čtyřiačtyřhodinová) byla zaznamenána u obou typů myši pouze jedna.

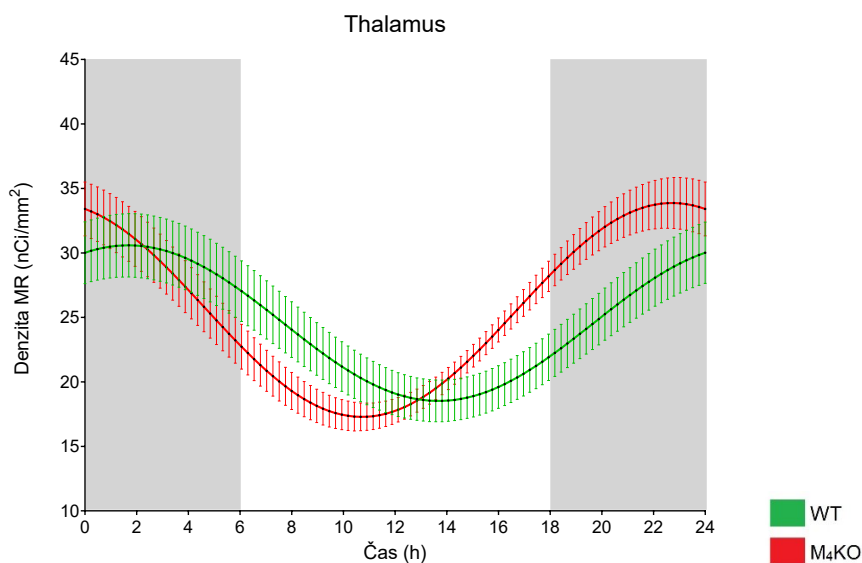
Tab. 2 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – motorický kortex):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	Amp 24
významnost	****	****	****	ns	ns	****	****
% M4KO vs. WT	28,27	29,82	26,79	8,97	1,63	28,23	13,51

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 15): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24), **** p<0,0001, ns nesignifikantní.

5.1.3 Thalamus

Oproti předchozím strukturám, v thalamu byla naměřena nejvyšší denzita MR u KO myší, a ne u myší WT (obr. 6). Maximální hodnota u WT myší byla naměřena na přelomu aktivní a inaktivní fáze v 6:00, u myší typu KO byla tato hodnota naměřena již ve 22 h (WT: $28,41 \pm 3,199$ nCi/mm², n = 10; M4KO: $31,07 \pm 2,615$ nCi/mm², n = 10). Minimální hodnoty byly v obou případech naměřeny v inaktivní fázi dne, a sice v 10:00 u KO a ve 14:00 u WT (WT: $19,14 \pm 1,266$ nCi/mm², n = 18; M4KO: $17,89 \pm 1,996$ nCi/mm², n = 16). Celková denzita MR byla v případě KO myší o 1,61 % nižší než v případě myší WT. V průběhu dne došlo u WT myší k poklesu denzity MR o 32,6 %. V případě myší KO pro MR typu 4 došlo k poklesu denzity MR v průběhu dne až o 42,4 %.



Obr. 6 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti thalamu: Denzita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 10$) v průběhu 24 hodin v thalamu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je dobře patrná jedna dominantní čtyřiašedesátihodinová perioda. Rytmičké křivky vůči sobě na rozdíl od předchozích křivek vykazují fázový posun s globálním maximem biorytmické křivky v 1,7 h v případě WT myši a ve 22,8 h v případě M₄KO myši v aktivní fázi dne (šedě). Minimálních hodnot dosahovaly křivky ve 13,6 h (WT myši) a v 10,7 h (M₄KO myši) v inaktivní fázi.

Oproti striatu a motorickému kortexu, došlo v thalamu k jistému posunu biorytmických křivek u obou typů myši (tab. 3; jednofaktorová ANOVA: $F(15, 144) = 313,6$, $p < 0,0001$). Rozdíl celkových průměrů činil v thalamu oproti předchozím strukturám pouze 2,69 %, přičemž vyšší průměrné hodnoty byly v této struktuře zjištěny u myši typu KO (WT: $24,52 \pm 1,888$ nCi/mm²; M₄KO: $25,18 \pm 1,04$ nCi/mm²; $n = 10$). Denní aritmetický průměr byl u WT myši o 7,8 % vyšší než u KO, ovšem noční průměr byl vyšší u KO myši o 12,52 % (D mean WT: $22,17 \pm 1,911$ nCi/mm²; D mean M₄KO: $20,44 \pm 1,026$ nCi/mm²; N mean WT: $26,92 \pm 2,026$ nCi/mm²; N mean M₄KO: $30,29 \pm 1,434$ nCi/mm²; $n = 10$). Rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů byl oproti WT myši u KO myši více jak dvojnásobný (WT: $-4,75 \pm 1,06$ nCi/mm²; M₄KO: $-9,854 \pm 1,192$ nCi/mm²; $n = 10$). Koeficient určenosti byl opět bez větších rozdílů (WT: $91,78 \pm 1,343$; M₄KO: $93,12 \pm 1,212$; $n = 10$). Střední hodnota rytmu se lišila o 4,15 % (WT: $24,56 \pm 1,903$ nCi/mm²; $25,58 \pm 1,177$ nCi/mm²; $n = 10$). Amplituda byla u KO myši 1,3× vyšší než u WT (WT: $6,766 \pm 0,6395$ nCi/mm²; M₄KO: $8,782 \pm 1,081$ nCi/mm²; $n = 10$). V důsledku fázového posunu byly v případě thalamu porovnány i akrofáze biorytmických křivek obou typů myši, které představují čas maxima 24hodinového rytmu. Akrofáze u KO myši byla téměř čtyřikrát vyšší než u myši WT (WT: $3,949 \pm 1,862^\circ$; M₄KO: $15,52 \pm 3,28^\circ$; $n = 10$). U obou typů myši byla pozorována pouze jedna dominantní 24hodinová perioda.

Tab. 3 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – thalamus):

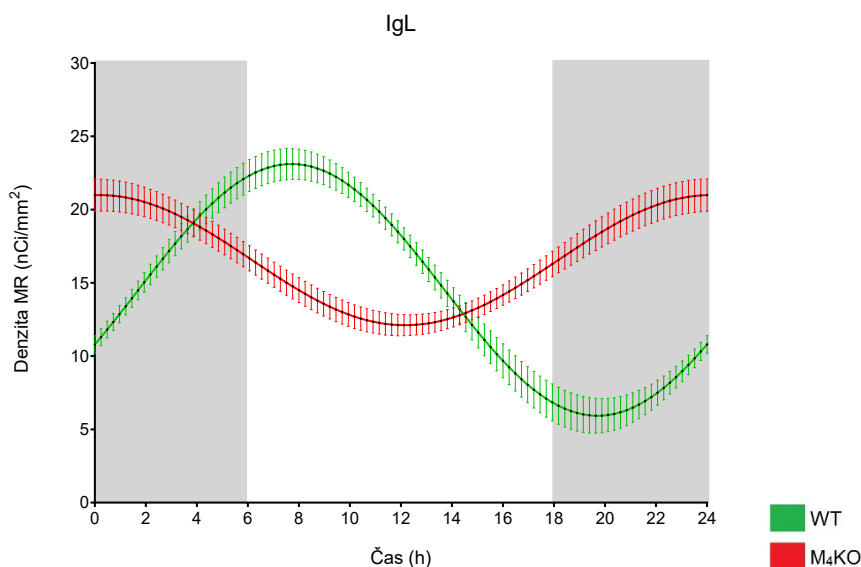
parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	Amp 24	Acro 24
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
% M₄KO vs. WT	–2,69	7,80	–12,52	–107,45	–1,46	–4,15	–29,80	–293,01

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 10): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určení rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24), akrofáze čtyřadvacetihodinového rytmu (Acro 24), **** p<0,0001, ns nesignifikantní.

5.1.4 Intergenikulární lístek

V případě intergenikulárního lístku nebyla z důvodu špatné přípravy vzorku zaznamenána denzita MR v 10:00. Tuto strukturu se nepodařilo na kryorezech zachytit u všech vzorků a nebylo tudíž možné sesbírat dostatečné množství dat k jejich analýze.

Maximální hodnoty u myší WT byly naměřeny v 6:00, u myší s vyřazenými M₄ receptory dosahovaly MR nejvyšších hodnot ve 22:00 (WT: $20,17 \pm 0,996$ nCi/mm², n = 8; M₄KO: $20,73 \pm 2,4$ nCi/mm², n = 4). Minimální hodnoty byly u WT myší zaznamenány v aktivní fázi ve 22:00, oproti tomu u KO myší byly tyto hodnoty naměřeny ve fázi inaktivní ve 14:00 (WT: $6,35 \pm 1,377$ nCi/mm², n = 6; M₄KO: $12,80 \pm 0,908$ nCi/mm², n = 4). Naměřené hodnoty denzity MR byly celkově o 42,87 % vyšší u myší KO typu než u myší běžného typu. Během 24 hodin došlo k poklesu MR z maximální naměřené hodnoty o 68,5 % (WT) a 38,3 % (M₄KO) (obr. 7).



Obr. 7 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti intergenikulárního listku: Densita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 8$) v průběhu 24 hodin v IgL myši WT (zeleně) a myši M4KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je dobře patrná jedna dominantní čtyřadvacetihodinová perioda. Rytmičké křivky vůči sobě vykazují fázový posun s globálním maximem biorytmické křivky v 7,8 h v případě WT myši v inaktivní fázi a v 0,2 h v případě M4KO myši v aktivní fázi dne (šedě). Minimálních hodnot dosahovaly křivky v 19,6 h ve fázi aktivní (WT myši) a ve 12,1 h (M4KO myši) ve fázi inaktivní.

Biorytmické křivky obou typů myši vykazují oproti sobě vzájemný posun vrcholů (maxima i minima) o 7,5 hodiny (tab. 4; jednofaktorová ANOVA: $F(18, 130) = 255,6$, $p < 0,0001$). Celkový aritmetický průměr myši typu KO byl $1,32\times$ vyšší než u myši běžného typu (WT: $13,1 \pm 0,6052$ nCi/mm²; M4KO: $17,3 \pm 0,801$ nCi/mm²; $n = 8$). Denní hodnoty u WT myši byly o $16,59\%$ vyšší než průměrné denní hodnoty myši KO (WT: $17,72 \pm 0,6802$ nCi/mm²; M4KO: $14,78 \pm 0,7408$ nCi/mm²; $n = 8$). Oproti tomu noční hodnoty u KO myši byly $1,89\times$ vyšší než hodnoty myši WT (WT: $10,02 \pm 0,7034$ nCi/mm²; M4KO: $18,98 \pm 0,9124$ nCi/mm²; $n = 8$). Rozdíl aritmetických denních a nočních průměrů byl u WT myši vyšší než u KO myši (WT: $7,703 \pm 0,6942$ nCi/mm²; M4KO: $-4,194 \pm 0,5681$ nCi/mm²; $n = 8$). Koeficient určenosti se tentokrát lišil o $8,61\%$ (WT: $95,5 \pm 1,324$; M4KO: $87,28 \pm 5,134$; $n = 8$). Střední hodnota rytmu byla u KO myši $1,14\times$ vyšší než u myši WT (WT: $14,52 \pm 0,5909$ nCi/mm²; M4KO: $16,55 \pm 0,7524$ nCi/mm²; $n = 8$). Amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu byla v případě WT myši o $46,76\%$ vyšší (WT: $8,715 \pm 0,9182$ nCi/mm²; M4KO: $4,64 \pm 0,4802$ nCi/mm²; $n = 10$). Z důvodu fázového posunu byla opět porovnána také akrofáze, která byla v případě KO myši téměř dvojnásobná oproti myším běžného typu (WT: $7,849 \pm 0,2732^\circ$; M4KO: $15,48 \pm 3,944^\circ$; $n = 8$). Dominantní čtyřadvacetihodinová perioda byla pozorována u obou typů myši.

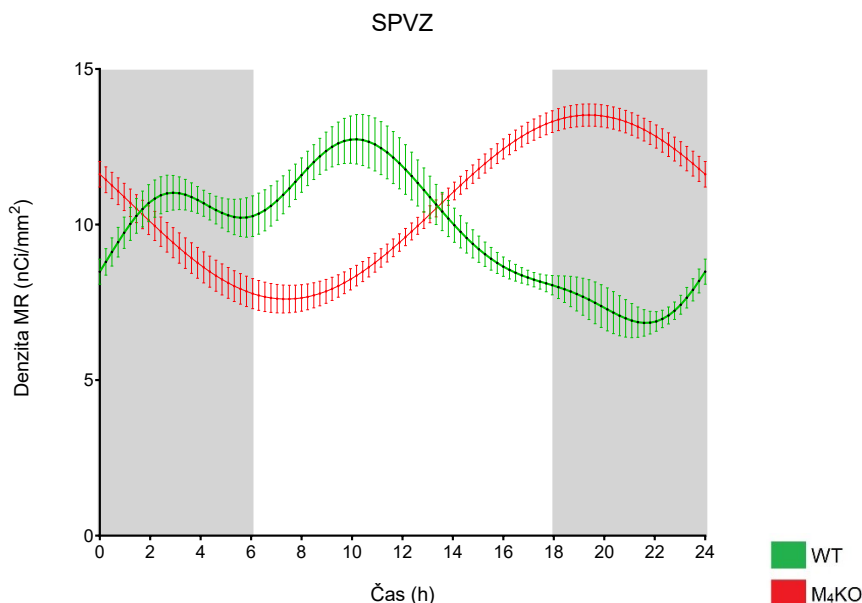
Tab. 4 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – intergenikulární listek):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	Amp 24	Acro 24
významnost	ns	ns	**	****	**	ns	ns	*
% M4KO vs. WT	–32,06	16,59	–89,42	154,45	8,61	–13,98	46,76	–97,22

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 8): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24), akrofáze čtyřadvacetihodinového rytmu (Acro 24), * p<0,05, ** p<0,01, **** p<0,0001, ns nesignifikanční.

