

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Tina Kititi

Teplotní synchronizace fetálních cirkadiálních hodin

Temperature synchronization of fetal circadian clock

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2025

### **Prohlášení**

Čestně prohlašuji, že při vypracování této závěrečné práce jsem postupovala samostatně, s uvedením všech použitých informačních zdrojů a literatury. Tato diplomová práce a ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.4. 2025

Bc. Tina Kititi

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce prof. PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za pomoc v průběhu vypracování této diplomové práce, dále i celému týmu laboratoře biologických rytmů FGÚ AV ČR za spolupráci a asistenci během experimentů. Poděkování patří i mé rodině a blízkým přátelům, kteří mi byli velkou oporou během celého studia.

## Abstrakt

Suprachiasmatická jádra (SCN) hrají v dospělém organismu klíčovou roli jako hlavní cirkadiánní oscilátor, jehož rytmus je stabilní a teplotně kompenzovaný. Během fetálního vývoje nebyla míra teplotní odolnosti v SCN dostatečně prozkoumaná. Cílem této práce bylo experimentálně ověřit, zda změny tělesné teploty mohou být potenciálním nesvětelným mateřským signálem a synchronizovat fetální cirkadiánní rytmy. Výzkum využívá organotypické explanty SCN odebrané z transgenního myšího modelu *mPer2<sup>Luc</sup>*, který umožňuje sledování cirkadiánní aktivity proteinu PER2 pomocí bioluminiscence v reálném čase. Výsledky ukázaly, že fetální SCN jsou na změny teploty citlivé. Opakované teplotní cykly měly signifikantní synchronizační účinek na fetální SCN a obnovily rytmicitu u vzorků se slabými oscilacemi. Farmakologická inhibice proteinu HSF1 pomocí kvercetinu částečně utlumila odpověď fetálních hodin na teplotní cykly. Zjištěné hodnoty teplotního koeficientu  $Q_{10}$  naznačují nižší stupeň teplotní kompenzace ve fetálním SCN oproti dospělým jedincům. Tato práce porovnává rozdíly ve vlastnostech cirkadiánních hodin ve fetálním a plně vyvinutém SCN, přispívá k porozumění vývoje cirkadiánních oscilátorů a otevírá prostor pro další výzkum mateřské synchronizace.

Klíčová slova: cirkadiánní hodiny, teplotní synchronizace, ontogeneze, suprachiasmatická jádra

## **Abstract**

The suprachiasmatic nuclei (SCN) play a key role in the adult organism as a major circadian oscillator whose rhythm is stable and temperature-compensated. Temperature resistance in the SCN has not been well understood during fetal development. The aim of this study was to experimentally test whether changes in body temperature could be a potential non-light maternal signal and synchronize fetal circadian rhythms. The research uses organotypic SCN explants taken from the *mPer2<sup>Luc</sup>* transgenic mouse model, which allows monitoring of the circadian activity of the PER2 protein by real-time bioluminescence. The results showed that fetal SCN is sensitive to temperature changes. Repeated temperature cycles had a significant synchronizing effect on fetal SCN and restart the dampened oscillations. Pharmacological inhibition of the HSF1 protein by quercetin partially inhibited the response of the fetal clock to temperature cycles. The values of the temperature coefficient  $Q_{10}$  suggest a lower degree of temperature compensation in the fetal SCN compared to adults. This work compares the differences in circadian clock properties in fetal and fully developed SCN, contributes to the understanding of the development of circadian oscillators and opens the way for further research on maternal synchronization.

Keywords: circadian clock, temperature synchronization, ontogenesis, suprachiasmatic nuclei

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 Cirkadiánní systém savců.....	2
2.1.1 Centrální hodiny.....	3
2.1.2 Periferní hodiny.....	5
2.1.3 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin .....	5
2.2 Základní parametry cirkadiánního rytmu.....	6
2.3 Ontogeneze cirkadiánního systému.....	7
2.3.1 Vývoj cirkadiánního systému na tkáňové úrovni.....	8
2.3.2 Vývoj cirkadiánního systému na molekulární úrovni .....	9
2.3.3 Vývoj cirkadiánních rytmů na systémové úrovni .....	10
2.4 Mateřská synchronizace .....	12
2.4.1 Hormonální synchronizace.....	12
2.4.2 Příjem potravy .....	13
2.4.3 Světelný režim.....	14
2.5 Teplota.....	15
2.5.1 Cirkadiánní rytmus tělesné teploty.....	15
2.5.2 Vliv teploty na periferní hodiny.....	15
2.5.3 Vliv teploty na SCN .....	16
2.5.4 Molekulární regulace teplotní odpovědi.....	19
3 Hypotéza a cíle práce .....	22
4 Metody a postup.....	23
4.1 Chov zvířat .....	23
4.2 Přístrojové vybavení.....	24
4.3 Seznam použitých chemikálií.....	24
4.4 Postup přípravy médií a roztoků .....	25

4.5	Postup pro získání organotypických explantů.....	26
4.6	Záznam bioluminiscenční aktivity pomocí přístroje LumiCycle.....	27
4.7	Rozpis jednotlivých teplotních experimentů.....	28
4.8	Analýza dat v programu LumiCycle Analysis a GraphPad Prism .....	32
4.9	Výpočet teplotní kompenzace .....	33
5	Výsledky .....	34
5.1	Vliv teplotního pulzu na fetální hodiny v SCN.....	34
5.2	Vliv teplotního cyklu na fetální hodiny v SCN.....	37
5.3	Vliv tří teplotních cyklů na fetální hodiny v SCN .....	41
5.4	Vliv aplikace kvercetinu na parametry cirkadiálních hodin E17 SCN.....	46
5.5	Teplotní kompenzace.....	47
6	Diskuze .....	49
6.1	Vliv teplotního pulzu na fetální hodiny v SCN.....	49
6.2	Vliv teplotních cyklů na fetální hodiny v SCN .....	50
6.3	Vliv kvercetinu na teplotní odpověď fetálních SCN.....	51
6.4	Teplotní kompenzace ve fetálních a dospělých SCN .....	52
6.5	Limitace.....	53
7	Závěr .....	54
8	Literatura.....	55

## Seznam zkratek

AVP	arginin-vazopresin
BMAL1	angl. Brain and muscle Arnt-like protein-1
CIRBP	angl. cold-inducible RNA-binding protein
CK1 $\epsilon/\delta$	kasein kinázy 1 $\epsilon/\delta$
CLOCK	angl. Circadian locomotor output cycles kaput
CRY1,2	angl. Cryptochrome
CT	cirkadiánní čas (circadian time)
DBP	D-box vázající PAR bZIP
DEX	dexametason
dmSCN	dorzomediální suprachiasmatické jádro
dSPZ	subparavenikulární zóna
E17	17. embryonální den
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC	glukokortikoidy
HSF1	angl. heat shock factor 1
HSE	angl. heat shock element
KNK437	inhibitor proteinu heat shock factor 1
LD 12:12	režim 12 hodin světla (L) a 12 hodin tmy (D)
LL	režim stálého světla
LUC	luciferáza
MPOA	mediální preoptická oblast
NR1D1,2	(REV-ERB $\alpha$ , $\beta$ ) jaderný receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 1/2
NR1F1	(ROR $\alpha$ ) retinoidní sirotčí receptor $\alpha$
PER1,2	angl. Period
PERK	angl. protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PKR	angl. protein kinase R
POA	preoptická oblast hypotalamu
Q	kvercetin

RBM3	angl. RNA-binding motif protein 3
RHT	retinohypotalamický trakt
RORE	ROR response element
SCN	suprachiasmatická jádra
SD	směrodatná odchylka
SHH	sonic hedgehog
TP	teplotní pulz
TTX	tetrodotoxin
VEH	vehikulum
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
VLPO	ventrolaterální preoptická oblast
vlSCN	ventrolaterální SCN

# 1 Úvod

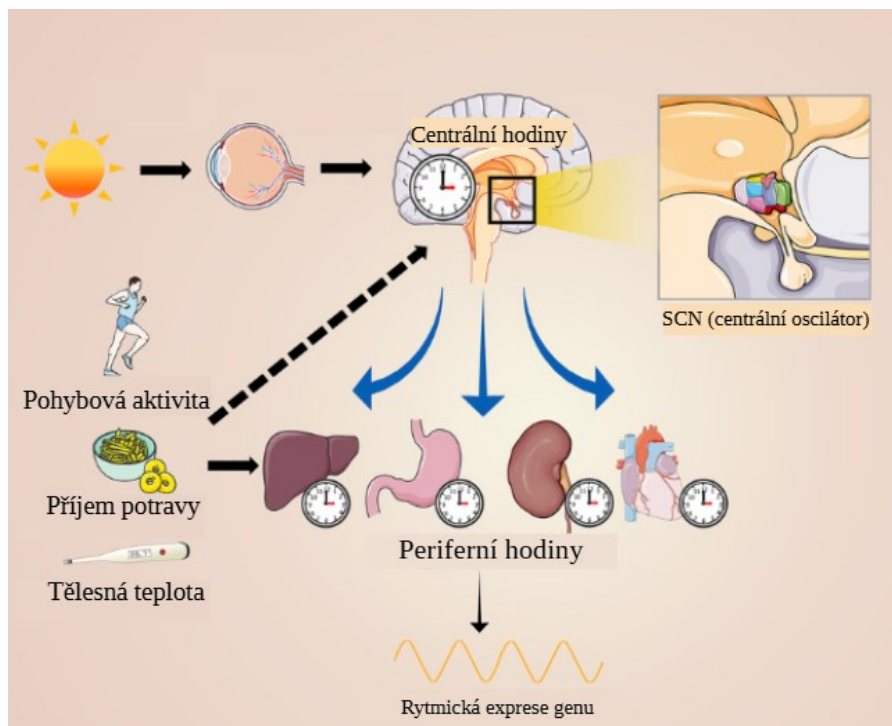
Cirkadiánní rytmy v těle umožňují organismům přizpůsobit se cyklickým změnám v prostředí jako je střídání dne a noci nebo změna teploty. Tyto rytmy jsou generovány vnitřními biologickými hodinami, které fungují autonomně a pomocí vnějších časových signálů jsou seřizovány na 24 hodin přesně. Suprachiasmatická jádra (SCN) v mozku slouží jako centrální hodiny, které jsou synchronizovány světelnými signály a řídí aktivitu periferních hodin v ostatních tkáních těla. Vývoj savčích SCN začíná již v prenatálním období v těle matky, bez přímé informace o světelných podmínkách. V této fázi proto sehrávají klíčovou roli nesevětelné mateřské signály, jako jsou hormonální fluktuace nebo příjem potravy. Otázkou je, zda by potenciálním synchronizačním signálem mohla být i tělesná teplota matky. Přestože dospělé SCN je vůči změnám teploty odolné, dosavadní výzkumy naznačují, že tato rezistence je způsobena přítomností propojených neuronových sítí, které během fetálního vývoje nejsou dostatečně vyvinuty (Buhr et al., 2010). Zároveň je dospělé SCN silně teplotně kompenzované – rytmy si udržují stabilní periodu přibližně 24 hodin i při změnách teploty. Tato vlastnost je klíčovým rysem cirkadiánních hodin, ale dosud není jasné, kdy přesně se během vývoje tato schopnost objevuje. Diplomová práce se zaměřuje na citlivost fetálních SCN ke změnám teploty, a zkoumá, zda mateřská tělesná teplota může sloužit jako synchronizační signál během fetálního vývoje SCN. Zároveň se soustředí na otázku, zda fetální SCN ve stádiu E17 již vykazují teplotní kompenzaci.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Cirkadiánní systém savců