5.1.5 Subparaventrikulární zóna

V subparaventrikulární zóně (obr. 8) byly nejvyšší hodnoty u obou typů myší naměřeny v aktivní fázi dne. U WT myší bylo maximální hodnoty dosaženo ve 2:00, u myší bez MR typu 4 v 18:00 na počátku aktivní fáze (WT: $13,64 \pm 1,313$ nCi/mm², n = 12; M4KO: $13,56 \pm 1,339$ nCi/mm², n = 8). Minimální hodnoty byly naměřeny v časech 10:00 u KO a 22:00 u WT (WT: $7,378 \pm 1,192$ nCi/mm², n = 8; M4KO: $7,998 \pm 1,146$ nCi/mm², n = 4). Celková denzita MR u KO myší byla o 3,79 % vyšší. Čtyřadvacetihodinový pokles denzity MR činil 45,9 % u WT a 41 % u KO.



Obr. 8 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti subparaventrikulární zóny: Denzita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 7$) v průběhu 24 hodin v SPVZ myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je hlavní dominující perioda 24 h, biorytmická křivka denzity u myši běžného typu ovšem vykazovala i jisté prvky 12 a 8hodinové periody. Rytmičké křivky vůči sobě vykazují fázový posun s globálním maximem biorytmické křivky v 10,2 h v případě WT myši v inaktivní fázi a v 19,4 h v případě M₄KO myši v aktivní fázi dne (šedě). Minimálních hodnot dosahovaly křivky ve 21,6 h ve fázi aktivní (WT myši) a v 7,3 h (M₄KO myši) ve fázi inaktivní.

V SPVZ došlo k fázovému posunu biorytmických křivek (tab. 5; jednofaktorová ANOVA: $F(23, 144) = 123,3$, $p < 0,0001$). Doba, na kterou připadá maximální hodnota denzity MR u WT myši, se liší o 9,2 hodin od doby maximální hodnoty KO myši, doba dosažení minimálních hodnot se liší o 9,7 hodin. U WT myši je oproti KO myším možno pozorovat ještě dvě lokální maxima, a to v časech 2,9 a 18,9 h od počátku dne. Celkové aritmetické průměry WT a KO myši se příliš nelišily (WT: $9,778 \pm 0,3491$ nCi/mm²; M₄KO: $10,56 \pm 0,3324$ nCi/mm²; $n = 7$). Denní průměrné hodnoty byly u WT myši o 14,98 % vyšší než u myši KO, oproti tomu noční průměrné hodnoty byly 1,36× vyšší u KO myši než u WT myši (D mean WT: $10,78 \pm 0,5131$ nCi/mm²; D mean M₄KO: $9,165 \pm 0,3513$ nCi/mm²; N mean WT: $8,783 \pm 0,2971$ nCi/mm²; N mean M₄KO: $11,96 \pm 0,3308$ nCi/mm²; $n = 7$). Rozdíl denních a nočních hodnot se příliš nelišil (WT: $1,993 \pm 0,4649$ nCi/mm²; M₄KO: $-2,797 \pm 0,1546$ nCi/mm²; $n = 7$). Koefficient určenosti byl přibližně stejný u obou typů myši (WT: $82,47 \pm 8,395$; M₄KO: $82,84 \pm 4,703$; $n = 7$). Střední hodnota rytmu byla u KO myši mírně vyšší (WT: $9,778 \pm 0,3491$ nCi/mm²; M₄KO: $10,56 \pm 0,3324$ nCi/mm²; $n = 7$). Amplituda byla u KO myši 1,25× vyšší než u myši běžného typu (WT: $2,4 \pm 0,2783$ nCi/mm²; M₄KO: $2,989 \pm 0,2274$ nCi/mm²; $n = 7$). Akrofáze

24hodinového rytmu byla u KO myši 2,3× vyšší než u WT (WT: $8,479 \pm 0,2905^\circ$; M4KO: $19,46 \pm 0,2311^\circ$; $n = 7$). U obou typů myši byla dominantní perioda o délce 24 hodin.

Tab. 5 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – subparaventrikulární zóna):

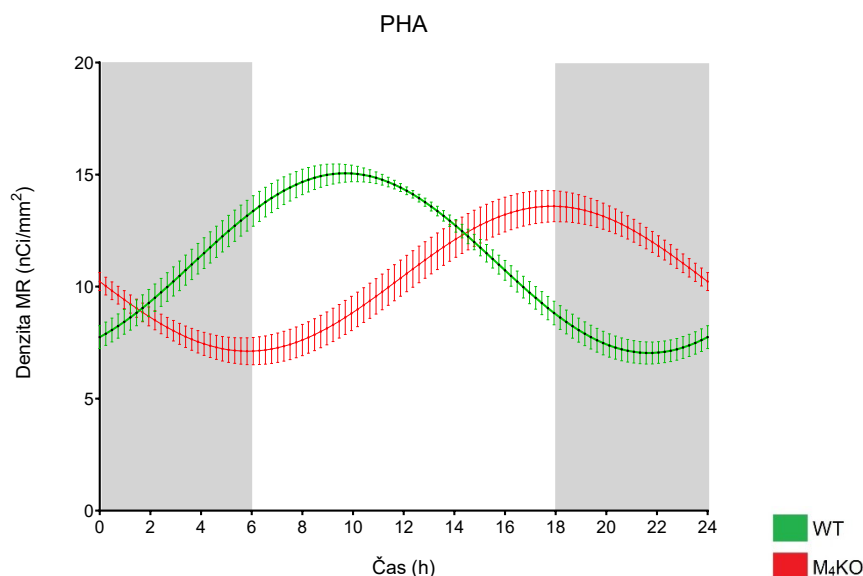
parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	Amp 24	Acro 24
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
% M4KO vs. WT	–8,00	14,98	–36,17	240,34	–0,45	–8,00	–24,54	–129,51

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic ($n = 7$): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), amplituda čtyřadvacetihodinového rytmu (Amp 24), akrofáze čtyřadvacetihodinového rytmu (Acro 24), ** $p < 0,01$, ns nesignifikantní.

5.1.6 Posteriorní hypotalamická oblast

V případě posteriorní hypotalamické oblasti nebyla z důvodu špatné přípravy vzorku zaznamenána denzita MR v 10:00. Tuto strukturu se nepodařilo na kryořezech zachytit u všech vzorků a nebylo tudíž možné sesbírat dostatečné množství dat k jejich analýze.

Maximální denzita MR byla v PHA naměřena u WT myši v inaktivní fázi ve 14:00 h, u KO myši byla opět naměřena ve fázi aktivní ve 2:00 h (WT: $25,07 \pm 3,389$ nCi/mm², $n = 6$; M4KO: $25,78 \pm 1,417$ nCi/mm², $n = 8$). Minima byla naměřena ve 14:00 u KO myši a v 6:00 u myši WT (WT: $12,31 \pm 0,836$ nCi/mm², $n = 8$; M4KO: $20,52 \pm 1,091$ nCi/mm², $n = 4$). Celkově naměřené hodnoty byly u myši M4KO o 7,36 % vyšší. V průběhu 24 hodin poklesla denzita MR u WT myši o 50,9 %, u KO myši byl tento rozdíl nižší, a sice o 20,4 % (obr. 9).



Obr. 9 Cirkadiánní rytmus MR v oblasti posteriorního hypotalamu: Denzita muskarinových receptorů (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 9$) v průběhu 24 hodin v PHA myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. U obou typů myši je dobře patrná jedna dominantní čtyřadvacetihodinová perioda. Rytmičké křivky vůči sobě vykazují fázový posun s globálním maximem biorytmické křivky v 9,7 h v případě WT myši a v 17,9 h v případě M₄KO myši v inaktivní fázi dne. Minimálních hodnot dosahovaly křivky ve 21,6 h (WT myši) a v 5,8 h (M₄KO myši) v aktivní fázi dne (šedě).

Biorytmická křivka MR u M₄KO myši vykazuje oproti křivce WT myši posun v maximálních dosažených hodnotách o 8,24 hodin (tab. 6; jednofaktorová ANOVA: $F(23, 144) = 123,3$, $p < 0,0001$). Posun minimálních hodnot biorytmických fitovaných křivek je totožný. Celkový aritmetický průměr byl u WT myši přibližně o 6,33 % vyšší než u myši bez M₄ MR (WT: $11,05 \pm 0,2915$ nCi/mm²; M₄KO: $10,35 \pm 0,5758$ nCi/mm²; $n = 9$). Stejně tak denní aritmetický průměr byl vyšší u myši běžného typu, a sice o 32,5 % (WT: $13,48 \pm 0,2683$ nCi/mm²; M₄KO: $9,099 \pm 0,6766$ nCi/mm²; $n = 9$). Noční aritmetický průměr byl 1,34× vyšší u myši typu KO (WT: $8,62 \pm 0,4571$ nCi/mm²; M₄KO: $11,61 \pm 0,5119$ nCi/mm²; $n = 9$). Rozdíl aritmetických průměrů se lišil podobně jako u předchozích struktur (WT: $4,859 \pm 0,4711$ nCi/mm²; M₄KO: $-2,509 \pm 0,3366$ nCi/mm²; $n = 9$). Koeficient určenosti se opět příliš nelišil (WT: $82,62 \pm 4,837$; M₄KO: $83,73 \pm 3,658$; $n = 9$). Střední hodnota rytmu byla u WT myši o 6,33 % vyšší než u KO myši (WT: $11,05 \pm 0,2915$ nCi/mm²; M₄KO: $10,35 \pm 0,5758$ nCi/mm²; $n = 9$). Čas maximální hodnoty byl u KO myši téměř dvojnásobný (WT: $9,824 \pm 0,5328$ h; M₄KO: $17,92 \pm 0,3392$ h; $n = 9$). U obou typů myši byla zjištěna pouze jedna dominantní 24hodinová perioda.

Tab. 6 Statistická významnost chronobiologických parametrů (MR – posteriorní hypotalamická oblast):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor	t Peak
významnost	ns	ns	ns	**	ns	ns	**
% M4KO vs. WT	6,33	32,50	–34,69	151,64	–1,34	6,33	–82,41

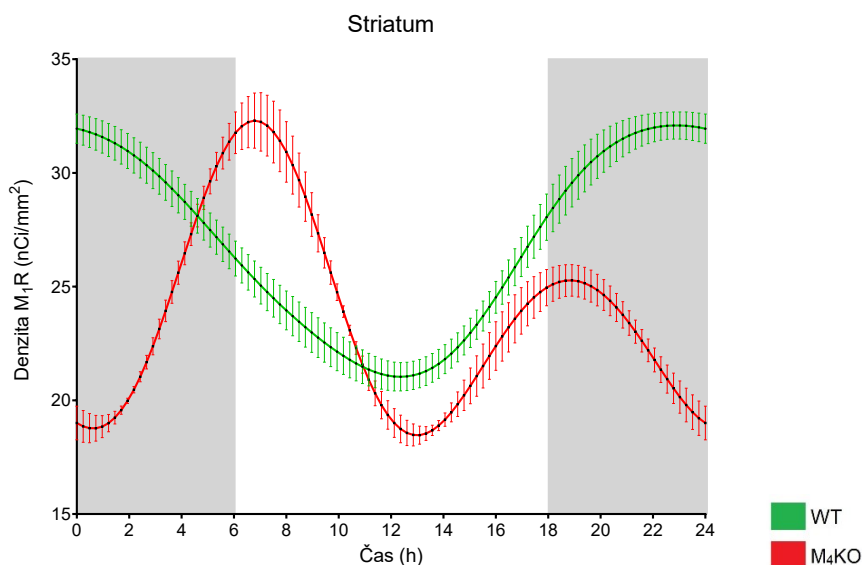
Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 9): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), čas maximální hodnoty (t Peak), ** p<0,01, ns nesignifikanční.

5.2 Muskarinové receptory typu 1

V oblasti striata a motorického kortexu byla měřena denzita muskarinových receptorů typu 1 značených [^3H]-pirenzepinem v průběhu 24 hodin. Dále bylo pozorováno, jak se tato denzita mění v případě absence muskarinových receptorů typu 4. Hlavními porovnávanými chronobiologickými parametry byly celkový aritmetický průměr všech naměřených hodnot (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean) a rozdíl aritmetických průměrů (D–N mean). Hodnoty jsou uvedeny jako průměrná naměřená hodnota $\pm$ S.E.M.

5.2.1 Striatum

Denzita M_1 MR (viz obr. 10) dosahovala maximálních hodnot v aktivní (temné) fázi ve 22:00 v případě myši běžného typu. U myši s vyřazenými M_4 receptory dosahovala denzita maximálních hodnot v 6:00 na přelomu aktivní a inaktivní (světelné) fáze dne (WT: $32,9 \pm 1,863$ nCi/mm ^{2} , n = 12; M_4 KO: $31,06 \pm 1,478$ nCi/mm ^{2} , n = 12). Oproti tomu minimální hodnoty byly zaznamenány u obou typů myši ve 14:00 (WT: $21,34 \pm 0,459$ nCi/mm ^{2} , n = 36; M_4 KO: $18,46 \pm 0,665$ nCi/mm ^{2} , n = 24). Celkové naměřené hodnoty KO myši byly o 13,3 % nižší než hodnoty WT myši. Během 24 hodin došlo k poklesu M_1 MR z maximální naměřené hodnoty o 35,1 % (WT) a o 40,6 % (KO).



Obr. 10 Cirkadiánní rytmus M_1 MR v oblasti striata: Densita muskarinových receptorů typu 1 (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 7$) v průběhu 24 hodin ve striatu myši WT (zeleně) a myši M_4 KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Oproti WT myším kmitá biorytmická křivka u M_4 KO myši v ultradiánním rytmu nikoliv se čtyřiačtyřiceti, ale s dvanáctihodinovou periodou. Maximálních hodnot křivky dosáhly ve 23,0 h (WT) v aktivní fázi (šedě) a v 6,8 h (M_4 KO, globální maximum) ve fázi inaktivní. Minimálních hodnot bylo dosaženo u myši běžného typu ve 12,4 h a u myši typu M_4 KO nastalo globální minimum ve 12,8 h v inaktivní fázi.

Oproti WT myším vykazují biorytmické křivky KO myši dvě lokální maxima. Globální maximum u KO myši nastalo o 16 hodin dříve oproti maximu u WT myši (tab. 7; jednofaktorová ANOVA: $F(7, 84) = 361,3$, $p < 0,0001$). Dalšího maxima dosáhla biorytmická křivka KO myši za 12,1 hodiny. Celkový aritmetický průměr byl u myši s vyřazenými M_4 receptory $1,47\times$ vyšší než u myši běžného typu (WT: $26,87 \pm 0,6731$ nCi/mm²; M_4 KO: $39,59 \pm 1,163$ nCi/mm²; $n = 7$). Denní aritmetický průměr byl $1,56\times$ vyšší u KO myši, noční průměr byl vyšší $1,41\times$ (D mean WT: $23,19 \pm 0,6807$ nCi/mm²; D mean M_4 KO: $36,32 \pm 1,005$ nCi/mm²; N mean WT: $30,55 \pm 0,6897$ nCi/mm²; N mean M_4 KO: $42,97 \pm 1,353$ nCi/mm²; $n = 7$). Rozdíl aritmetických průměrů denních a nočních hodnot byl přibližně stejný (WT: $-7,365 \pm 0,2562$ nCi/mm²; M_4 KO: $-6,646 \pm 0,5382$ nCi/mm²; $n = 7$).

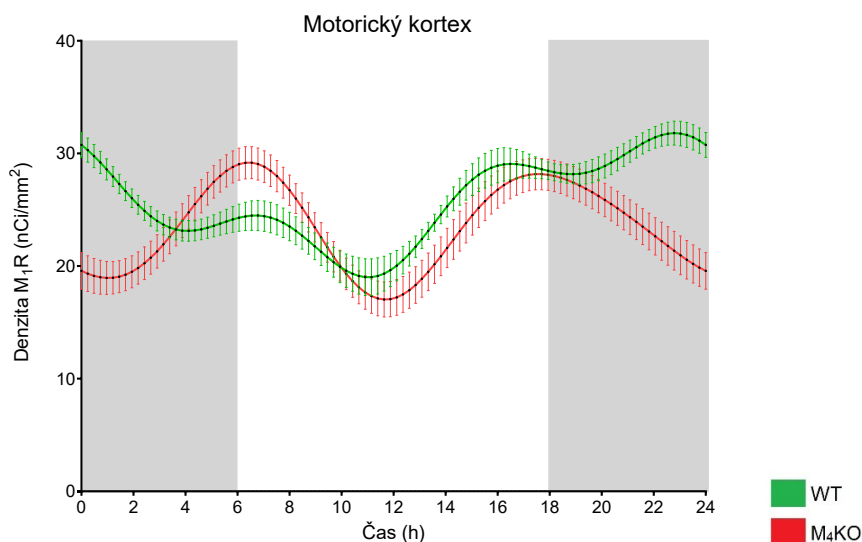
Tab. 7 Statistická významnost chronobiologických parametrů (*M₁ MR – striatum*):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean
významnost	****	****	****	ns
% M₄KO vs. WT	–47,34	–56,62	–40,65	9,76

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 7): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), **** p<0,0001, ns nesignifikantní.

5.2.2 Motorický kortex

V motorickém kortexu (obr. 11) byly průměrné maximální hodnoty denzity u myší WT naměřeny stejně jako ve striatu ve 22:00. Stejně tak i v případě myší M₄KO byla maximální hodnota naměřena na přelomu aktivní a inaktivní fáze v 6:00 jako ve striatu (WT: $29,66 \pm 1,429$ nCi/mm², n = 17; M₄KO: $27,5 \pm 1,096$ nCi/mm², n = 12). Minimální průměrná hodnota byla u obou typů myší naměřena v inaktivní fázi dne v 10:00 (WT: $16,3 \pm 2,724$ nCi/mm², n = 14; M₄KO: $17,84 \pm 2,698$ nCi/mm², n = 18). Naměřené hodnoty byly o 11,02 % nižší u myších KO. Rozdíly denzity M₁ MR v průběhu dne činí 45 % u WT myší a 35,1 % u KO myší.



Obr. 11 Cirkadiánní rytmus M_1 MR v oblasti motorického kortexu: Denzita muskarinových receptorů typu 1 (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 15$) v průběhu 24 hodin v motorickém kortexu myši WT (zeleně) a myši M_4 KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace s periodou přibližně 8 hodin v případě WT myši a přibližně 12 h v případě myši M_4 KO typu. Globálně maximálních hodnot křivky dosáhly ve 22,8 h (WT) v aktivní fázi (šedě) a v 6,5 h (M_4 KO) ve fázi inaktivní. Globálně minimálních hodnot bylo dosaženo u myši běžného typu v 11,2 h a u myši typu M_4 KO v 11,6 h v inaktivní fázi.

U biorytmických křivek obou myši bylo zaznamenáno více než jedno lokální maximum (tab. 8; jednofaktorová ANOVA: $F(15, 224) = 444,5$, $p < 0,0001$). U WT myši byla lokální minima zaznamenána přibližně po osmi hodinách v časech 6,8, 16,5 a 22,8 h (globální maximum). Biorytmická křivka KO myši vykazovala pouze dvě maxima, a to s rozdílem přibližně 11 hodin. Celkový aritmetický průměr byl u myši běžného typu o 28,27 % vyšší než u myši bez M_4 MR (WT: $55,12 \pm 1,511$ nCi/mm²; M_4 KO: $39,54 \pm 0,9177$ nCi/mm²; $n = 15$). Denní aritmetický průměr byl u WT myši o 29,82 % vyšší než u KO myši, průměr nočních hodnot byl vyšší o 26,79 % (D mean WT: $50,77 \pm 1,888$ nCi/mm²; D mean M_4 KO: $35,63 \pm 0,9099$ nCi/mm²; N mean WT: $59,42 \pm 1,41$ nCi/mm²; N mean M_4 KO: $43,5 \pm 1,196$ nCi/mm²; $n = 15$). Rozdíl aritmetických průměrů denních a nočních hodnot se lišil o 8,97 % (WT: $-8,648 \pm 1,139$ nCi/mm²; M_4 KO: $-7,872 \pm 1,055$ nCi/mm²; $n = 15$).

Tab. 8 Statistická významnost chronobiologických parametrů (M_1 MR – motorický kortex):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean
významnost	****	****	****	ns
% M4KO vs. WT	28,27	29,82	26,79	8,97

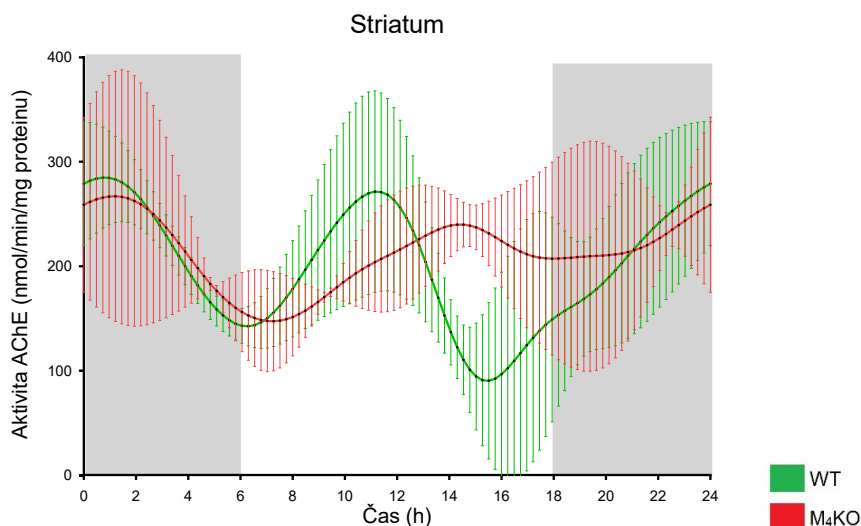
Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 15): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), **** p<0,0001, ns nesignifikantní.

5.3 Acetylcholinesterázy

Aktivita acetylcholinesteráz byla měřena ve striatu, motorickém kortexu a thalamu. Změny spektrofotometricky naměřené aktivity v průběhu 24hodinového intervalu byly pozorovány u myší běžného a M4KO typu. Hlavními porovnávanými chronobiologickými parametry byly celkový aritmetický průměr všech naměřených hodnot (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl aritmetických průměrů (D–N mean) koeficient určenosti (procento variace v datech, které je vysvětlitelné modelem fitování, %Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P lengths), dominující délka periody (Domnt PL), čas nejvyšší hodnoty z fitované křivky (t Peak) a amplituda 24hodinového, 12hodinového a 8hodinového rytmu (Amp 24/12/8). Hodnoty jsou uvedeny jako průměrná naměřená hodnota $\pm$ S.E.M.

5.3.1 Striatum

Maximálních hodnot aktivity AChE bylo u obou typů myší dosaženo ve 2:00 v aktivní (temné) fázi dne (WT: $268,9 \pm 29,95$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$; M4KO: $262,9 \pm 122,3$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). Minimální průměrné hodnoty byly naměřeny u WT myší ve 14:00 v inaktivní (světelné) fázi dne ($129,8 \pm 31,51$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). U myší typu KO byly minimální hodnoty zaznamenány na přelomu aktivní a inaktivní fáze v 6:00 ($158,4 \pm 37,58$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). Průměrné naměřené hodnoty byly u M4KO myší přibližně o 13,19 % vyšší než u myší WT. Během 24 hodin se maximální a minimální hodnoty aktivity lišily u WT myší o 51,7 %, u KO myší o 39,8 % (viz obr. 12).



Obr. 12 Cirkadiánní rytmus AChE v oblasti striata: Aktivita AChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin ve striatu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace s periodou přibližně 12 hodin. Maximální aktivity AChE biorytmické křivky vykazují přibližně uprostřed fází, minimálních aktivit oproti tomu dosahují kolem 6 a 18 h, tedy na přelomu inaktivní a aktivní (šedě) fáze dne.

Aktivita AChE ve striatu (tab. 9; jednofaktorová ANOVA: $F(43, 64) = 12,66$, $p < 0,0001$) se u obou typů myši v průběhu 24 hodin příliš nelišila. Celkový aritmetický průměr byl u obou typů myši přibližně stejný (WT: $212,6 \pm 40,64$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $210,4 \pm 6,824$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní průměr WT myši byl $1,08\times$ vyšší než denní průměr KO myši, oproti tomu noční průměr byl $1,03\times$ vyšší u KO myši než u WT myši (D mean WT: $202,3 \pm 54,45$ nmol/min/mg proteinu; D mean M₄KO: $188,1 \pm 8,229$ nmol/min/mg proteinu; N mean WT: $220,3 \pm 41,64$ nmol/min/mg proteinu; N mean M₄KO: $227,1 \pm 6,54$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Rozdíl denních a nočních průměrů byl u KO myši více jak dvojnásobný (WT: $-18,05 \pm 49,9$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $-39 \pm 5,302$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficienty určenosti byly u obou typů myši přibližně stejné (WT: $99,66 \pm 0,1129$; M₄KO: $99,71 \pm 0,039$; $n = 3$). Střední hodnota rytmu byla u KO myši o 6 % vyšší než u myši WT (WT: $199,3 \pm 27,51$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $212,1 \pm 5,836$ nmol/min/mg proteinu; $n = 6$). Počet period byl o 15,37 % vyšší u WT myši než u KO (WT: $4,333 \pm 0,8819$; M₄KO: $3,667 \pm 1,202$; $n = 3$), dominující délka periody se u obou typů lišila (WT: 16 ± 4 h; M₄KO: 20 ± 4 h; $n = 6$). Amplitudy se příliš nelišily s výjimkou amplitud 8hodinového rytmu (Amp 24 WT: $65,28 \pm 15,04$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $67,49 \pm 11,56$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $98,47 \pm 46,51$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 M₄KO: $97,38 \pm 49,88$

nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $40,16 \pm 14,65$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $29,8 \pm 7,81$ nmol/min/mg proteinu; n = 3).