Živý organismus je pravidelně vystavován změnám prostředí spojených s rotací Země, jako např. kolísání okolní teploty nebo střídání dne a noci. Cirkadiánní hodiny představují mechanismus, který se vyvinul v tělech organismů v průběhu evoluce a umožňuje jim přizpůsobit se těmto cyklickým změnám. Slovo cirkadiánní pochází z latinských slov *circa* (přibližně) a *diem* (den), což znamená, že tyto rytmy pravidelně oscilují s periodou přibližně 24 hodin. Základní vlastností cirkadiánního systému je schopnost generovat rytmy nezávisle na těchto signálech. Biologické hodiny fungují jako endogenní (vnitřní) oscilátor, který autonomně udržuje přibližně 24hodinový rytmus i za konstantních podmínek (např. ve stálé tmě) bez vnějších časových podnětů (Aschoff, 1981). Pro správné fungování cirkadiánního systému je nezbytná jeho synchronizace pomocí vnějších časových signálů – tzv. *Zeitgeberů*, díky kterým jsou rytmy seřizeny přesně na 24 hodin (Pittendrigh & Daan, 1976). Nejsilnějším vnějším časovým signálem je světlo, mezi další signály patří např. pravidelný příjem potravy nebo pohybová aktivita (shrnuto v Patke et al., 2020). Synchronizované cirkadiánní rytmy vykazují pravidelné oscilace a řídí behaviorální, metabolické a fyziologické funkce včetně cyklu spánku/bdění.

Cirkadiánní systém savců je hierarchicky uspořádán a skládá se z centrálních hodin, uložených v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu, a periferních hodin, které se nachází téměř ve všech tkáních těla. SCN funguje jako hlavní oscilátor, který je synchronizován světelnými signály a prostřednictvím hormonálních, nervových a metabolických drah řídí aktivitu periferních hodin (shrnuto v Mohawk et al., 2012) (*Obr. 1*).



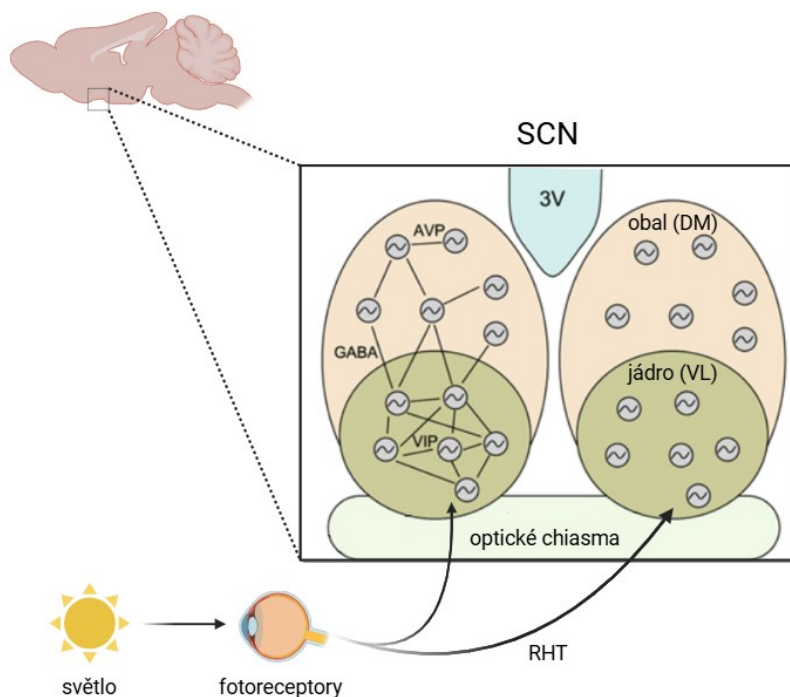
**Obr. 1: Hierarchické uspořádání cirkadiálního systému.** Centrální hodiny v suprachiasmatických jádrech (SCN) fungují jako hlavní oscilátor. SCN přijímá světelné signály a dochází k synchronizaci centrálních hodin s cyklem dne a noci. Periferní hodiny jsou řízeny signály z SCN, ale také dalšími vnějšími faktory, jako je pohybová aktivita, příjem potravy nebo změny tělesné teploty. Převzato a upraveno podle (Zhang et al., 2022).

### 2.1.1 Centrální hodiny

Cirkadiální systém savců je primárně řízen SCN v hypothalamu, které má úlohu hlavního „pacemakeru“ organismu a koordinuje cirkadiální rytmy fyziologických a behaviorálních procesů (R. Moore & Eichler, 1972). SCN je umístěno nad křížením optických nervů v přední části hypothalamu, což mu umožňuje příjem informací z okolního prostředí prostřednictvím retinohypotalamického traktu (RHT) (R. Moore & Lenn, 1972), který přenáší signály o světle z fotoreceptorových gangliových buněk sítnice obsahujících melanopsin přímo do SCN (Berson et al., 2002) (Obr. 2).

U hlodavců je SCN tvořeno přibližně 20 000 neurony a gliovými buňkami (Van den Pol, 1980). SCN obsahuje dvě strukturálně a funkčně odlišné subpopulace neuronů: ventrolaterální část (VL nebo vlSCN), která je schopna reagovat na světelné signály a označuje se jako „jádro“ SCN, a dorsomediální část (DM nebo dmSCN) tvořící tzv. „obal“ (Leak et al., 1999; Morin & Allen, 2006), která vykazuje spontánní oscilace. Světelné signály přijímané

vlSCN jsou předávány do dmSCN, což umožňuje vzájemné sladění a koordinaci těchto oblastí (Gu et al., 2016). Neurony v každé části SCN produkují specifické neurotransmitery: vlSCN produkuje zejména vasoaktivní intestinální peptid (VIP), zatímco dmSCN produkuje především arginin-vazopresin (AVP) (Inouye & Charpentier, 1996; R. Y. Moore et al., 2002). Kyselina  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) je exprimována v obou oblastech (R. Y. Moore et al., 2002). VIP je důležitý především pro synchronizaci buněk mezi oběma oblastmi SCN (Aton et al., 2005) a společně s GABA zajišťuje propojení mezi jednotlivými neurony (R. Y. Moore a Speh, 1993; Aton et al., 2006) (Obr. 2). Protože každý neuron funguje jako autonomní oscilátor (Welsh et al., 1995), interakce mezi těmito neurotransmitery pomáhá udržovat konzistentní synchronizaci a tvořit komplexní neuronální síť na úrovni SCN jako celku (Aton et al., 2005, 2006).



**Obr. 2: Struktura a synchronizace SCN.** 3V = třetí mozková komora, DM = dorzomediální část, VL = ventrolaterální část, AVP = arginin-vazopresin, GABA = kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, VIP = vasoaktivní intestinální peptid, RHT = retinohypotalamická dráha. Upraveno a převzato podle (Hafner et al., 2012).

### 2.1.2 Periferní hodiny

SCN vysílá své signály k periferním oscilátorům, což jsou cirkadiánní hodiny v tkáních v ostatních částech těla – např. játra, ledviny nebo svaly. Rytmičná exprese hodinových genů byla pozorována napříč téměř všemi buňkami v těle savců a bylo prokázáno, že pokud jsou tyto buňky z tkání udržované v buněčné kultuře, vykazují endogenní cirkadiánní rytmy a fungují autonomně i bez přítomnosti SCN (Yoo et al., 2004). Cirkadiánní rytmy v periferních tkáních jsou tak řízeny jak systémovými signály přicházejícími z SCN, tak autonomními periferními hodinami jednotlivých orgánů, které reagují na specifické lokální signály (Mohawk et al., 2012) (*Obr. 1*). Hlavním úkolem SCN tedy je, aby buněčné oscilátory v periferních tkáních byly synchronizovány a nastaveny podle aktuální fáze denního cyklu (Buijs et al., 2003).

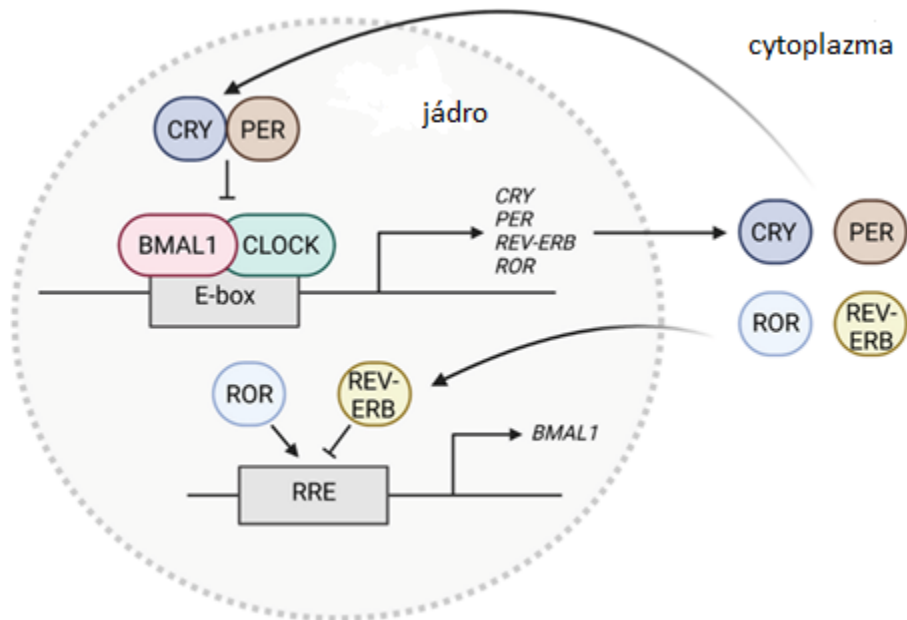
### 2.1.3 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin

Hlavními komponentami cirkadiánního oscilátoru v každé buňce jsou hodinové geny. Proteiny a transkripty těchto genů vytvářejí síť transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček, které se navzájem regulují (Lowrey & Takahashi, 2004). Mezi základní geny těchto smyček patří *Clock* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), *Bmal1* (Brain and Muscle Arnt-Like protein 1), *Period 1* (*Per1*), *Period 2* (*Per2*), *Period 3* (*Per3*), *Cryptochrome 1* (*Cry1*), *Cryptochrome 2* (*Cry2*), *Rev-erba*, *Rora* a *CK1 $\epsilon/\delta$*  (*kasein-kinasa 1  $\epsilon/\delta$* ) (Bae et al., 2001; Bunger et al., 2000; Kume et al., 1999).

Proteiny CLOCK a BMAL1 spolu interagují a vytvářejí heterodimerní komplex, který je poté translokován do jádra a váže se na specifickou sekvenci DNA, tzv. E-box, který reguluje expresi dalších hodinových genů. Po navázání komplexu BMAL1:CLOCK na E-box dochází k aktivaci transkripce hodinových genů *Per* a *Cry* (Gekakis et al., 1998; Hogenesch et al., 1998). Proteiny PER a CRY se hromadí v průběhu dne v cytoplazmě a rovněž spolu vytvářejí heterodimerní komplexy. Hladinu komplexu PER:CRY v cytoplazmě kontrolují kaseinové kinázy CK1 $\epsilon$  a CK1 $\delta$  a rozhodují o cílovém osudu komplexu (Akashi et al., 2002). PER:CRY se následně translokuje do jádra a inhibuje vlastní transkripci vyvázáním komplexu CLOCK:BMAL1 z oblasti E-boxu (Kume et al., 1999). Komplex PER:CRY je na konci dne degradován E3 ubiquitinligázami, a komplex CLOCK:BMAL1 může opět aktivovat přepis genů *Per* a *Cry* (Busino et al., 2007; Reischl et al., 2007) (*Obr. 3*).

Dalšími důležitými komponentami cirkadiánního oscilátoru, které jsou také řízeny komplexem CLOCK:BMAL1, jsou jaderné receptory *Rors* (retinoic acid orphan receptors) a *Rev-erba* (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1; *Nr1d1*). Proteiny ROR $\alpha$  a REV-

ERB $\alpha$  mají schopnost se navázat na specifickou sekvenci v promotoru genu *Bmal1*. Pokud se na sekvenci RORE (ROR-response element) naváže REV-ERB $\alpha$ , dochází k inhibici exprese proteinu BMAL1 (Preitner et al., 2002). ROR $\alpha$  aktivuje transkripci *Bmal1* a vytváří se komplex CLOCK:BMAL1 (Sato et al., 2004) (Obr. 3). Obě smyčky jsou doplňovány dalšími mechanismy (Takahashi, 2016).



**Obr. 3: Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin.** V jádře dochází k tvorbě heterodimeru BMAL1:CLOCK, který se váže na E-box v promotorové oblasti cílových genů (*Per*, *Cry*, *Rev-Erb*, *Ror*) a aktivuje jejich transkripci. Po translaci v cytoplazmě tvoří proteiny PER a CRY heterodimer, který se následně transportuje zpět do jádra, kde inhibuje aktivitu komplexu BMAL1:CLOCK, čímž vytváří negativní zpětnou vazbu. Proteiny ROR a REV-ERB regulují expresi genu *Bmal1* prostřednictvím vazby na RORE (na obrázku RRE). ROR podporuje transkripci *Bmal1*, zatímco REV-ERB ji inhibuje; vzniká další úroveň zpětnovazebné regulace. Převzato a upraveno podle (Son et al., 2024).

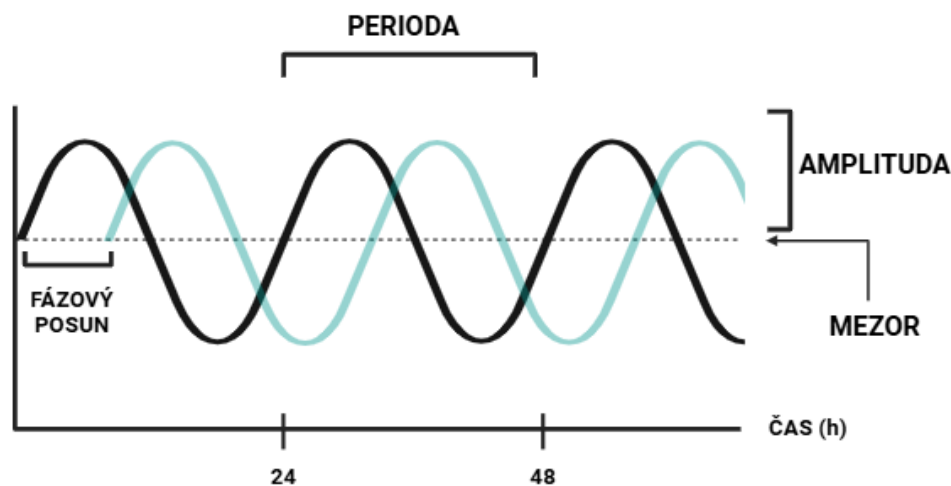
## 2.2 Základní parametry cirkadiálního rytmu

Mezi základní parametry cirkadiálního rytmu patří amplituda, perioda, fáze a mezor (Obr. 4). Amplituda představuje maximální odchylku hodnoty rytmické veličiny od její střední hodnoty (mezor). Vyjadřuje sílu nebo intenzitu oscilace, tedy čím vyšší amplituda, tím robustnější cirkadiální rytmus. Mezor lze chápat jako střední hladinu, okolo které dochází k periodickým změnám hodnoty. Perioda označuje časový interval mezi dvěma stejnými fázemi, například mezi dvěma maximy oscilace. Délka periody cirkadiálních hodin se pohybuje kolem 24 hodin a je druhově specifická. V podmínkách přítomnosti vnějšího synchronizátoru je perioda rytmu seřizena podle jeho periody, například na 24hodinový cyklus

střídání dne a noci. Fáze popisuje aktuální hodnotu proměnné vzhledem k průběhu cyklu ve vztahu k externímu časovému referenčnímu bodu, například ke střídání dne a noci. Obvykle se vyjadřuje relativně k určitému pevnému bodu, například k začátku subjektivní noci nebo k maximální hodnotě rytmu (akrofázi) (Refinetti, 2016).

Fázový posun nastává, když se časová poloha fáze rytmu změní v důsledku působení externího podnětu, například změny světelného režimu. Pokud fáze rytmu nastává dříve než před vystavení podnětu, mluvíme o fázovém předběhnutí (phase advance), pokud naopak nastává později, označuje se jako fázové zpoždění (phase delay).

Tyto parametry umožňují kvantifikovat vlastnosti cirkadiálního systému a analyzovat jeho reakce na různé vnější i vnitřní faktory.



*Obr. 4: Parametry cirkadiálního rytmu. Vytvořeno pomocí BioRender.com*

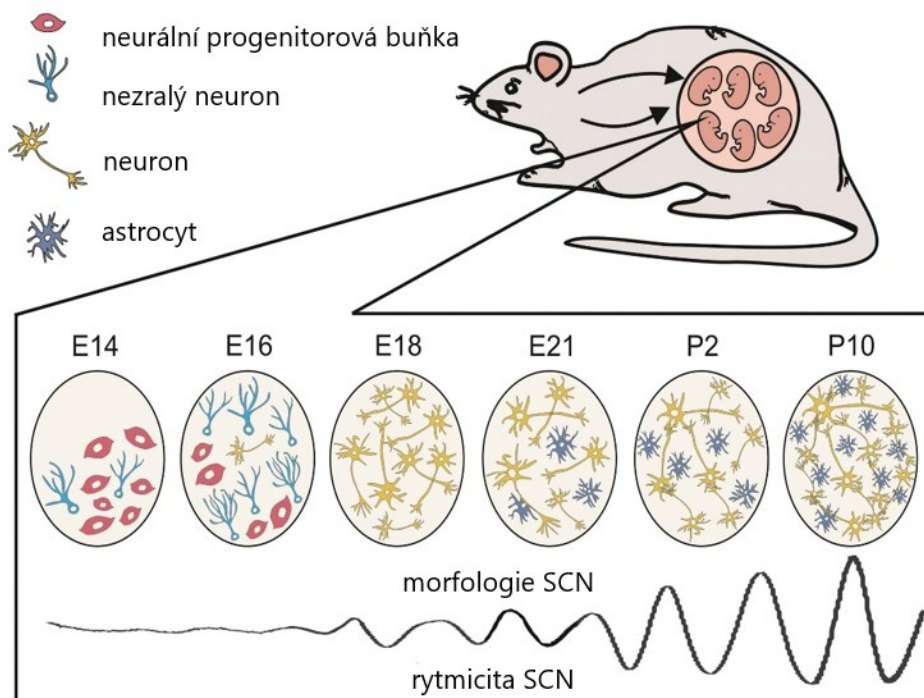
### 2.3 Ontogeneze cirkadiálního systému

Cirkadiální hodiny se vyvíjí během perinatálního období. Nejlépe prostudovaným modelovým organismem je laboratorní potkan, ale v posledních letech je stále více využívána jako model také laboratorní myš. Vývoj SCN a cirkadiálních hodin je složitý proces, který probíhá během perinatálního i postnatálního období a je řízen jak endogenními mechanismy, tak mateřskými signály. Zatímco SCN vykazuje první známky rytmicity již prenatálně, jeho plná funkčnost se vyvíjí až po narození (shrnuto ve Wong et al., 2022). U periferních tkáních se známky rytmicity objevují také před narozením (shrnuto v Olejniczak et al., 2023).