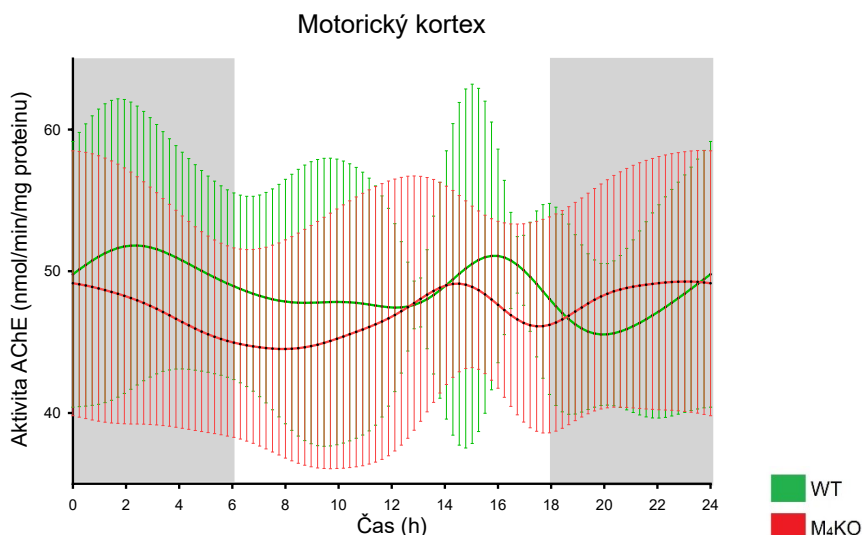
Tab. 9 Statistická významnost chronobiologických parametrů (AChE – striatum):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	1,03	7,02	–3,09	–116,07	–0,05	–6,42
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	15,37	–25,00	–0,30	–3,39	1,12	25,80

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), ns nesignifikanční.

5.3.2 Motorický kortex

Aktivita AChE v motorickém kortexu (obr. 13) dosahovala maximálních hodnot u WT myši v aktivní fázi dne v čase 2:00. U KO myši byla maximální průměrná hodnota aktivity zaznamenána naopak o půl dne déle ve 14:00 (WT: $51,79 \pm 10,20$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $49,45 \pm 6,684$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Minimálních průměrných hodnot bylo dosaženo v čase 22:00 u WT myši a v 6:00 u myši s vyřazenými M₄ MR (WT: $47,12 \pm 7,129$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $45,03 \pm 6,715$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Naměřené hodnoty byly u KO o 2,88 % nižší než u WT myši. Maximální a minimální průměrné hodnoty se během dne lišily o 9,02 % u WT myši a pouze o 4,7 % u myši KO.



Obr. 13 Cirkadiánní rytmus AChE v oblasti motorického kortexu: Aktivita AChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin v motorickém kortexu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace se dvěma lokálními maximy a minimy. Maximální aktivity AChE biorytmické křivky vykazují přibližně ve druhé polovině fází, nižších hodnot aktivity oproti tomu dosahují na přelomu fází (aktivní fáze šedě).

Průměrná aktivita AChE (tab. 10; jednofaktorová ANOVA: $F(43, 84) = 41,12$, $p < 0,0001$) byla u WT myši o 2,95 % vyšší než u myši bez M₄ MR (WT: $48,51 \pm 6,618$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $47,08 \pm 8,264$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní aritmetický průměr byl u WT vyšší o 4,33 %, noční pouze o 1,92 % (D mean WT: $48,06 \pm 5,262$ nmol/min/mg proteinu; D mean M₄KO: $45,98 \pm 8,222$ nmol/min/mg proteinu; N mean WT: $48,85 \pm 7,693$ nmol/min/mg proteinu; N mean M₄KO: $47,91 \pm 8,334$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní a noční hodnoty se u obou typů myši příliš nelišily (WT: $-0,7872 \pm 2,774$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $-1,928 \pm 1,222$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficient určenosti rytmu se u obou typů myši taktéž příliš nelišil (WT: $99,53 \pm 0,0964$; M₄KO: $99,69 \pm 0,1622$; $n = 3$). Střední hodnota rytmu byla u WT myši o 3,3 % vyšší (WT: $48,76 \pm 5,018$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $47,15 \pm 7,98$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Počet period byl vyšší u WT myši (WT: 6 ± 0 ; M₄KO: $5,33 \pm 0,33$; $n = 3$), dominující délka periody byla u obou typů myši stejná (WT i M₄KO: $14,67 \pm 4,807$ h; $n = 3$), čas nejvyšší hodnoty byl trojnásobný u KO myši (WT: $6,107 \pm 4,537$ h; M₄KO: $18,63 \pm 2,558$ h; $n = 3$). Amplitudy se lišily až o 76,03 % (Amp 24 WT: $7,867 \pm 2,74$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $1,886 \pm 0,6159$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $5,813 \pm 2,117$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 M₄KO: $2,461 \pm 1,101$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $5,3 \pm 1,669$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $1,276 \pm 0,3038$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$).

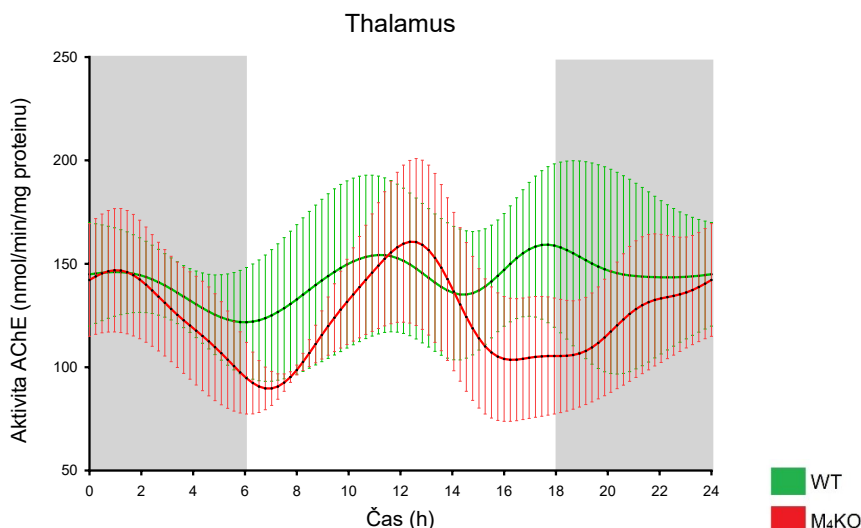
Tab. 10 Statistická významnost chronobiologických parametrů (AChE – motorický kortex):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M4KO vs. WT	2,95	4,33	1,92	–144,92	–0,16	3,30
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M4KO vs. WT	11,12	0,00	–205,06	76,03	57,66	75,92

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), ns nesignifikantní.

5.3.3 Thalamus

V thalamu byla maximální průměrná hodnota naměřena v časech 18:00 (WT myši) a 10:00 (KO myši) (WT: $161,6 \pm 41,13$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M4KO: $143,7 \pm 28,7$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Minimálních průměrných hodnot bylo u obou myší dosaženo na přelomu inaktivní a aktivní fáze v 6:00 (WT: $123,2 \pm 26,93$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; KO: $84,76 \pm 11,79$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Naměřená aktivita AChE u KO myši byla o 14,33 % nižší než aktivita u myši běžného typu. Během 24 hodin se aktivita AChE lišila o 23,8 % u WT a o 41 % u KO myši.



Obr. 14 Cirkadiánní rytmus AChE v oblasti thalamu: Aktivita AChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin v thalamu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace. Maximálních hodnot bylo v případě myši běžného typu dosaženo v časech 1,0, 11,2 a 17,7 h, minimálních v čase 6,1, 14,5 a 22,3 h. V případě myši s vyřazenými M₄ receptory nastaly maximální hodnoty aktivity AChE v 1,0 a 12,4 h, minimální v 7,0 a 16,2 h. Aktivní fáze je vyznačena šedě.

Průměrná aktivita AChE v thalamu (tab. 11; jednofaktorová ANOVA: $F(43, 72) = 12,55$, $p < 0,0001$) dosahovala o 12,26 % vyšších hodnot u WT myši než u myši typu KO (WT: $143,6 \pm 32,13$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $126 \pm 23,69$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní průměr byl u WT myši vyšší o 9,47 % (WT: $139,4 \pm 33,91$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $126,2 \pm 20,3$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$), noční o 14,24 % (WT: $146,8 \pm 30,96$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $125,9 \pm 26,4$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů byl vyšší u myši WT (WT: $-7,392 \pm 6,079$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,3336 \pm 7,473$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficienty určenosti rytmu byly přibližně stejné (WT: $98,51 \pm 1,146$; M₄KO: $99,01 \pm 0,855$; $n = 3$). Střední hodnota rytmu byla u myši běžného typu o 13,13 % vyšší (WT: $142,4 \pm 29,96$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $123,7 \pm 24,5$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Počet period byl vyšší u KO myši (WT: 4 ± 1 ; M₄KO: $5,333 \pm 0,6667$; $n = 3$), dominující délka periody se příliš nelišila (WT: $14,67 \pm 4,807$ h; M₄KO: 16 ± 4 h; $n = 3$). Čas nejvyšší hodnoty byl 1,35× vyšší u WT myši než u KO myši (WT: $12,59 \pm 5,802$ h; M₄KO: $9,298 \pm 3,143$ h; $n = 3$). Mezi amplitudami byl zaznamenán rozdíl až o 28,06 % (Amp 24 WT: $16,31 \pm 6,488$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $16,08 \pm 2,81$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $22,42 \pm 5,23$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 M₄KO: $28,71 \pm 9,599$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $9,887 \pm 2,929$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $11,5 \pm 4,216$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$).

Tab. 11 Statistická významnost chronobiologických parametrů (AChE – thalamus):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M4KO vs. WT	12,26	9,47	14,24	104,53	–0,51	13,13
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M4KO vs. WT	–33,33	–9,07	26,15	1,41	–28,06	–16,31

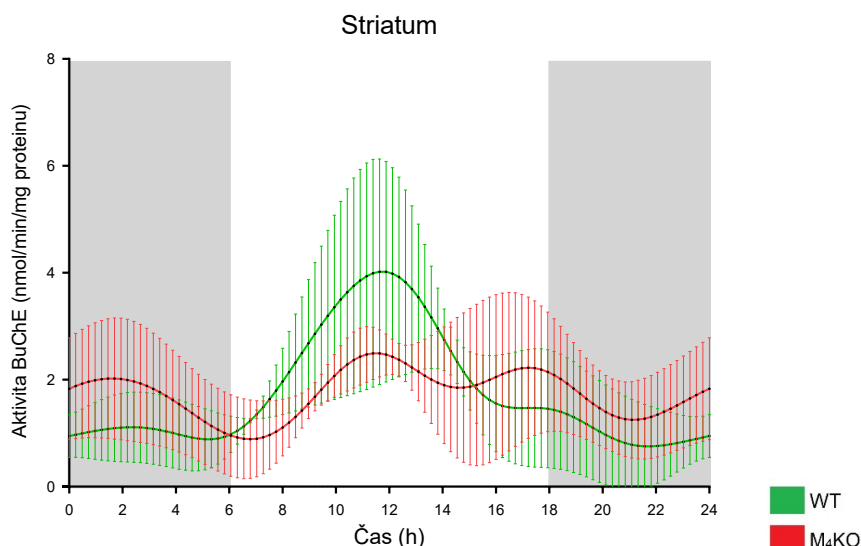
Porovnání biorytmických parametrů u WT a M4KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), ns nesignifikantní.

5.4 Butyrylcholinesterázy

Aktivita butyrylcholinesteráz byla měřena ve striatu, motorickém kortexu a thalamu. Změny spektrofotometricky naměřené aktivity v průběhu 24hodinového intervalu byly pozorovány u myší běžného a M4KO typu. Hlavními porovnávanými chronobiologickými parametry byly celkový aritmetický průměr všech naměřených hodnot (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl aritmetických průměrů (D–N mean) koeficient určenosti (procento variace v datech, které je vysvětlitelné modelem fitování, %Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P lengths), dominující délka periody (Domnt PL), čas nejvyšší hodnoty z fitované křivky (t Peak) a amplituda 24hodinového, 12hodinového a 8hodinového rytmu (Amp 24/12/8). Hodnoty jsou uvedeny jako průměrná naměřená hodnota $\pm$ S.E.M.

5.4.1 Striatum

V oblasti striata byly maximální průměrné hodnoty aktivity BuChE naměřeny u WT myší v 10:00 v inaktivní (světelné) fázi dne ($3,417 \pm 1,790$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). U myší typu KO byly maximální hodnoty zaznamenány ve 2:00 v aktivní (temné) fázi ($3,035 \pm 0,803$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). Minimálních hodnot aktivity BuChE bylo u obou typů myší dosaženo v 6:00 na přelomu aktivní a inaktivní fáze dne (WT: $0,945 \pm 0,412$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$; M4KO: $1,6 \pm 0,973$ nmol/min/mg proteinu, $n = 3$). Celkové hodnoty aktivity byly u KO myší o 19,10 % vyšší než u myší WT. V průběhu 24 hodin se aktivita BuChE u WT myší lišila o 72,34 %, u KO myší o 52,71 % (viz obr. 15).



Obr. 15 Cirkadiánní rytmus BuChE v oblasti striata: Aktivita BuChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin ve striatu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace s výrazným maximem uprostřed inaktivní fáze dne a kolem 12 hodiny a druhým lokálním maximem kolem 2 h ve fázi aktivní (šedě). K výraznému poklesu aktivity BuChE došlo na přelomu inaktivní a aktivní fáze kolem 6 hodiny, dalšího výraznějšího minima bylo dosaženo ve 21,8 h (WT) a ve 21,0 h (M₄KO).