Ve srovnání se znalostmi o cirkadiánních rytmech dospělých jedinců, je jejich časná ontogeneze stále málo prozkoumána. Otázkou zůstává, kdy během vývoje začnou centrální cirkadiánní hodiny fungovat jako hlavní oscilátor regulující rytmy na všech úrovních, a jak silný je vliv faktorů prostředí, které tento vývoj ovlivňují. Následující kapitoly se budou snažit přiblížit téma vývoje centrálních hodin na jednotlivých úrovních.

### **2.3.1 Vývoj cirkadiánního systému na tkáňové úrovni**

Březost u myši trvá přibližně 19–20 dní. Vývoj SCN probíhá od shluku nediferencovaných buněk k vysoce diferencovaným, vzájemně propojeným a synchronizovaným sítím buněk (Kabrita & Davis, 2008). Neurogeneze SCN začíná 12. den embryonálního vývoje (E12) a končí mezi E14–E15. Proces probíhá podle časoprostorového vzorce – nejprve se tvoří buňky tzv. jádra (vlSCN), následně ve dnech E13,5–E14,5 dochází k obklopení jádra dalšími buňkami za vzniku tzv. obalu (dmSCN) (Kabrita & Davis, 2008). Březost laboratorního potkana trvá zhruba 22 dní. Neurony v SCN začínají vznikat z ventrálního diencefalického zárodečného epitelu v době E14 a neurogeneze pokračuje až do E17 (Bayer & Altman, 1987). Po dokončení neurogeneze není SCN plně funkční z důvodu nízkého počtu synapsí mezi neurony. To potvrzuje elektrická aktivita neuronů v SCN, která vykazuje slabý rytmický vzorec ve stádiu E22, přičemž jeho amplituda postupně narůstá až do P14 (Shibata & Moore, 1987). Synaptogeneze a zrání neuronů pokračuje i postnatálně a je dokončeno v P10 (R. Y. Moore & Bernstein, 1989), kdy je SCN morfologicky plně vyvinuté (shrnuto v Sumová & Čečmanová, 2020) (*Obr. 5*).



**Obr. 5: Vývoj SCN u potkana.** Vývoj cirkadiánní rytmicity na tkáňové úrovni probíhá souběžně s morfologickým dozráváním SCN. Znázorněné šipky představují působení mateřských signálů na fetální SCN. Upraveno a převzato podle (Sumová & Čechmanová, 2020).

### 2.3.2 Vývoj cirkadiánního systému na molekulární úrovni

Na molekulární úrovni dochází během vývoje k aktivaci hodinových genů a vzniku transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček, které jsou základním mechanismem pro fungování cirkadiánního rytmu. Ve stádiu pluripotentních kmenových buněk není oscilace hodinových genů přítomná – během diferenciaci v kultuře dochází k vývoji zpětnovazebných smyček hodinových genů samovolně a po de-diferenciaci těchto buněk pomocí faktorů *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, a *c-Myc* došlo k vymizení oscilací hodinových genů (Yagita et al., 2010). Vznik funkčních molekulárních hodin je úzce spojen se správným průběhem buněčné diferenciaci (Umemura et al., 2017).

Exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock* je v SCN potkana detekovatelná již před E19, ale jejich rytmické oscilace se objevují až později. Zároveň ani hladiny proteinů PER1, PER2 a CRY1 nevykazují žádné cirkadiánní změny (Sládek et al., 2004). Nedávná transkriptomická analýza fetálních SCN potkana odhalila přítomnost rytmů na úrovni genové exprese již v E19 při současné absenci rytmů v expresi hodinových genů. Toto zjištění naznačuje, že fetální SCN vykazuje rytmickou aktivitu ještě před vznikem vlastního

molekulárního oscilátoru. Tyto rytmy jsou tedy pravděpodobně indukovány mateřskými signály a nejsou výsledkem autonomní aktivity SCN (Greiner et al., 2022).

V E20–E21 se v SCN potkana objevuje první rytmus v expresi hodinového genu *Per1* s velmi nízkou amplitudou u potkanů (Houdek & Sumová, 2014; Kováčiková et al., 2006). Rytmus v expresi genů *Per1* a *Per2* je prokazatelný od prvního postnatálního dne (P1), tedy po porodu (Kováčiková et al., 2006). V P3 vykazují cirkadiánní rytmus exprese genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, a *Bmall*, amplituda rytmů těchto hodinových genů stoupá a nabývá robustnosti do stádia P10, kdy oscilace v expresi genů dosahují vývojové úrovně dospělého potkana (Sládek et al., 2004).

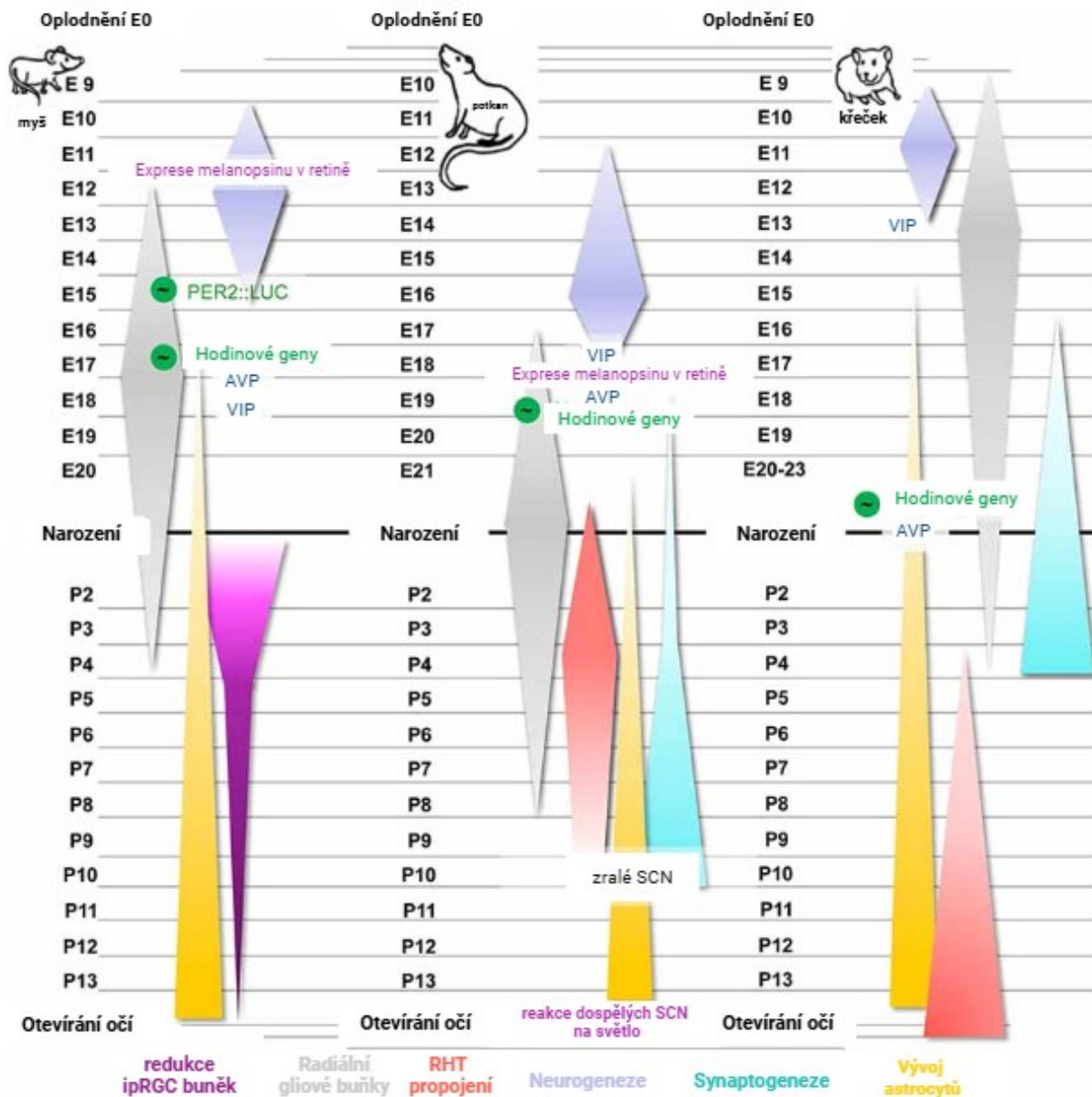
První známky rytmicity u myši se objevují mezi E14,5–E15,5, ale pouze na úrovni jednotlivých buněk SCN, které vykazují oscilaci v rytmu PER2 bioluminiscence v *in vitro* tkáňové kultuře (Carmona-Alcocer et al., 2018). Ve vzorcích SCN odebraným myším v časovém sledu během dne byly první známky rytmické exprese genu *Per1* zaznamenány v E17, kdy byl detekován rytmus exprese tohoto genu na rozhraní dne a noci (Shimomura et al., 2001). Geny *Clock*, *Bmall* a *Cry* nevykazovaly žádnou rytmicitu během prenatálního vývoje a jejich rytmické oscilace se vyvíjely až po narození, s vrcholem kolem P10 (Ansari et al., 2009).