Aktivita BuChE ve striatu (tab. 12; jednofaktorová ANOVA: $F(41, 70) = 146,6$, $p < 0,0001$) byla o 3,19 % vyšší u myši běžného typu než u myši s vyřazeným muskarinovým receptorem typu 4 (WT: $1,754 \pm 0,3379$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $1,698 \pm 0,524$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní průměrné hodnoty byly u WT myši o 36,68 % vyšší (WT: $2,737 \pm 1,042$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $1,733 \pm 0,1376$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Oproti tomu noční průměrné hodnoty byly u KO myši 1,64× vyšší než hodnoty WT (WT: $1,017 \pm 0,5016$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $1,672 \pm 0,8157$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Aritmetické průměrné denní a noční hodnoty se u obou typů myši příliš nelišily (WT: $1,72 \pm 1,422$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,0611 \pm 0,6815$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficienty určenosti byly pro rytmy obou typů myši velmi podobné (WT: $99,78 \pm 0,1334$; M₄KO: $97,27 \pm 1,213$; $n = 3$). Střední hodnoty rytmu byly u obou typů myši téměř identické (WT: $1,744 \pm 0,3522$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $1,741 \pm 0,579$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Oproti tomu se myši WT a KO lišily v počtu period rytmu (WT: $5 \pm 0,5774$; M₄KO: $3,66 \pm 0,333$; $n = 3$) a dominující délce periody (WT: 20 ± 4 h; M₄KO: 24 ± 0 h; $n = 3$). Čas nejvyšší hodnoty byl pro oba typy myši velmi podobný (WT: $10,6 \pm 4,278$ h; M₄KO: $9,791 \pm 4,177$ h; $n = 3$). Amplitudy rytmů se lišily až o 29,95 % (Amp 24 WT: $1,713 \pm 0,7247$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $1,2 \pm 0,1869$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $0,964 \pm 0,5272$

nmol/min/mg proteinu; Amp 12 M₄KO: $0,7084 \pm 0,1822$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $0,5345 \pm 0,3645$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $0,4277 \pm 0,1677$ nmol/min/mg proteinu; n = 3).

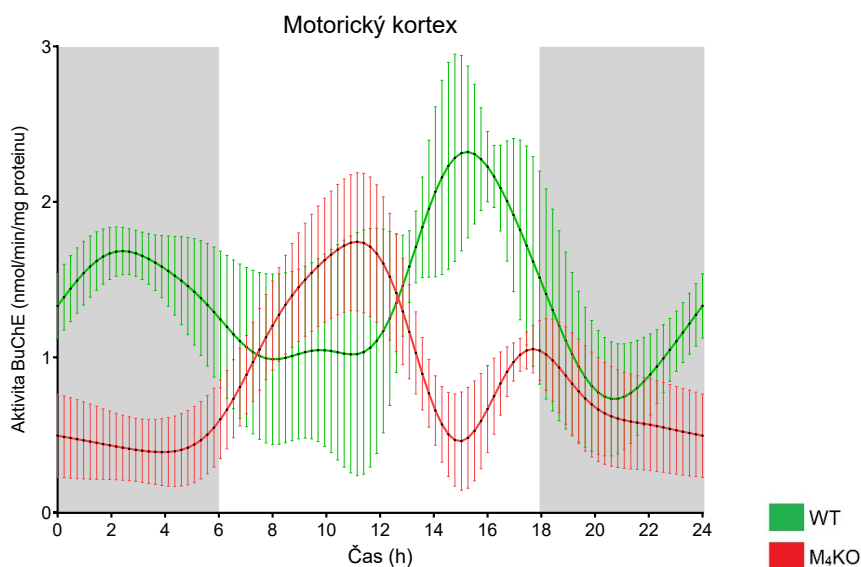
Tab. 12 Statistická významnost chronobiologických parametrů (BuChE – striatum):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	3,19	36,68	–64,41	96,44	2,52	0,17
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	26,66	–20,00	7,63	29,95	26,51	19,98

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), ns nesignifikantní.

5.4.2 Motorický kortex

V motorickém kortexu byla zaznamenána nejvyšší hodnota aktivity BuChE v 10:00 v inaktivní fázi dne u obou typů myší (WT: $2,094 \pm 0,519$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $1,67 \pm 0,410$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Oproti tomu minimálních hodnot dosáhla aktivita BuChE v 18:00 u myší typu WT a v 6:00 u myší typu KO (WT: $0,872 \pm 0,253$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $0,618 \pm 0,248$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Naměřené hodnoty aktivity byly u KO myší o 38,91 % nižší. Maximální a minimální průměrné hodnoty se během dne lišily o 58,4 % u WT myší a o 63 % u myší KO (viz obr. 16).



Obr. 16 Cirkadiánní rytmus BuChE v oblasti motorického kortexu: Aktivita BuChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin v motorickém kortexu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Obě biorytmické křivky vykazují ultradiánní oscilace s globálními maximy v inaktivní fázi dne. Maximálních hodnot dosáhly biorytmické křivky WT myši ve 2,4 a 15,3 h. Minimální hodnoty připadaly na 8,0 a 20,6 h (aktivní fáze dne, šedě). V případě myši s vyřazenými M₄ receptory nastaly maximální hodnoty aktivity v 11,2 a 17,7 hodin, minimální hodnoty ve 3,9 a 15,0 hodin.

Průměrné denní a noční hodnoty aktivity BuChE v motorickém kortexu (tab. 13; jednofaktorová ANOVA: $F(43, 84) = 478,8$, $p < 0,0001$) byly u myši běžného typu o 32,01 % vyšší než u myši KO (WT: $1,257 \pm 0,229$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,8546 \pm 0,2706$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní aritmetické průměry byly u obou typů myši přibližně stejné (WT: $1,236 \pm 0,3378$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $1,226 \pm 0,2961$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$), oproti tomu noční aritmetický průměr byl u WT myši o 54,80 % vyšší než u KO myši (WT: $1,274 \pm 0,1499$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,5758 \pm 0,2522$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů byl vyšší u M₄KO myši (WT: $-0,0383 \pm 0,1945$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,6505 \pm 0,0538$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficienty určenosti rytmů byly přibližně stejné (WT: $99,72 \pm 0,058$; M₄KO: $99,82 \pm 0,0813$; $n = 3$). Střední hodnota rytmu byla u WT myši o 38,97 % vyšší než u KO myši (WT: $1,369 \pm 0,1886$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,8355 \pm 0,2298$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Počet period byl u obou typů myši stejný (WT i M₄KO: $5,667 \pm 0,333$; $n = 3$), ovšem dominující délky periody se lišily (WT: 16 ± 4 h; M₄KO: 24 ± 0 h; $n = 3$). Čas nejvyšší hodnoty byl u WT myši 1,3× vyšší než u myši KO (WT: $14,2 \pm 1,431$ h; M₄KO: $11 \pm 0,2137$ h; $n = 3$). Amplitudy se lišily až o 58,73 % (Amp 24 WT: $0,2073 \pm 0,0772$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $0,4566 \pm 0,007$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $0,7654 \pm 0,3067$ nmol/min/mg proteinu;

Amp 12 M₄KO: $0,3159 \pm 0,1962$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $0,3607 \pm 0,0659$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $0,2451 \pm 0,0861$ nmol/min/mg proteinu; n = 3).

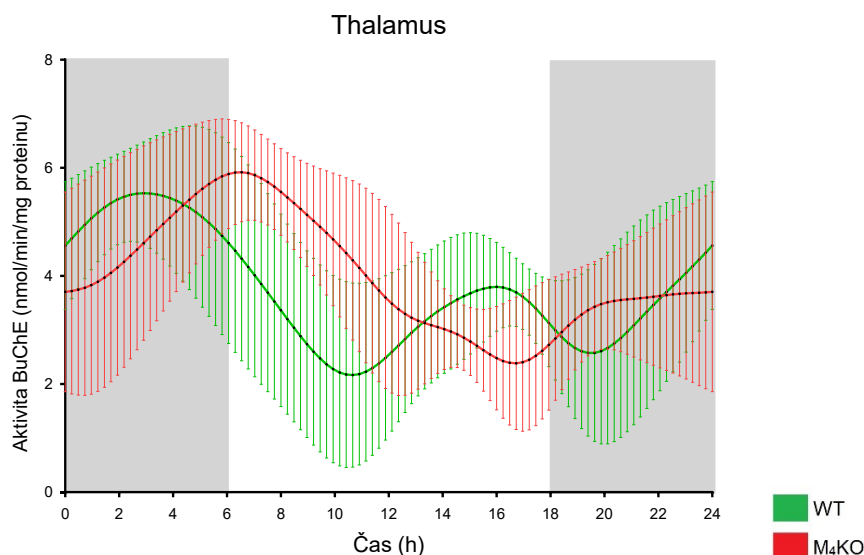
Tab. 13 Statistická významnost chronobiologických parametrů (BuChE – motorický kortex):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	32,01	0,81	54,80	179,71	–0,10	38,97
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	****	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	0,00	–50,00	22,54	–120,26	58,73	32,05

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), **** p<0,0001, ns nesignifikantní.

5.4.3 Thalamus

V oblasti thalamu dosahovala aktivita BuChE maximálních průměrných hodnot u myší typu WT ve 2:00, u myší typu KO byla maximální hodnota naměřena v 10:00 (WT: $5,12 \pm 1,075$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $2,691 \pm 0,533$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Minimální průměrné hodnoty byly u obou typů myší naměřeny ve stejný čas, a sice na přelomu aktivní a inaktivní fáze dne v 18:00 (WT: $2,691 \pm 0,533$ nmol/min/mg proteinu, n = 3; M₄KO: $2,203 \pm 1,147$ nmol/min/mg proteinu, n = 3). Celkové naměřené hodnoty byly u KO myší o 6,90 % vyšší než hodnoty aktivity BuChE u WT myší. Během 24 hodin se aktivita BuChE lišila o 47,4 % u WT a pouze o 18,13 % u KO myší (obr. 17).



Obr. 17 Cirkadiánní rytmus BuChE v oblasti thalamu: Aktivita BuChE (průměr $\pm$ S.E.M., $n = 3$) v průběhu 24 hodin v thalamu myši WT (zeleně) a myši M₄KO (červeně), hodnoty uvedeny v 15minutových intervalech. Maximálních hodnot dosáhly biorytmické křivky aktivity s posunem vrcholů o 3,6 hodiny. Globálního maxima bylo v případě myši běžného typu dosaženo ve 2,9 h v aktivní fázi (šedě), u myši M₄KO bylo globálního maxima dosaženo v 6,5 h. Globálně minimální hodnoty biorytmických křivek nastaly v časech 10,7 h (WT) a 16,7 h (M₄KO).

Aktivita BuChE v thalamu (tab. 14; jednofaktorová ANOVA: $F(43, 68) = 191,9$, $p < 0,0001$) byla u WT o 12,82 % nižší než u myši M₄KO (WT: $3,73 \pm 1,352$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $4,208 \pm 1,21$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Denní aritmetický průměr u KO myši byl 1,45× vyšší než u WT myši, oproti tomu noční aritmetické průměry se příliš nelišily (D mean WT: $3,134 \pm 1,484$ nmol/min/mg proteinu; D mean M₄KO: $4,544 \pm 0,9881$ nmol/min/mg proteinu; N mean WT: $4,177 \pm 1,262$ nmol/min/mg proteinu; N mean M₄KO: $3,956 \pm 1,405$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů byl u myši typu WT 1,77× vyšší než u KO (WT: $-1,044 \pm 0,3276$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $0,5884 \pm 0,5804$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Koeficient určenosti se u obou typů myši příliš nelišil (WT: $98,72 \pm 0,6439$; M₄KO: $99,63 \pm 0,144$; $n = 3$). Střední hodnota rytmu se lišila přibližně o 7,44 % (WT: $3,725 \pm 1,277$ nmol/min/mg proteinu; M₄KO: $4,002 \pm 1,173$ nmol/min/mg proteinu; $n = 3$). Počet period byl u obou typů myši stejný (WT i M₄KO: $4,333 \pm 0,8819$; $n = 3$), dominující délka periody byla vyšší u KO myši (WT: 16 ± 4 h; M₄KO: 20 ± 4 h; $n = 3$). Čas nejvyšší hodnoty byl u KO myši více jak dvojnásobný (WT: $3,444 \pm 0,9029$ h; M₄KO: $7,337 \pm 1,865$ h; $n = 3$). Amplitudy se u obou typů lišily, v případě amplitudy 12hodinového rytmu až o 41,06 % (Amp 24 WT: $1,123 \pm 0,1956$ nmol/min/mg proteinu; Amp 24 M₄KO: $1,556 \pm 0,3906$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12 WT: $1,194 \pm 0,5707$ nmol/min/mg proteinu; Amp 12

M₄KO: $0,7037 \pm 0,3078$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 WT: $0,5475 \pm 0,059$ nmol/min/mg proteinu; Amp 8 M₄KO: $0,5478 \pm 0,2026$ nmol/min/mg proteinu; n = 3).

Tab. 14 Statistická významnost chronobiologických parametrů (BuChE – thalamus):

parametr	T mean	D mean	N mean	D–N mean	%Rhythm	Mesor
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	–12,82	–44,99	5,29	156,36	–0,92	–7,44
parametr	P length	Domnt PL	t Peak	Amp 24	Amp 12	Amp 8
významnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% M₄KO vs. WT	0,00	–25,00	–113,04	–38,56	41,06	–0,05

Porovnání biorytmických parametrů u WT a M₄KO samic (n = 3): celkový aritmetický průměr (T mean), denní aritmetický průměr (D mean), noční aritmetický průměr (N mean), rozdíl denních a nočních aritmetických průměrů (D–N mean), koeficient určenosti rytmu (%Rhythm), střední hodnota rytmu (Mesor), počet period (P length), dominující délka periody (Domnt PL), čas maximální hodnoty (t Peak), ns nesignifikanční.

6 DISKUZE

6.1 Muskarinové receptory

V této práci se nám podařilo pozorovat změnu denzity muskarinových receptorů v průběhu 24 hodin ve strukturách, které se pravděpodobně účastní regulace cirkadiánní lokomoční aktivity, a její odlišnosti u geneticky upravených myší postrádajících MR typu 4.

Nejvýznamnější množství MR bylo zaznamenáno v oblasti striata, motorického kortexu a thalamu, kde byla biorytmická aktivita podobná u WT a M₄KO. Nižších hodnot pak dosahovala denzita MR v oblastech PHA, IgL a SPVZ. Tyto námi naměřené hodnoty jsou v souladu s předchozí prací z naší laboratoře zabývající se distribucí a typovým složením MR ve stejných oblastech CNS (Valuskova et al., 2018a).

Množství denzity M₄ MR v určených oblastech mozku bylo stanoveno na základě vazby [³H]-QNB ke všem MR, kdy receptory typu 4 představovaly rozdíl naměřených MR mezi myšmi WT a M₄KO. Nejvyšší denzita M₄ MR byla identifikována v oblasti striata. I toto zjištění je v souladu se dříve již zmíněnou prací. Stejných závěrů bylo dosaženo i v pracích využívající imunocytochemické metody, či metody sledující genovou expresi (Bernard et al., 1992; Hersch et al., 1994; Hersch & Levey, 1995).

Striatum bylo identifikováno jako zásadní struktura z pohledu M₄ receptorů, která je pravděpodobně zodpovědná za biorytmické řízení lokomoce (Riljak et al., 2020). Jedná se o strukturu bazálních ganglií integrující vstupy z korových oblastí. M₄ receptory zde představují hlavní typ inhibičních autoreceptorů regulujících výlev acetylcholinu. Právě v oblasti striata se vyskytují v těsném lokalizačním i funkčním vztahu s dopaminovými receptory, jejichž úbytek je spojován s narušením lokomoce u Parkinsonovy choroby. Jak již bylo dříve prokázáno, striatum je schopné vnitřní oscilační aktivity, která je spojována se změnami lokomoce za účelem nalezení odměny. Tyto oscilace jsou zatím spojovány s aktivitou dopaminových receptorů, ovšem přesný mechanismus stále není znám (Chartove et al., 2020). Dopaminové receptory vykazují různé rytmické vlastnosti, ať už se jedná o regulaci exprese striatálních hodinových genů, jež je spojena s hledáním odměny (Imbesi et al., 2009; Hood et al., 2010), či změny v aktivitě těchto receptorů, a to buďto v průběhu dne (Naber et al., 1980; Hood et al., 2010), nebo dokonce v průběhu roku (Naber et al., 1981; Eisenberg et al., 2010).

Regulační vliv M₄ MR na dopaminové receptory byl prokázán zvýšením lokomoce M₄KO myši po stimulaci dopaminových receptorů (Gomez et al., 1999). Podobných výsledků zvýšení lokomoce bylo dosaženo i v dalších experimentech spojující M₄ receptory a regulaci lokomoční aktivity (Gomez et al., 2001; Koshimizu et al., 2012). Toto téma je ovšem stále předmětem diskuzí, jelikož v některých pracích nebyl tento efekt pozorovatelný vůbec (Turner et al., 2010; Fink-Jensen et al., 2011), či pouze u jednoho pohlaví (Valuskova et al., 2018b), kdy k umocnění lokomoce došlo pouze u samic, nikoliv u samců, a to pouze v temné (pro myši aktivní) fázi dne. Tento účinek M₄ receptorů na lokomoční aktivitu byl specifický, jelikož nedošlo u samic ani samců k navýšení tělesné teploty, která se běžně u myši zvyšuje zároveň s vyvíjenou lokomoční aktivitou. Vliv pohlaví na lokomoční aktivitu zprostředkovávanou muskarinovými receptory byl v minulosti již pozorován (El-Bakri et al., 2002). V tomto pokusu vykazovaly myši samice po ovariectomii zvýšenou hladinu M₄ MR v různých oblastech CNS a zároveň u nich bylo zaznamenáno snížené explorační chování reprezentované nižší lokomoční aktivitou. Pohlavní rozdílnosti v případě muskarinových receptorů byly mimo jiné zaznamenány i ve vazbě radioaktivně značeného selektivního antagonisty pro M₁ a M₂ receptory (Fragkouli et al., 2006).

V souladu s naší předchozí prací (Valuskova et al., 2018a) se významnou strukturou z hlediska zastoupení M₄ receptorů ukázal být i motorický kortex. Oproti tomu mnohem méně M₄ MR bylo naměřeno v thalamu a v oblasti intergenikulárního listku, kde procentuální rozdíl v densitě MR u WT a u M₄KO myši nebyl tak značný. Naměřené M₄ zastoupení v thalamu přibližně odpovídá výsledkům práce využívající jako radioligand MR neselektivně vážící [³H]-NMS a M₄KO (Oki et al., 2005). V našem současném experimentu jsme ovšem zjistili, že následkem vyřazení M₄ receptorů dochází v těchto strukturách k fázovému posunu biorytmických křivek denzity MR. Je-li tedy množství M₄ receptorů v dané oblasti zkoumáno způsobem využívající rozdíl denzity všech podtypů muskarinových receptorů WT myši a M₄KO myši, mohou být výsledky zavádějící, dochází-li k odběru mozku v době fázového posunu.

K fázovému posunu dochází taktéž i v ostatních vybraných oblastech jako je PHA a SPVZ. Fázový posun křivek ovšem není totožný pro všechny námi vybrané struktury (thalamus: 2,8 hodin vs. SPVZ: 9,7 hodin). S výjimkou SPVZ vykazovala biorytmická křivka vždy pouze jednu dominantní cirkadiánní 24hodinovou periodu. U myši běžného typu dosahovaly biorytmické křivky v případě IgL, SPVZ a PHA minimálních hodnot v první polovině večerní aktivní fáze přibližně dvě až čtyři hodiny po zhasnutí. Tento denní rytmus odpovídá rytmickým oscilacím výlevu acetylcholinu, který se na MR váže a blokuje tak vazebné místo, na něž cílí autoradiografické ligandy. V korových oblastech v noci byl zaznamenán až dvojnásobný výlev

acetylcholinu oproti výlevu ve dne (Kametani & Kawamura, 1991; Jiménez-Capdeville & Dykes, 1993). V prefrontální kůře jsou oscilace výlevu ACh pravděpodobně kontrolovány rytmickou aktivitou SCN a koncentrací jimi uvolňovaného melatoninu (de Prado et al., 2003). Starší studie ovšem popisuje vrcholovou aktivitu výlevu ACh v mozku ve 2 hodiny po zahájení světelné fáze (Hanin et al., 1970). Je tedy možné, že denní oscilace výlevu ACh jakožto neurotransmiteru spojovaného s bděním se liší v závislosti na struktuře mozku a její funkci, kterou v procesech bdění zastává.

Denní oscilace muskarinových receptorů se napříč pracemi velice různí. V předním mozku potkanů byly zaznamenány nejvyšší hodnoty denzity MR dvě hodiny po počátku světelné fáze a nejnižší hodnoty dvě hodiny po počátku aktivní (temné) fáze (Mash et al., 1985). Podobných výsledků bylo dosaženo i v našem experimentu u myši běžného typu v IgL, PHA a SPVZ. Oproti tomu v jiné práci vykazovala denzita MR u potkanů ultradiánní rytmicitu s maximálními hodnotami uprostřed denní a noční fáze dne a minimálními hodnotami vždy na počátku inaktivní (světelné) a aktivní fáze (Wirz-Justice A et al., 1981). V další práci bylo množství MR u myši ve striatu, stejně jako v našem experimentu, vyšší v noci ve 22:00 hodin, než ve dne v 8:00. Ovšem v kortexu bylo množství MR vyšší v 8:00 a 16:00 než v noci ve 22:00 hodin (Pan, 1992). U křečků byly zaznamenány odlišné hladiny MR v korových oblastech, ovšem ne v hypothalamu. V korových oblastech, kde maximální hladiny MR byly zaznamenány v pozdní fázi světla, jsou za tyto denní variace pravděpodobně zodpovědné SCN zprostředkované fotické informace (Bina et al., 1998). Podobně tedy jako v případě výlevu acetylcholinu může docházet k různým rytmickým oscilacím v denzitě MR v závislosti na mozkové struktuře, či na živočišném druhu.

V předchozích pracích naší laboratoře bylo prokázáno, že rozdílnosti v denzitě MR měřené touto stejnou metodou za pomoci využití autoradiografie nebyly způsobeny změnou afinity radioligandu (Valuskova et al., 2018a). Možných vysvětlení rozdílností našich výsledků s ostatními pracemi by tedy mohlo být několik. Jedním z důvodů by mohly být již dříve zmíněné pohlavní rozdíly ve vazbě radioligandů na MR. Dalším důvodem odlišností výsledků může být zvolený živočišný druh experimentálního zvířete. V našem experimentu jsme jako modelový organismus zvolili samice pro jejich pohlavně závislou zvýšenou lokomoční aktivitu (viz výše). Tyto ostatní práce (Turner et al., 2010; Fink-Jensen et al., 2011), ve kterých zvýšení lokomoce nebylo pozorováno, ovšem používají pouze samce. Kromě těchto možností nelze taktéž vyloučit rozdílnosti genetického pozadí M4KO myši využívaných v experimentech testujících lokomoční aktivitu. Je tudíž možné, že tyto myši bez zvýšené lokomoce by mohly

mít jiný vzor cirkadiánní denzity MR právě v námi vybraných strukturách, které se pravděpodobně účastní regulace lokomoce. Jak již bylo zmíněno, dopaminové receptory vykazují sezónní rytmické změny. I přes to, že cirkulární či jiná sezónní rytmicita muskarinových receptorů není náplní této práce a myši byly chovány ve striktně dodržovaných světelných i teplotních podmínkách po celou dobu jejich chovu, nelze s absolutní jistotou vyloučit, že se rozdílnosti v rytmické denzitě MR v porovnání s ostatními pracemi nedají vysvětlit sezónní změnou, která ovšem do této doby nebyla u MR v mozku nikde prokazatelně pozorována.

6.2 Muskarinové receptory typu 1

Denzita muskarinových receptorů typu 1 vykazovala denní oscilace jak u myši běžného typu, tak i u myši s vyřazenými M_4 receptory. V obou případech vykazovala denzita M_1 MR u M_4 KO ultradiánní oscilace s maximálními hodnotami na přelomu inaktivní a aktivní fáze, které se ovšem lišily od oscilací, které byly zaznamenány u myši běžného typu. Ve striatu u myši WT odpovídala biorytmická křivka M_1 receptorů s jednou dominantní 24h periodou rytmu všech MR z první části experimentu využívajícím vazbu $[^3H]$ -QNB. Oproti tomu v motorickém kortexu vykazovala biorytmická křivka M_1 MR u WT myši ultradiánní rytmicitu. M_1 receptory byly výrazně zastoupeny v motorickém kortexu i ve striatu, což je v souladu s prací využívající $[^3H]$ -NMS radioligand a M_1 KO myši (Oki et al., 2005).

Fáze cirkadiánních rytmů vyvolaných oscilační aktivitou SCN se již dříve ukázaly být citlivé na účinky karbacholu, neselektivního agonisty acetylcholinových receptorů. V důsledku aplikace karbacholu do mozkové komory došlo u křečků k posunu fází biorytmické aktivity (Bina & Rusak, 1996) vyvolané změnou transkripce hodinového genu *Per1* (Dojo et al., 2017), přičemž molekulární podstatou toho posunu by zřejmě mohla být aktivace proteinkinázy G v důsledku zvýšení intracelulární koncentrace cyklického guanosinmonofosfátu (Liu et al., 1997). Stejného fázového posunu bylo v noci dosaženo podáním agonistů muskarinových, ale nikoliv nikotinových receptorů (Liu & Gillette, 1996), kdy fázový účinek karbacholu zcela zvrátil muskarinový antagonist selektivní pro M_1 MR. Fázový účinek se také podařilo zvrátit antagonistou selektivním k M_3 MR. Není proto zatím zcela zřejmé jak konkrétně a který typ, případně typy MR, jsou schopné ovlivňovat rytmické oscilace hlavního cirkadiánního pacemakeru SCN.

6.3 Cholinesterázy

V průběhu 24 hodin byly zaznamenány změny v aktivitě cholinesteráz ovšem bez signifikantně významných rozdílů mezi myšmi typu WT a M4KO. Ve většině případů byl zaznamenán vrchol ultradiánní aktivity v inaktivní (temné) fázi dne. Tyto výsledky jsou v souladu s pracemi označující světelnou fázi jako část dne s nejvyšší aktivitou AChE (Schiebeler & von Mayersbach, 1974; Pan, 1991), tedy v době pro hlodavce inaktivní. Předpokládá se tedy, že aktivita cholinesteráz by mohla být v jakési „antifázi“ oproti výlevu acetylcholinu, který je spojován s procesy bdění. Stejných výsledků ovšem bylo dosaženo i u lidí, kdy aktivita AChE byla měřena Ellmanovou metodou *post mortem* v mozcích zdravých jedinců (Perry et al., 1977). I přes to, že i zde byla zaznamenána nejvyšší aktivita ve dne, jde o pro člověka aktivní fázi, nikoliv inaktivní. Ultradiánní rytmicita s vrcholovou aktivitou ve světelné fázi byla taktéž zaznamenána v práci porovnávající aktivitu AChE v mozku myší v průběhu roku (Lewandowski, 1988). I přes to, že myši byly drženy ve stejných světelných i teplotních podmínkách, vykazovala aktivita AChE v retikulární formaci mozkového kmene sezónní variace. Maximální aktivita AChE naměřená v mozcích odebraných v zimním období byla zaznamenána na rozdíl od ostatních ročních dob spíše na přelomu temné a světelné fáze v ranních hodinách, což je v rozporu s našimi výsledky, jelikož k odběrům v rámci našeho experimentu došlo v prosinci. Vysvětlením těchto nesrovnalostí může být odlišná volba mozkové oblasti zájmu, jelikož aktivita AChE se ukázala být strukturně specifická (Owasoyo et al., 1980).