Kromě hodinových genů byly také zkoumány geny řízené cirkadiánními hodinami, jako je *Avp* (arginin-vasopresin). V E20 byla detekována exprese heteronukleární RNA *Avp*, avšak bez rytmu, přičemž první rytmus v expresi *Avp* mRNA byl detekován až v E21. Tento rytmus se zřetelně dále formuje od P1 a postupně se s věkem vyvíjí (Kováčiková et al., 2006).

### 2.3.3 Vývoj cirkadiánních rytmů na systémové úrovni

Maturace vstupních a výstupních drah do SCN je klíčová pro přenos a zpracování časových signálů spolu s koordinací cirkadiánních rytmů. Propojení mezi retinou a SCN prostřednictvím retinohypotalamické dráhy (RHT) může být jedním z klíčových událostí pro vývoj cirkadiánního systému. Melanopsinové gangliové buňky (ipRGCs), které přenášejí světelné signály do SCN, se vyvíjejí a dozrávají mezi stádii E11 a E18, přičemž citlivost na světelný signál byl zaznamenán již v P1 (Matějů et al., 2010). To znamená, že tyto buňky jsou schopné detekovat světlo z okolního prostředí ještě před otevřením očí mláďat (Schmidt et al., 2008). Kromě retinálních signálů přicházejí do SCN také další vstupy, které zprostředkovávají informace o nesvětelných signálech. U hlodavců tyto vstupy dozrávají ve stejnou dobu jako dráha RHT, je dokonce možné, že vývoj obou těchto drah je na sobě vzájemně závislý

(Pinato et al., 2009). Ontogeneze cirkadiálního rytmu laboratorních hlodavců (myš, potkan a křeček) je přehledně shrnuta na obrázku níže (Obr. 6).



**Obr. 6: Průběh vývoje SCN u myši, potkana a křečka znázorněn od okamžiku oplodnění (E0) do P13–P14.** Symbol zeleně zakroužkované vlny značí rytmicitu hodinových genů nebo rytmus *Per2* bioluminiscence. Modrá oblast představuje průběh neurogeneze, tyrkysová označuje období synaptogeneze, kdy dochází k tvorbě synaptických spojení mezi neurony v SCN. Šedá oblast znázorňuje vývoj radiálních gliových buněk, které hrají důležitou roli při tvorbě nervových spojení v SCN, fialová oblast označuje redukci ipRGC buněk, červená oblast představuje tvorbu RHT spojení, které přenášejí informace o světle ze sítnice do SCN. Žlutá oblast označuje vývoj astrocytů, které podporují funkci neuronů. AVP = arginin vasopresin, VIP = vasoaktivní intestinální peptid. Převzato a upraveno podle (Landgraf et al., 2014).

## 2.4 Mateřská synchronizace

Fetální hodiny se vyvíjí autonomně (Jud & Albrecht, 2006), ale jejich nastavení je výrazně ovlivněno mateřskými signály, které hrají klíčovou roli. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole (viz 2.3.2. *Vývoj cirkadiánního systému na molekulární úrovni*), byla zjištěna rytmická exprese řady genů ve fetálních SCN ještě předtím, než se vyvinuly jejich hodinové mechanismy, tudíž se dá předpokládat, že tyto geny byly řízeny rytmickými signály od matky (Greiner et al., 2022). Mateřské signály působí jako tzv. *Zeitgebers* a synchronizují cirkadiánní hodiny plodu s matkou během prenatálního vývoje. Chirurgické odstranění mateřského SCN u potkanů nebo genetická delece hodin (*Per1/Per2* double knockout) u myši prokázaly, že absence mateřských signálů během těhotenství snižuje synchronizaci rytmů mezi jednotlivými plody ve vrhu (Jud & Albrecht, 2006; Reppert & Schwartz, 1984).

### 2.4.1 Hormonální synchronizace

Nejprostudovanějšími mateřskými signály, které se podílí na synchronizaci fetálního cirkadiánního systému, jsou hormony.

Melatonin hraje významnou roli v regulaci fetálních cirkadiánních hodin a jeho rytmická produkce v těle matky by mohla ovlivňovat vývoj fetálního SCN. Melatonin je pravidelně produkován epifýzou matky s vysokou hladinou v noci a velmi nízkou hladinou ve dne (Reiter et al., 2014). Melatonin má schopnost procházet fyziologickými bariérami jako je placenta nebo hematoencefalická bariéra (Okatani et al., 1998; Pardridge & Mietus, 1980). Bylo prokázáno, že odstranění epifýzy u březích samic potkana vede k narušení rytmu v exprese *c-Fos* a *Avp* v SCN novorozenech mláďat, a podávání melatoninu těmto matkám během březosti rytmy v SCN mláďat obnovilo (Houdek et al., 2015). Zároveň pokud jsou březí matky primátů vystaveny konstantnímu světlu (LL), je potlačena produkce melatoninu a u plodů dochází k narušení rytmické exprese hodinových genů v SCN. K obnově rytmů opět dochází, pokud je samicím v LL podán melatonin (Mendez et al., 2012). Intravenózně nebo perorálně podaný melatonin u gravidních samic přechází placentou do fetálního krevního oběhu (Naitoh et al., 1998; Okatani et al., 1998), kde působí i přes to, že ve fetálních SCN jsou melatoninové receptory *Mtnr1* a *Mtnr2* exprimovány pouze ve velmi nízké míře (Greiner et al., 2022). *In vitro* experimenty ukázaly, že melatonin může mírně modulovat fázi placentárních hodin v decidua basalis (Lužná et al., 2021) a je také důležitý pro správný vývoj nadledvin plodu (Mendez et al., 2012).

Dalším potenciálním synchronizátorem jsou glukokortikoidy (GC). Studie Čečmanové et al. (2019) zkoumala pomocí *in vivo* a *in vitro* experimentů, jak syntetický analog, dexametazon (DEX), ovlivňuje vývoj a synchronizaci fetálních SCN. *In vitro* aplikace DEX na explanty mateřské a fetální placenty způsobila fázové posuny rytmu v PER2-bioluminiscenci v mateřské části placenty. Fetální část byla arytmiická. Aplikace DEX na tkáňové explanty SCN ve stádiu E15 urychlila vývoj rytmicity během kultivace *in vitro* a v E17 zvýšila amplitudu oscilací a zpomalila její přirozený pokles (angl. *damping*). DEX kromě změny amplitudy také prodloužil periodu cirkadiánních hodin a způsobil fázové posuny, které byly kompletně blokovány antagonistou glukokortikoidního receptoru mifepristonem. *In vivo* experimenty ukázaly, že podání DEX březím samicím vedlo k rychlému snížení hladiny *c-Fos* v SCN plodů už po jedné hodině, zatímco v mateřské i fetální placentě byla hladina *c-Fos* zvýšená. Autoři navrhuje, že placenta hraje klíčovou roli v přenosu GC signálů na plod a jejich synchronizačním účinku na fetální cirkadiánní hodiny (Čečmanová et al., 2019).

Je pravděpodobné, že se na hormonální synchronizaci může kromě výše uvedených podílet více i hormonů (Bates & Herzog, 2020).

#### 2.4.2 Příjem potravy

Jedním z faktorů, který může synchronizovat cirkadiánní hodiny plodu, je pravidelný příjem potravy gravidních potkanů. Weaver a Reppert ve své studii zkoumali fázi rytmu pitného režimu u mláďat, která byla po odstavení od matky chována v konstantní tmě. Gravidním samicím (během E7) byla nejprve provedena léze SCN a následně omezen příjem potravy (během E8–E19) na čtyřhodinové okno mezi 9:00 a 13:00. Po narození byla mláďata odstavena a chována v konstantní tmě a zároveň byl sledován rytmus jejich pitného režimu. Mláďata narozená matkám s časově omezeným přístupem k potravě měla synchronizované cirkadiánní rytmy pitného režimu, aktivity, i tělesné teploty oproti kontrolní skupině, kdy mláďata narozená matkám s odstraněnými SCN a neomezeným přístupem k potravě měla cirkadiánní rytmy vzájemně desynchronizované. Navíc fáze cirkadiánních rytmů mláďat byla synchronizována dobou příjmu potravy nejen v rámci jednoho vrhu, ale také mezi jednotlivými vrhy (Weaver & Reppert, 1989). V této studii byl také proveden experiment s adopcí mláďat, který potvrdil, že k synchronizaci pomocí omezení příjmu potravy dochází již před narozením (Weaver & Reppert, 1989).

Jednou z dalších studií, která poukazuje závislost režimu příjmu potravy na synchronizaci fetálních SCN, je experiment z roku 2010 (Nováková et al., 2010), kdy byly gravidní samice

potkanů rozděleny do dvou hlavních skupin a každá skupina měla nastavené rozdílné světelné podmínky a omezený přísun potravy. První skupina byla pozorována během standardního světelného režimu s 12 h světla a 12 h tmy (LD), druhá skupina v podmínkách stálého světla (LL), tedy bez vnějšího časového signálu. V rámci těchto skupin měly samice buď neomezený přístup k potravě, nebo bylo krmení omezeno na 6 hodin během světlé fáze. Novorozným mláďatům byly v SCN měřeny denní profily v hladinách exprese *c-Fos* a *Avp*. U mláďat narozených matkám chovaným v podmínkách světelného režimu LD omezený přístup k potravě neměl žádný vliv na rytmus exprese *c-Fos* a *Avp*. U skupiny mláďat, jejichž matky byly vystaveny podmínkám LL, byl cirkadiální rytmus v expresi obou genů vyrušen, pokud měly neomezený přístup k potravě, jelikož došlo k desynchronizaci v rámci vrhu mezi mláďaty. Avšak v případě, že matky byly vystaveny režimu časově omezeného krmení, došlo v SCN novorozných mláďat k obnovení cirkadiálního rytmu v expresi *c-Fos* a *Avp*. Tyto experimenty prokázaly, že časově omezené krmení matky může významně ovlivňovat cirkadiální rytmy v SCN vyvíjejících se plodů, zejména při absenci vnějších světelných signálů (Nováková et al., 2010).

Synchronizace fetálních biologických hodin skrze režim potravy je sice jasně prokazatelná, avšak její účinnost výrazně ovlivňují světelné podmínky. To zdůrazňuje složitost vztahu mezi chováním matky, vývojem plodu a vlivy prostředí.

### 2.4.3 Světelný režim

Další z možností, jak zkoumat synchronizaci fetálních hodin, je manipulace se světelnými podmínkami. Fetální SCN není přímo citlivé na světlo, ale přijímá signály z mateřských SCN, jejichž rytmy jsou seřizovány světelným cyklem. V experimentu na ovčích z roku 1996, vedeném skupinou Parraguez et al., vědci zkoumali, jak světelné podmínky mohou ovlivnit kolísání hladin prolaktinu u matek a jejich plodů. Devět březích ovčí bylo vystaveno LL a pět jich bylo vystaveno LD v poměru 14 h světla a 10 h tmy od 10. dne březosti. Výsledky ukázaly, že 24hodinový rytmus prolaktinu v krvi byl přítomen u plodů s režimem LD. U plodů s režimem LL také přetrval 24hodinový rytmus, ale došlo k narušení jejich synchronizace. V LL se fáze rytmu prolaktinu více shodovala mezi dvojčaty než s fázemi rytmů ostatních skupin dvojčat, což naznačuje, že světelný cyklus by mohl být *Zeitgeber* pro cirkadiální rytmus prolaktinu plodu a že matka přenáší tento *Zeitgeber* na plod (Parraguez et al., 1996). V experimentu s laboratorními potkany byly březí samice chované v LD podmínkách vystaveny posunu světelného režimu s nástupem fáze tmy o 6 hodin později. Reakce fetálních SCN na světelný posun závisela na stádiu vývoje, kdy k tomuto posunu došlo. Pokud byl posun

aplikován samicím v E18, novorozená mláďata v době P0–P1 (tedy po 5 dnech) měla rytmy v expresi genu *c-Fos* a *Avp* v SCN také fázově posunuty. Světelný posun aplikovaný ve stádiu E20 nezpůsobil fázové posuny rytmů ihned po narození, ale až později. Výsledek ukázal, že světelný pulz nejprve seřídil hodiny březí samice (během 3 dnů) a teprve následně byly seřizeny hodiny fetů (za 5 dnů) (El-Hennamy et al., 2008).

## 2.5 Teplota

### 2.5.1 Cirkadiánní rytmus tělesné teploty

Přes to, že mají savci schopnost udržovat stálou tělesnou teplotu navzdory okolním teplotám prostředí, dochází ke kolísání tělesné teploty v pravidelném denním rytmu o zhruba 1–4 °C. Tyto cirkadiánní rytmy tělesné teploty jsou řízeny SCN (shrnuto v Refinetti & Menaker, 1992).

Dorzomediální část suprachiasmatického jádra (dmSCN) nejdříve vysílá signály přes dorzální subparaventrikulární zónu (dSPZ) do preoptické oblasti hypothalamu (POA) (Lu et al., 2001; Satinoff, 1978). Preoptická oblast obsahuje dvě podoblasti se specializovanými termosenzitivními neurony, přičemž každá má odlišnou roli (Boulant, 2000). Ventrolaterální preoptická oblast (VLPO) je důležitá hlavně pro regulaci spánku, mediální preoptická oblast (MPOA) se podílí na regulaci tělesné teploty (Lu et al., 2000; shrnuto v Saper et al., 2005). Díky propojení SCN s termoregulačními strukturami v mozku dochází k udržování stabilních cirkadiánních rytmů tělesné teploty (Rothhaas & Chung, 2021).

### 2.5.2 Vliv teploty na periferní hodiny

Tělesná teplota funguje nejen jako výstupní rytmický signál z SCN, ale také jako vstupní signál pro synchronizaci periferních rytmů. Teplotní pulzy a opakované teplotní cykly jsou velmi účinným synchronizačním signálem pro periferní oscilátory. Aplikace 1hodinového a 6hodinového pulzu z 36 °C na 38,5 °C způsobila zvýšení amplitudy cirkadiánní exprese genu a výrazné fázové posuny rytmů s nejvyšším účinkem aplikace teplotního pulzu v době CT 12–18 (Buhr et al., 2010). Velmi účinným synchronizačním signálem periferních oscilátorů jsou teplotní cykly, jejichž účinnost se zvyšuje s počtem opakování (Sládek & Sumová, 2013). Teplotní cykly mohou tak účinně synchronizovat cirkadiánní rytmy ve fibroblastech u spontánně hypertenzních i normotenzních potkanů. Rytmus byl monitorován prostřednictvím exprese genu *Bmal1*. Fibroblasty dospělých potkanů byly vystaveny dvoudenním nebo čtyřdenním po sobě jdoucím teplotním cyklům s oscilací 36 °C a 38,5 °C po 12 hodinách, které způsobily významné fázové posuny. U buněk s tlumenými cirkadiánními oscilacemi dokonce dochází po dvoudenním teplotním cyklu k znovuoobnovení rytmů a navýšení jejich amplitudy.

Navíc kromě obnovení již slabých oscilací dochází i k jejich udržení několik dní po teplotním cyklu (Sládek & Sumová, 2013). V další studii byly fibroblasty dospělých myší vystaveny *in vitro* různým variacím teplotních změn. Výsledky ukázaly, že opakované teplotní cykly v rámci fyziologických teplot (33–37 °C) dokázaly synchronizovat cirkadiánní rytmy exprese hodinových genů a udržet je i po návratu do konstantní teploty (Brown et al., 2002). Byly také provedeny experimenty *in vivo* se změnou okolní teploty, kdy byly dospělé myši vystaveny buď tzv. „přirozeným“ teplotním cyklům s vyšší teplotou přes den (37 °C) a nižší v noci (24 °C), nebo opačným teplotním cyklům, kdy byla okolní teplota přes den nižší a v noci vyšší. U myší vystavených tomuto opačnému teplotnímu cyklu došlo v periferních hodinách jater k posunu rytmů do opačné fáze, tedy v době původního maxima byla exprese genu po teplotní změně na svém minimu (Brown et al., 2002). Ve studii (Saini et al., 2012) zjistili, že částečnou synchronizaci mohou vyvolat i velmi malé teplotní fluktuace s rozdílem o pouhý 1 °C. Kromě výsledků potvrzujících synchronizaci periferních oscilátorů pomocí několikadenních teplotních cyklů se přišlo také na to, že teplotní synchronizace probíhá u každého genu jinou rychlostí (Saini et al., 2012). Zatímco rytmy exprese genu *Per2* byly synchronizovány velmi rychle, rytmy exprese genu *Bmal1* a cirkadiánně regulovaného genu *Dbp* se přizpůsobily teplotním cyklům až po několika dnech.

Periferní hodiny se synchronizují i v případě delší nebo kratší periody než 24 hodin. Fibroblasty dospělých myší byly vystaveny střídání teplot 35,5–38,5 °C po 6, 10, 14, 18, 24, 30, 34, nebo 40 hodinách. Úspěšná synchronizace proběhla v rozmezí period 6–30 hodin, ale efekt na expresi genů byl jen dočasný a po přerušení teplotních cyklů s upravenou periodou rytmy mají tendenci se vracet na svou přirozenou 24hodinovou periodu. Periferní oscilátory tedy mají schopnost se adaptovat na široký rozsah teplot i různou délku periody (Saini et al., 2012).

### 2.5.3 Vliv teploty na SCN

Na rozdíl od periferních hodin je dospělé SCN vůči změnám teploty odolné. Jednou za základních vlastností SCN je schopnost silné teplotní kompenzace – cirkadiánní periody zůstávají stejné bez ohledu na kolísání teploty. Díky tomu jsou cirkadiánní hodiny spolehlivé v různých teplotních podmínkách a mohou správně řídit denní rytmy (Pittendrigh, 1954).