Přestože ChE představují atraktivní cíl léčby neurodegenerativních poruch spojených s narušením cholinergního systému mozku, existuje na téma rytmických vlastností cholinesteráz jen velmi málo a nedostatečně recentních prací. Znalosti a respektování fyziologických biorytmických procesů by přitom mohly pomoci při načasování podávání terapie tak, aby došlo k co nejvyššímu účinku s nejnižšími vedlejšími projevy léčby.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci se nám podařilo pozorovat cirkadiánní změny denzity MR a aktivity ChE v oblastech mozku, které se pravděpodobně účastní regulace lokomoce, a to jak u myši běžného typu, tak i u myši s vyřazenými M₄ muskarinovými receptory.

Denzita všech muskarinových receptorů projevovala ve většině případů jednu dominantní čtyřiaadvacetihodinovou periodu. V oblastech přímo inervovaných suprachiasmatickými jádry, hlavním cirkadiánním pacemakerem, projevovaly biorytmické křivky denzity fázový posun u myši s vyřazenými MR typu 4. V těchto SCN podřízených oblastech (IgL, SPVZ a PHA) dosahovala denzita nejvyšších hodnot v případě myši typu WT v první polovině inaktivní fáze. Minimální hodnoty byly zaznamenány na počátku aktivní fáze. Jako mozkové struktury s nejvyšším procentuálním zastoupením M₄ receptorů byly identifikovány striatum a motorický kortex. Spolu s thalamem jsou v těchto oblastech biorytmické křivky denzity MR obou typů myši velice podobné. Předpokládáme tedy, že vyřazení M₄ receptorů ve striatu a v motorickém kortexu je zodpovědné za biorytmické zvýšení lokomoce, jež bylo pozorováno v předchozích pracích.

Denní oscilace denzity byla rovněž pozorována i v případě M₁ MR. Ve striatu myši WT typu se biorytmická křivka shoduje s rytmicitou denzity všech MR ve stejné oblasti, ovšem v motorickém kortexu vykazuje denzita M₁ receptorů ultradiánní rytmus. U myši M₄KO byly v obou strukturách zaznamenány navzájem odlišné ultradiánní oscilace, jež se ovšem od rytmických oscilací v motorickém kortexu myši běžného typu v chronobiologických parametrech lišily.

Aktivita cholinesteráz rovněž vykazovala ultradiánní oscilace, přičemž většina nejvyšších hodnot byla zaznamenána přibližně uprostřed inaktivní fáze dne, tudíž kolem 12 hodiny. Aktivita ChE se ovšem mezi myšmi obou typů nijak výrazně nelišila.

Získané výsledky naznačují vliv M₄ receptorů na biologické rytmy ostatních zkoumaných komponent cholinergního systému ve strukturách mozku, jež se pravděpodobně účastní regulace lokomoce. Bližší zkoumání cirkadiánních vlastností těchto receptorů by mohlo přinést zajímavé doplňující poznatky, které by jednoho dne mohly být přínosné například v léčbě lokomočních potíží Parkinsonovy choroby, ADHD, či jiné poruchy centrální nervové soustavy, u které byly zaznamenány rytmické změny.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

(*) sekundární citace

- Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1740-1744.
- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS. Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J Comp Neurol*. 2001;434(4):445-460.
- (*) Amenta F, Tayebati SK. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr Med Chem*. 2008;15(5):488-498.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH. Molecular forms of butyrylcholinesterase in the human neocortex during development and degeneration of the cortical cholinergic system. *J Neurochem*. 1987;48(6):1687-1692.
- Bernard V, Normand E, Bloch B. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci*. 1992;12(9):3591-3600.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295(5557):1070-1073.
- Bina KG, Rusak B. Muscarinic receptors mediate carbachol-induced phase shifts of circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Brain Res*. 1996;743(1-2):202-211.
- Bina KG, Rusak B, Semba K. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol*. 1993;335(2):295-307.
- Bina KG, Rusak B, Wilkinson M. Daily variation of muscarinic receptors in visual cortex but not suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *Brain Res*. 1998;797(1):143-153.
- (*) Bohnen NI, Yarnall AJ, Weil RS, Moro E, Moehle MS, Borghammer P, Bedard MA, Albin RL. Cholinergic system changes in Parkinson's disease: emerging therapeutic approaches. *Lancet Neurol*. 2022;21(4):381-392.

- Bon S, Massoulié J. Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J Biol Chem*. 1997;272(5):3007-3015.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes [published correction appears in *Science* 1987 Sep 25;237(4822):237]. *Science*. 1987;237(4814):527-532.
- Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, et al. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M₃ muscarinic receptors. *Am J Physiol*. 1995;268(2 Pt 1):E336-E342.
- Bradley SJ, Molloy C, Valuskova P, Dwomoh L, Scarpa M, Rossi M, Finlayson L, Svensson KA, Chernet E, Barth VN, Gherbi K, Sykes DA, Wilson CA, Mistry R, Sexton PM, Christopoulos A, Mogg AJ, Rosethorne EM, Sakata S, John Challiss RA, Broad LM, Tobin AB. Biased M₁-muscarinic-receptor-mutant mice inform the design of next-generation drugs. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3):240-249.
- Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*. 1980;283(5748):673-676.
- Burgen AS. The role of ionic interaction at the muscarinic receptor. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965;25(1):4-17.
- Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, McKinzie DL, Felder CC. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci*. 2003;17(7):1403-1410.
- (*) Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*. 1998;50(2):279-290.
- Chartove JAK, McCarthy MM, Pittman-Polletta BR, Kopell NJ. A biophysical model of striatal microcircuits suggests gamma and beta oscillations interleaved at delta/theta frequencies mediate periodicity in motor control. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(2):e1007300.

- Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J, Gillette MU. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96 (23):13468-13473.
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuroparmacol*. 2013;11(3):315-335.
- Curtis CA, Wheatley M, Bansal S, Birdsall NJ, Eveleigh P, Pedder EK, Poyner D, Hulme EC. Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J Biol Chem*. 1989;264(1):489-495.
- Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 1998;393(3):374-390.
- Darvesh S, Hopkins DA. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol*. 2003;463(1):25-43.
- de Prado BM, Reiter RJ, Mora F. Perfusion of melatonin into the prefrontal cortex disrupts the circadian rhythm of acetylcholine but not of locomotor activity. *J Pineal Res*. 2003;35(4):283-287.
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci*. 1997;17(2):667-675.
- Dojo K, Yamaguchi Y, Fustin JM, Doi M, Kobayashi M, Okamura H. Carbachol Induces Phase-dependent Phase Shifts of Per1 Transcription Rhythms in Cultured Suprachiasmatic Nucleus Slices. *J Biol Rhythms*. 2017;32(2):101-108.
- Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet*. 1998;63(4):967-975.
- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):10-22.
- Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem*. 2002;277(19):17248-17254.

- Eisenberg DP, Kohn PD, Baller EB, Bronstein JA, Masdeu JC, Berman KF. Seasonal effects on human striatal presynaptic dopamine synthesis. *J Neurosci*. 2010;30(44):14691-14694.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
- El-Bakri NK, Adem A, Suliman IA, Mulugeta E, Karlsson E, Lindgren JU, Winblad B, Islam A. Estrogen and progesterone treatment: effects on muscarinic M₄ receptor subtype in the rat brain. *Brain Res*. 2002;948(1-2):131-137.
- Esveld EE, Tuvikene J, Sirp A, Patil S, Bramham CR, Timmusk T. CREB Family Transcription Factors Are Major Mediators of BDNF Transcriptional Autoregulation in Cortical Neurons. *J Neurosci*. 2020;40(7):1405-1426.
- Etchegaray JP, Yu EA, Indic P, Dallmann R, Weaver DR. Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One*. 2010;5(4):e10303. Published 2010 Apr 22.
- (*) Falk S, Lund C, Clemmensen C. Muscarinic receptors in energy homeostasis: Physiology and pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2020;126 Suppl 6:66-76.
- Farar V, Hrabovska A, Krejci E, Myslivecek J. Developmental adaptation of central nervous system to extremely high acetylcholine levels. *PLoS One*. 2013;8(7):e68265. Published 2013 Jul 4.
- Farar V, Mohr F, Legrand M, Lamotte d'Incamps B, Cendelin J, Leroy J, Abitbol M, Bernard V, Baud F, Fournet V, Houze P, Klein J, Plaud B, Tuma J, Zimmermann M, Ascher P, Hrabovska A, Myslivecek J, Krejci E. Near-complete adaptation of the PRiMA knockout to the lack of central acetylcholinesterase. *J Neurochem*. 2012;122(5):1065-1080.
- (*) Felder CC, Goldsmith PJ, Jackson K, Sanger HE, Evans DA, Mogg AJ, Broad LM. Current status of muscarinic M₁ and M₄ receptors as drug targets for neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*. 2018;136(Pt C):449-458.
- Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, Blakely RD. Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J Neurosci*. 2003;23(30):9697-9709.
- Figuroa KW, Griffin MT, Ehlert FJ. Selectivity of agonists for the active state of M₁ to M₄ muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(1):331-342.

- Fink-Jensen A, Schmidt LS, Dencker D, Schüle C, Wess J, Wörtwein G, Woldbye DP. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M₄ muscarinic acetylcholine receptor. *Eur J Pharmacol*. 2011;656(1-3):39-44.
- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC, Levey AI. Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1995;64(4):1888-1891.
- Fragkouli A, Stamatakis A, Zographos E, Pachnis V, Stylianopoulou F. Sexually dimorphic effects of the Lhx7 null mutation on forebrain cholinergic function. *Neuroscience*. 2006;137(4):1153-1164.
- Galvin VC, Yang ST, Paspalas CD, Yang Y, Jin LE, Datta D, Morozov YM, Lightbourne TC, Lowet AS, Rakic P, Arnsten AFT, Wang M. Muscarinic M₁ Receptors Modulate Working Memory Performance and Activity via KCNQ Potassium Channels in the Primate Prefrontal Cortex. *Neuron*. 2020;106(4):649-661.
- Gautam D, Heard TS, Cui Y, Miller G, Bloodworth L, Wess J. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M₁ and M₃ muscarinic receptor single- and double-knockout mice. *Mol Pharmacol*. 2004;66(2):260-267.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998;280(5369):1564-1569.
- Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M₁ muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):15312-15317.
- Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS, Greenberg ME. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*. 1993;260(5105):238-241.
- Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuregulin in mammalian neuritegenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13935-13940.

- Grundmann M, Merten N, Malfacini D, Inoue A, Preis P, Simon K, Rüttiger N, Ziegler N, Benkel T, Schmitt NK, Ishida S, Müller I, Reher R, Kawakami K, Inoue A, Rick U, Kühl T, Imhof D, Aoki J, König GM, Hoffmann C, Gomeza J, Wess J, Kostenis E. Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun.* 2018;9(1):341.
- Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):10483-10488.
- Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder CC, Bymaster FP, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Duttaroy A, Deng CX, Wess J. Generation and pharmacological analysis of M₂ and M₄ muscarinic receptor knockout mice. *Life Sci.* 2001;68(22-23):2457-2466.
- Haberberger R, Schultheiss G, Diener M. Epithelial muscarinic M₁ receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. *Eur J Pharmacol.* 2006;530(3):229-233.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature.* 2012;482(7386):547-551.
- Hamnett R, Crosby P, Chesham JE, Hastings MH. Vasoactive intestinal peptide controls the suprachiasmatic circadian clock network via ERK1/2 and DUSP4 signalling. *Nat Commun.* 2019;10(1):542.
- Hanin I, Massarelli R, Costa E. Acetylcholine concentrations in rat brain: diurnal oscillation. *Science.* 1970;170(3955):341-342.
- Hannibal J, Møller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J. PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol.* 2000;418(2):147-155.
- Hardouin SN, Richmond KN, Zimmerman A, Hamilton SE, Feigl EO, Nathanson NM. Altered cardiovascular responses in mice lacking the M(1) muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(1):129-137.
- Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci.* 1994;14(5 Pt 2):3351-3363.