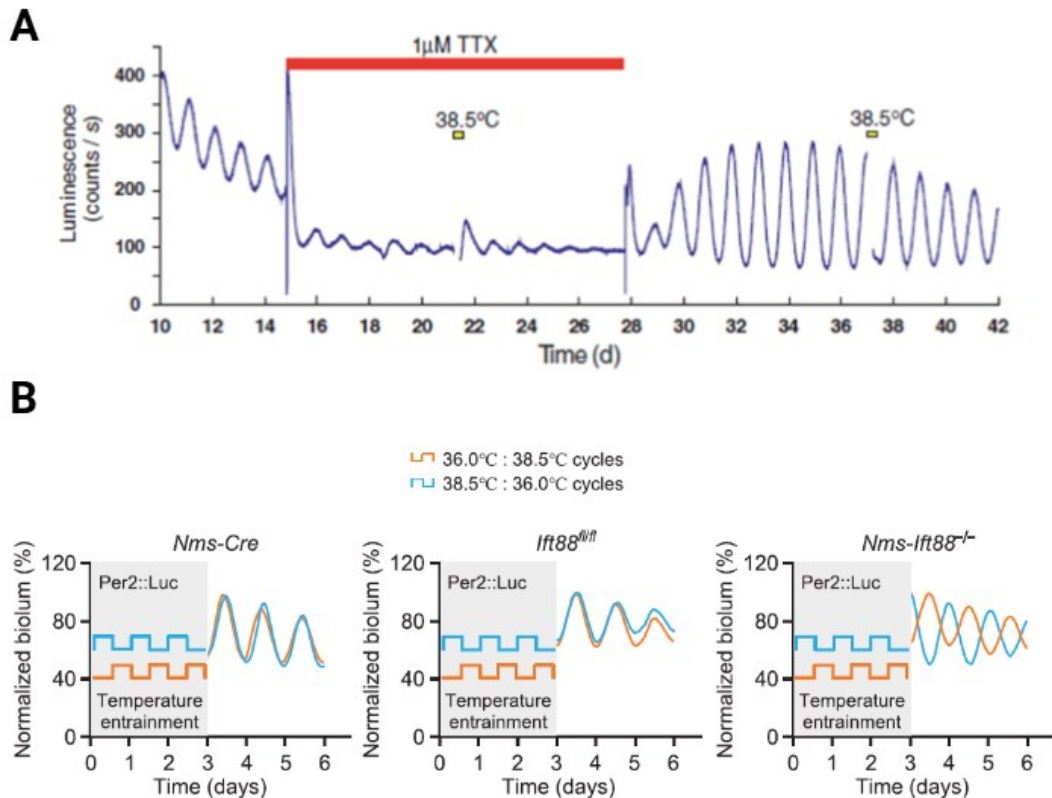
Teplotní kompenzace je velmi konzervovanou vlastností napříč organismy, přesto tento mechanismus není zcela objasněn a v průběhu let bylo navrženo několik hypotéz. Jedna z nich navrhuje tzv. *fosfoswitch* mechanismus, kdy je hodinový protein PER2 fosforylován kinázou

CK1 $\delta/\epsilon$  na svém stabilizačním, nebo degradačním místě v závislosti na okolní teplotě. Fosforylace tedy stabilizuje nebo degraduje protein PER2, čímž dochází k regulaci délky cirkadiánní periody (shrnutí v Narasimamurthy & Virshup, 2017). Nedávná studie z roku 2023 představuje nově faktor CPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6) jako možný regulátor stabilní periody. CPSF6 se podílí na posttranskripčních modifikacích mRNA prostřednictvím polyadenylace. Knockdown tohoto faktoru způsobil narušení teplotní kompenzace v rytmech exprese genů u lidských buněk *in vitro* (Schmal et al., 2023). Míra teplotní kompenzace se vyjadřuje pomocí teplotního koeficientu ( $Q_{10}$ ), jehož hodnota představuje změnu rychlosti biochemické reakce při zvýšení teploty o 10 °C. Zatímco běžné biochemické reakce svoji rychlost zdvojnásobí, až ztrojnásobí ( $Q_{10} = 2-3$ ), SCN vykazují velmi přesnou teplotní kompenzaci s hodnotou  $Q_{10} \approx 1$  (Ruby et al., 1999).

Existují ale studie poukazující na schopnost SCN se podle teplotních změn seřizovat. Neuronální aktivita v SCN dospělých potkanů byla monitorována 3 dny při teplotě 37 nebo 31 °C. Hodnota periody rytmu byla v obou případech teplotně kompenzovaná. Pokud byl ale proveden teplotní pulz z 34 na 37 °C na 2 hodiny, fáze rytmu se posunula až o 4 hodiny (Ruby et al., 1999).

Mechanismy rezistence SCN na změnu teploty zkoumali v roce 2010 Ethan Buhr, Seung-Hee Yoo a Joseph Takahashi. Tato výzkumná skupina ukázala, že po aplikaci tetrodotoxinu (TTX), blokátoru sodíkových kanálů, ztrácí SCN svoji rezistenci a v reakci na teplotní pulz o teplotě 38,5 °C dochází k fázovým posunům rytmu (*Obr. 7 A*). Dále upozornili na rozdíly v teplotní odpovědi ve ventrálních a dorzálních regionech v SCN a jejich závislosti na směru řezu oddělující obě oblasti SCN. Strukturální vlastnosti, buněčná architektura a intracelulární komunikace v rámci SCN zajišťuje jeho rezistenci vůči změnám teploty a odlišuje se tak od periferních oscilátorů (Buhr et al., 2010). To podporují nedávné výsledky výzkumné skupiny (Tu et al., 2023), která zkoumala teplotní citlivost SCN v závislosti na přítomnosti primárních řasinek. Primárními řasinky jsou sensorické buněčné organely vystupující z povrchu buněk a přispívají k buněčnému sjednocení a koordinaci rytmu v SCN (Rohatgi et al., 2007). SCN dospělých myši s absencí řasinek byla vystavena teplotnímu cyklu 36–38,5 °C v denním poměru 12:12 po dobu tří dnů, nebo stejném teplotnímu cyklu v opačné fázi, tedy nejprve s nástupem teploty 38,5 °C. Změna fáze teplotního cyklu vyvolala značné fázové posuny oproti kontrolním SCN, které si zachovaly rytmy stejné. SCN tedy bylo bez primárních řasinek méně rezistentní vůči teplotnímu cyklu, což opět podporuje důležitost mezibuněčného propojení (Tu et al., 2023) (*Obr. 7 B*). Absence primárních řasinek způsobila také narušení exprese

hodinového genu *Bmal1*, a genů *Gli1* a *Ptch1*, zapojených do signalizace Shh (Sonic Hedgehog). Výsledky naznačily, že signalizace Shh zprostředkovaná řasinkami je důležitá pro vzájemné buněčné propojení mezi neurony a jejich synchronizaci (Tu et al., 2023).



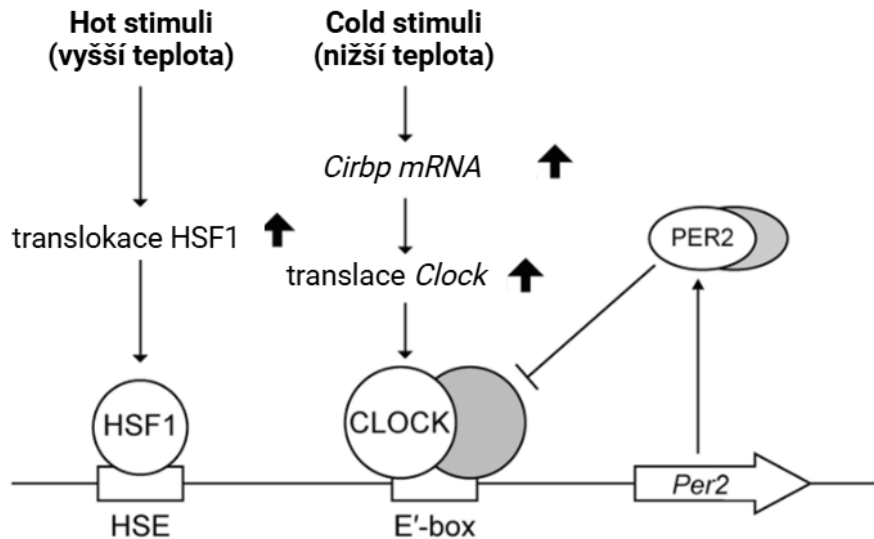
**Obr. 7: Citlivost SCN na teplotní změny (A) na teplotní pulz 38,5  $^{\circ}$ C v případě aplikace tetrodotoxinu (TTX) (B) při absenci primárních řasinek (*Nms-Ift88<sup>-/-</sup>*). Převzato z (Buhr et al., 2010; Tu et al., 2023).**

Herzog et al. (2003) uvádějí, že SCN potkaních novorozenců a mláďat (P1–P19) se dokáže synchronizovat *in vitro* s 24hodinovými teplotními cykly s teplotou v rozmezí 34–37  $^{\circ}$ C, pravděpodobně z důvodu nezralé neuronální sítě (Herzog & Huckfeldt, 2003). Okolní teplota také dokáže ovlivnit SCN a způsobit fázové posuny cirkadiálních rytmů novorozených potkanů. Možným vysvětlením citlivosti na teplotní změny může být vývoj termoregulace a nedokončený vývoj SCN, nebo také závislost na mateřských signálech (Seron-Ferre et al., 2007; Yoshikawa et al., 2013). V *in vivo* experimentu byla mláďata (P1–P5) separována od matky a vystavena třem různým teplotám vnějšího prostředí – 10  $^{\circ}$ C, 20  $^{\circ}$ C a 30  $^{\circ}$ C na 1 nebo 5 dní. Ve stádiu P6 bylo odebráno SCN a sledována bioluminiscenční aktivita genu *Per2*. Fázové posuny se projevily u všech tří případů, nejvíce při teplotě 10  $^{\circ}$ C, při teplotě 20  $^{\circ}$ C a 30  $^{\circ}$ C byly fázové posuny stejné (Yoshikawa et al., 2013). V *in vitro* podmínkách

se při nízkých teplotách rytmy SCN mohou zcela zastavit. Vědci sledovali rytmy exprese hodinových genů a rytmy hladiny vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) v SCN novorozených myší (P5–P6) při různých teplotách (15 °C, 22 °C a 28 °C). Rytmy exprese sledovaných genů a  $\text{Ca}^{2+}$  byly udržovány při teplotách 22 °C a 28 °C, ale byly pozastaveny při 15 °C. Po zpětném zvýšení teploty na 35 °C začaly hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  vykazovat rytmy dříve oproti hodinovému genu *Bmall*. Po ochlazení na 10 °C a zpětném zvýšení teploty na 35 °C nedošlo k obnovení rytmů v hladinách  $\text{Ca}^{2+}$ , ani expresi genu *Bmall*. Výsledky této studie naznačují, že stabilní oscilace  $\text{Ca}^{2+}$  předcházejí rytmům exprese hodinových genů a pomáhají při obnově rytmické exprese genů *Per2* a *Bmall* během nízkých teplot (Enoki et al., 2023). SCN není po narození plně vyvinuté, je tedy možné, že tato odpověď na nízké teploty může být dána nedokonalou signalizací a slabším buněčným propojením (Enoki et al., 2023).