- Hersch SM, Levey AI. Diverse pre- and post-synaptic expression of m1-m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci.* 1995;56(11-12):931-938.
- Hood S, Cassidy P, Cossette MP, Weigl Y, Verwey M, Robinson B, Stewart J, Amir S. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J Neurosci.* 2010;30(42):14046-14058.
- Hrabovska A, Farar V, Bernard V, Duysen EG, Brabec J, Lockridge O, Myslivecek J. Drastic decrease in dopamine receptor levels in the striatum of acetylcholinesterase knock-out mouse. *Chem Biol Interact.* 2010;183(1):194-201.
- Huang XP, Prilla S, Mohr K, Ellis J. Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol.* 2005;68(3):769-778.
- (*) Hulme EC, Lu ZL, Bee MS. Scanning mutagenesis studies of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor. *Recept Channels.* 2003;9(4):215-228.
- Imbesi M, Yildiz S, Dirim Arslan A, Sharma R, Manev H, Uz T. Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression. *Neuroscience.* 2009;158(2):537-544.
- Ito Y, Oyuncul L, Seki M, Fujino Oki T, Matsui M, Yamada S. Quantitative analysis of the loss of muscarinic receptors in various peripheral tissues in M₁-M₅ receptor single knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2009;156(7):1147-1153.
- Jakubík J, Janíčková H, Randáková A, El-Fakahany EE, Doležal V. Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors. *PLoS One.* 2011;6(11):e27732.
- Jeon J, Dencker D, Wörtwein G, Woldbye DP, Cui Y, Davis AA, Levey AI, Schütz G, Sager TN, Mørk A, Li C, Deng CX, Fink-Jensen A, Wess J. A subpopulation of neuronal M₄ muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J Neurosci.* 2010;30(6):2396-2405.

- Jiménez-Capdeville ME, Dykes RW. Daily changes in the release of acetylcholine from rat primary somatosensory cortex. *Brain Res.* 1993;625(1):152-158.
- Johnson G, Moore SW. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258(3):758-762.
- (*) Jones CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(1):16-42.
- Kametani H, Kawamura H. Circadian rhythm of cortical acetylcholine release as measured by in vivo microdialysis in freely moving rats. *Neurosci Lett.* 1991;132(2):263-266.
- Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression [published correction appears in *Nature.* 2016 Mar 3;531(7592):126]. *Nature.* 1998;393(6683):373-377.
- Khalsa SB, Jewett ME, Cajochen C, Czeisler CA. A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J Physiol.* 2003;549(Pt 3):945-952.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell.* 1997;89(4):641-653.
- Kow RL, Nathanson NM. Structural biology: Muscarinic receptors become crystal clear. *Nature.* 2012;482(7386):480-481.
- Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legay C, Sketelj J, Massoulié J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22840-22847.
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 2012;482(7386):552-556.
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 2013;504(7478):101-106.

- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 1999;98(2):193-205.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*. 2001;107(7):855-867.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci*. 1995;15(5 Pt 2):4077-4092.
- Lewandowski MH. Seasonal variations in the circadian activity of AChE in the brain stem reticular formation of mice under normal and constant light regimens. *Chronobiol Int*. 1988;5(2):121-125.
- Li B, Duysen EG, Carlson M, Lockridge O. The butyrylcholinesterase knockout mouse as a model for human butyrylcholinesterase deficiency. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(3):1146-1154.
- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem*. 2000;75(3):1320-1331.
- Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D, Taylor P. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem*. 1991;266(34):23083-23090.
- Liu C, Ding JM, Faiman LE, Gillette MU. Coupling of muscarinic cholinergic receptors and cGMP in nocturnal regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci*. 1997;17(2):659-666.
- Liu C, Gillette MU. Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *J Neurosci*. 1996;16(2):744-751.
- Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson HW, La Du BN. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;215(1):1-8.

- Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J*. 1997;16(22):6762-6771.
- Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, Saper CB. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation [published correction appears in *J Neurosci*. 2012 Oct 17;32(42):14849-50]. *J Neurosci*. 2001;21(13):4864-4874.
- Ma W, Miao Z, Novotny MV. Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited. *Biol Reprod*. 1998;59(6):1317-1320.
- Mash DC, Flynn DD, Kalinoski L, Potter LT. Circadian variations in radioligand binding to muscarine receptors in rat brain dependent upon endogenous agonist occupation. *Brain Res*. 1985;331(1):35-38.
- Masson P, Froment MT, Fortier PL, Visicchio JE, Bartels CF, Lockridge O. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1387(1-2):41-52.
- McDonald AJ. Colocalization of M₁ muscarinic cholinergic receptors and NMDA receptors in dendrites and spines of pyramidal neurons of the mouse basolateral amygdala: An ultrastructural analysis. *Neurosci Lett*. 2022;779:136624.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1983b;214(2):170-197.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 1983a;10(4):1185-1201.
- Michal P, El-Fakahany EE, Dolezal V. Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(2):607-614.

- Mistry R, Dowling MR, Challiss RA. An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M₂ and M₄ muscarinic acetylcholine receptor signalling via G_{i/o} and G_s proteins. *Br J Pharmacol*. 2005;144(4):566-575.
- Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*. 2001;15(8):995-1006.
- Moga MM, Moore RY. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1997;389(3):508-534.
- Moore RY, Card JP. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*. 1994;344(3):403-430.
- Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*. 1972;146(1):1-14.
- Moore RY, Speh JC. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*. 1993;150(1):112-116.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):89-98.
- Muscat L, Morin LP. Intergeniculate leaflet: contributions to photic and non-photoc responsiveness of the hamster circadian system. *Neuroscience*. 2006;140(1):305-320.
- (*) Myslivecek J, Farar V, Valuskova P. M₄ muscarinic receptors and locomotor activity regulation. *Physiol Res*. 2017;66(Suppl 4):S443-S455.
- Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, Tobler I, Borbély AA. Seasonal variations in the endogenous rhythm of dopamine receptor binding in rat striatum. *Biol Psychiatry*. 1981;16(9):831-835.
- Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, Wehr TA. Dopamine receptor binding in rat striatum: ultradian rhythm and its modification by chronic imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1980;68(1):1-5.
- Nair AG, Castro LRV, El Khoury M, Gorgievski V, Giros B, Tzavara ET, Hellgren-Kotaleski J, Vincent P. The high efficacy of muscarinic M₄ receptor in D₁ medium spiny neurons reverses striatal hyperdopaminergia. *Neuropharmacology*. 2019;146:74-83.

- Nguyen ML, Cox GD, Parsons SM. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry*. 1998;37(38):13400-13410.
- Oda S, Tsuneoka Y, Yoshida S, Adachi-Akahane S, Ito M, Kuroda M, Funato H. Immunolocalization of muscarinic M₁ receptor in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 2018;526(8):1329-1350.
- Oki T, Takagi Y, Inagaki S, et al. Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;133(1):6-11.
- Owasoyo JO, Okonmah AD, Soliman KFA, Walker CA. Circadian variation in the acetylcholinesterase activity of specific rat brain areas, *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 1980;11(4):251-256.
- Pan SY. Circadian changes of acetylcholine, choline acetyltransferase, acetylcholinesterase and muscarinic receptors in mouse brain. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1991;12(2):148-151.
- Pan SY. Circadian effects of scopolamine on memory, exploratory behavior, and muscarinic receptors in mouse brain. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1992;13(4):323-326.
- Pancani T, Bolarinwa C, Smith Y, Lindsley CW, Conn PJ, Xiang Z. M4 mAChR-mediated modulation of glutamatergic transmission at corticostriatal synapses. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(4):318-324.
- Paradis JS, Ly S, Blondel-Tepaz É, Galan JA, Beaudrait A, Scott MG, Enslen H, Marullo S, Roux PP, Bouvier M. Receptor sequestration in response to β -arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(37):E5160-E5168.
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Elsevier Academic Press*, New York. 2008.
- Perrier NA, Khérif S, Perrier AL, Dumas S, Mallet J, Massoulié J. Expression of PRiMA in the mouse brain: membrane anchoring and accumulation of 'tailed' acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci*. 2003;18(7):1837-1847.
- Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 2002;33(2):275-285.

- Perry EK, Perry RH, Taylor MJ, Tomlinson BE. Circadian variation in human brain enzymes. *Lancet*. 1977;1(8014):753-754.
- Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Felder CC. M₁ muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res*. 2002;944(1-2):82-89.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002;110(2):251-260.
- Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J Neurosci*. 2005;25(2):404-408.
- Prosser RA, Edgar DM, Heller HC, Miller JD. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res*. 1994;643(1-2):296-301.
- Redka DS, Pisterzi LF, Wells JW. Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. *Mol Pharmacol*. 2008;74(3):834-843.
- (*) Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:647-676.
- Riljak V, Janisova K, Myslivecek J. Lack of M₄ muscarinic receptors in the striatum, thalamus and intergeniculate leaflet alters the biological rhythm of locomotor activity in mice. *Brain Struct Funct*. 2020;225(5):1615-1629.
- Roenneberg T, Kumar CJ, Mrosovsky M. The human circadian clock entrains to sun time. *Curr Biol*. 2007;17(2):R44-R45.
- Ruggieri MR, Colton MD, Wang P, Wang J, Smyth RJ, Pontari MA, Luthin GR. Human prostate muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274(2):976-982.
- Santiago LJ, Abrol R. Understanding G Protein Selectivity of Muscarinic Acetylcholine Receptors Using Computational Methods. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5290. Published 2019 Oct 24.
- Santiago MP, Potter LT. Biotinylated m4-toxin demonstrates more M₄ muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res*. 2001;894(1):12-20.

- Scarr E, Seo MS, Aumann TD, Chana G, Everall IP, Dean B. The distribution of muscarinic M₁ receptors in the human hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 2016;77:187-192.
- Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature.* 1991;351(6329):761-764.
- Selim M, Glass JD, Hauser UE, Rea MA. Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 1993;621(2):181-188.
- Shapira M, Tur-Kaspa I, Bosgraaf L, Livni N, Grant AD, Grisaru D, Korner M, Ebstein RP, Soreq H. A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum Mol Genet.* 2000;9(9):1273-1281.
- (*) Sharma A, Lee S, Kim H, Yoon H, Ha S, Kang SU. Molecular Crosstalk Between Circadian Rhythmicity and the Development of Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 2020;14:844. Published 2020 Aug 6.
- Shiozaki K, Iseki E, Hino H, Kosaka K. Distribution of m1 muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies--an immunohistochemical study. *J Neurol Sci.* 2001;193(1):23-28.
- Shohami E, Kaufer D, Chen Y, Seidman S, Cohen O, Ginzberg D, Melamed-Book N, Yirmiya R, Soreq H. Antisense prevention of neuronal damages following head injury in mice. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(4):228-236.
- Sławińska U, Kasicki S. Theta-like rhythm in depth EEG activity of hypothalamic areas during spontaneous or electrically induced locomotion in the rat. *Brain Res.* 1995;678(1-2):117-126.
- Somogyi GT, Tanowitz M, de Groat WC. M₁ muscarinic receptor-mediated facilitation of acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J Physiol.* 1994;480 (Pt 1)(Pt 1):81-89.
- (*) Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor [published correction appears in Nat Rev Neurosci 2001 Sep;2(9):670]. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(4):294-302.
- Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U, Brann MR. Discovery of an ectopic activation site on the M₍₁₎ muscarinic receptor. *Mol Pharmacol.* 2002;61(6):1297-1302.

- Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(6):1583-1586.
- Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 2003;64(6):1444-1451.
- Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991;253(5022):872-879.
- Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(3):1044-1049.
- Tice MA, Hashemi T, Taylor LA, McQuade RD. Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996;92(1):70-76.
- Tonetti L, Conca A, Giupponi G, Filardi M, Natale V. Circadian activity rhythm in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *J Psychiatr Res*. 2018;103:1-4.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7728-7733.
- Turner J, Hughes LF, Toth LA. Sleep, activity, temperature and arousal responses of mice deficient for muscarinic receptor M₂ or M₄. *Life Sci*. 2010;86(5-6):158-169.
- Valant C, Gregory KJ, Hall NE, Scammells PJ, Lew MJ, Sexton PM, Christopoulos A. A novel McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29312-29321.
- Valuskova P, Farar V, Forczek S, Krizova I, Myslivecek J. Autoradiography of ³H-pirenzepine and ³H-AFDX-384 in Mouse Brain Regions: Possible Insights into M₁, M₂, and M₄ Muscarinic Receptors Distribution. *Front Pharmacol*. 2018a;9:124. Published 2018 Feb 20.
- Valuskova P, Forczek ST, Farar V, Myslivecek J. The deletion of M₄ muscarinic receptors increases motor activity in females in the dark phase. *Brain Behav*. 2018b;8(8):e01057.

- Vujovic N, Gooley JJ, Jhou TC, Saper CB. Projections from the subparaventricular zone define four channels of output from the circadian timing system. *J Comp Neurol.* 2015;523(18):2714-2737.
- Wess J. Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2005;68(6):1506-1509.
- Wickland C, Turek FW. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res.* 1994;660(2):293-300.
- Wirz-Justice A, Tobler I, Kafka MS, Naber D, Marangos PJ, Borbély AA, Wehr TA. Sleep deprivation: effects on circadian rhythms of rat brain neurotransmitter receptors. *Psychiatry Res.* 1981;5(1):67-76.
- Yamamura HI, Snyder SH. Choline: high-affinity uptake by rat brain synaptosomes. *Science.* 1972;178(4061):626-628.
- Yan Z, Surmeier DJ. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci.* 1996;16(8):2592-2604.
- Zhang W, Yamada M, Gomez J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M₁-M₅ muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002;22(15):6347-6352.
- Zhao D, Frohman MA, Blusztajn JK. Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms. *BMC Neurosci.* 2001;2:16.
- Zhao LX, Ge YH, Xiong CH, Tang L, Yan YH, Law PY, Qiu Y, Chen HZ. M₁ muscarinic receptor facilitates cognitive function by interplay with AMPA receptor GluA1 subunit. *FASEB J.* 2018;32(8):4247-4257.
- Zhou H, Meyer A, Starke K, Gomez J, Wess J, Trendelenburg AU. Heterogeneity of release-inhibiting muscarinic autoreceptors in heart atria and urinary bladder: a study with M₂- and M₄-receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2002;365(2):112-122.

Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M. Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M₁ and M₄ Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci*. 2016;36(35):9161-9172.