#### 2.5.4 Molekulární regulace teplotní odpovědi

Na molekulární úrovni hraje klíčovou roli v teplotní odpovědi několik regulačních faktorů. Transkripční faktor HSF1 (Heat Shock Factor 1) je klíčový prvek propojující tělesnou teplotu s cirkadiánní expresí genů. Ačkoliv hladina proteinu HSF1 zůstává stále stejná, při vyšší teplotě je HSF1 rytmicky translokován do jádra. Tam se váže na DNA a aktivuje cílový hodinový gen *Per2* (Reinke et al., 2008; Tamaru et al., 2011). Absence HSF1 v myších fibroblastech vyvolala zpožděnou odpověď na teplotní synchronizaci a snížení amplitudy oscilací exprese genu *Bmall* (Saini et al., 2012). V případě krátkého teplotního pulzu (43 °C) dochází ke kompletnímu narušení synchronizace genu *Per2* (Tamaru et al., 2011). Buhr et al. (2010) dokázali, že cirkadiánní rytmy jsou narušeny také při farmakologické inhibici HSF1. Pro narušení byl využit KNK437 (benzylidenlaktamové léčivo) a kvercetin. Oba inhibitory dokázaly zablokovat teplotně podmíněnou synchronizaci při hodinovém teplotním pulzu (38,5 °C) (Buhr et al., 2010). HSF1 není jediný faktor, který se podílí na teplotní synchronizaci cirkadiánních hodin. Dalším klíčovým hráčem v regulaci je CIRBP (cold inducible RNA-binding protein), jehož pre-mRNA je produkována konstantně a následný splicing probíhá v jádře pouze během nižších tělesných teplot (Gotic et al., 2016). Kromě toho se také CIRBP podílí na zvýšeném exportu *Clock* mRNA z jádra (Morf et al., 2012). Absence proteinu CIRBP má za následek pokles *Clock* mRNA v cytoplazmě, což může následně vyvolat zhoršenou stabilitu cirkadiánního rytmu na molekulární úrovni (Morf et al., 2012; shrnuto v Schibler, 2024).



**Obr. 8: Molekulární mechanismus regulace teplotní odpovědi v cirkadiánních hodinách.** Vlivem teplých podnětů (hot stimuli) dochází k translokaci transkripčního faktoru HSF1 (heat shock factor 1) do jádra, kde přes regulační oblasti (HSE) a regulují expresi genu *Per2*. Vlivem chladných podnětů (cold stimuli) dochází k dozrávání *Cirbp* mRNA a tím i regulaci proteinu CLOCK, který se váže na E-box v promotorové oblasti s proteinem BMAL1. Aktivovaný komplex stimuluje expresi genu *Per2*. PER2 následně poskytuje negativní zpětnou vazbu na komplex s proteinem CLOCK, čímž se uzavírá cirkadiánní regulační smyčka. Převzato a upraveno podle (Miyake et al., 2024).

Důležitým regulačním prvkem v teplotní odpovědi je také m-uORF (minimal upstream open reading frame), krátká nekódující sekvence v genu *Per2*, která reguluje jeho translaci. Tento prvek interaguje s ribozomy v závislosti na teplotě a zajišťuje teplotně indukovaný nárůst proteinu PER2 (Miyake et al., 2023). Fibroblasty s neporušeným m-uORF v genu *Per2* vykazovaly robustnější a stabilnější cirkadiánní rytmy exprese proteinu PER2 oproti buňkám s narušeným čtecím rámcem, které vykazovaly oslabené oscilace. Studie uvádí, že m-uORF je důležitá oblast genu *Per2* pro zachování cirkadiánního rytmu při fyziologických teplotních podmínkách. Klíčovou roli v tomto procesu hraje signální dráha PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Inhibice PI3K blokuje translaci proteinu PER2 závislou na teplotě, čímž narušuje synchronizaci cirkadiánních rytmů při simulovaných teplotních cyklech. Tento výsledek zdůrazňuje význam PI3K v teplotní regulaci (Miyake et al., 2023). Stejná skupina o pár měsíců později doplnila poznatky k signální dráze PI3K. Studie identifikuje kinázy PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) a PKR (Protein Kinase R) jako regulátory PI3K v teplotně závislé translaci, protože inhibice těchto kináz ruší teplotně indukovanou expresi *Per2*, což naznačuje jejich nezbytnou roli v tomto procesu. PERK a PKR obvykle fungují

prostřednictvím fosforylace eIF2 $\alpha$ , avšak v této studii není eIF2 $\alpha$  do teplotně indukované translace PER2 zapojen, což naznačuje eIF2 $\alpha$ -nezávislou dráhu. Mechanismus zahrnuje kaskádu PERK/PKR  $\rightarrow$  PI3K  $\rightarrow$  *Per2*, kde PI3K aktivace je downstream událostí regulovanou PERK/PKR, avšak nezávislou na eIF2 $\alpha$  signalizací (Shao et al., 2024).

Hoekstra et al. (2024) zkoumali chladem indukovaný protein RBM3 a jeho interakci s hodinovými geny v SCN. RBM3 (RNA-Binding Motif 3) je RNA-vázající protein, u kterého byl pozorován nárůst exprese při 32 °C a jeho pokles při návratu na teplotu 37 °C. Zároveň došlo k prodloužení periody cirkadiálních oscilací genu *Rbm3* při nižší teplotě a následně ke zkrácení periody během návratu na 37 °C. Během těchto pokusů zůstala perioda i transkripční aktivita hodinového genu *Per2* nezměněná, čímž byla potvrzena stabilita genů cirkadiálního oscilátoru v SCN. Dalším významným objevem byla teplotní odpověď proteinu RBM3 v závislosti na hladině proteinu BMAL1. Delece *Bmal1* v neuronech i astrocytech v SCN myši vedl v obou případech k zastavení teplotní odpovědi při chladu a k oslabení rytmů exprese genu *Rbm3*. To potvrzuje, že gen *Bmal1* je nezbytný pro teplotní regulaci exprese *Rbm3*. Další experimenty ukazují, že absence *Bmal1* narušuje jak synchronizaci oscilací *Rbm3*, tak celkovou prostorovou organizaci neuronálních rytmů v SCN. Při běžné teplotě 37 °C byl rytmus exprese genu *Rbm3* a rytmus hladiny Ca<sup>2+</sup> v SCN se sníženou neuronální expresí genu *Bmal1* synchronizovaný, což se shodovalo s kontrolní skupinou. Při snížení teploty však byla organizace těchto rytmů narušena pouze u SCN s redukovanou expresí genu *Bmal1*. Rytmy měly vysokou variabilitu ve fázi i v periodě mezi různými shluky neuronů (Hoekstra et al., 2024).

### 3 Hypotéza a cíle práce

Výsledky dosavadních experimentů naznačují, že odolnost SCN na teplotní změny je závislá na přítomnosti vyvinutých neuronových sítí v rámci struktury SCN. Během fetálního vývoje jsou tyto sítě nedostatečně vyvinuty. Přímé důkazy o vlivu tělesné teploty matky na vývoj fetálního SCN nejsou v dostupné literatuře jednoznačně popsány. Zároveň je známo, že dospělé SCN vykazují teplotní kompenzaci. Není však dosud jasné, kdy přesně během vývoje k této teplotní kompenzaci dochází a v jaké fázi vývoje SCN tato schopnost vzniká.

Na základě výše uvedených poznatků byla v této práci testována hypotéza, že mateřské signály během těhotenství synchronizují biologické rytmy a pomáhají při vývoji fetálních SCN pomocí změny tělesné teploty matky, která může představovat další potenciální synchronizační signál pro vyvíjející se fetální hodiny v SCN.

Byly stanoveny následující cíle:

1. Prozkoumat, zda a jak změny teploty synchronizují hodiny ve fetálních SCN.
2. Zjistit, zda jsou fetální cirkadiánní rytmy teplotně kompenzované a případně v jaké fázi vývoje tato schopnost vzniká.

## 4 Metody a postup

### 4.1 Chov zvířat

Pro experimenty byly použity dospělé myši a gravidní samice myšního transgenního modelu *mPer2<sup>Luc</sup>* (kmen. B6.129S6-*Per2<sup>tm1Jt</sup>/J*, JAX, USA). V myším modelu je hodinový gen *Per2* zfúzován s luciferázovým reportérem (PER2::LUC). Luciferáza je enzym, který katalyzuje oxidaci luciferinu a v průběhu této reakce dochází k emisi světla. Takto geneticky modifikovaný myší model umožňuje sledování cirkadiálních rytmů v reálném čase. Znamená to, že je možné sledovat genovou expresi hodinového genu *Per2* pomocí bioluminiscence.

Myši byly chovány při teplotě  $23 \pm 2$  °C se světelnými podmínkami LD 12:12, řízenými automatickým vypínačem, který ovládal denní osvětlení od 7:00 do 19:00. Samice byly chované odděleně v boxech, byl jim umožněn pitný a krmný režim *ab libitum*.

Zabřezávání samic bylo prováděno metodou plánovaného připouštění, tedy na základě monitorování estrálního cyklu samic a správného načasování připuštění samců k samicím tak, aby odběru proběhly 17. den od početí. Pokud bylo oplodnění úspěšné a po kontrolním vaginálním výplachu byla přítomnost spermií pozitivní, byl tento den považován za embryonální den E0. Samice byly dále chovány ve stejných podmínkách, porod myších mláďat nastává okolo dne E21. Pro všechny experimenty v této práci byly féty odebírány v E17.

Veškeré experimenty na zvířatech byly provedeny v souladu se Zákonem č. 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, Vyhláškou č. 419/12 Sb. o ochraně pokusných zvířat České republiky a Směrnicí Rady Evropského společenství 86/609/EEC. Všechny pokusy byly schváleny Komisí pro péči o zvířata a jejich použití Fyziologického ústavu. Při provádění experimentů byla věnována maximální péče minimalizaci utrpení zvířat a dodržování etických zásad jejich ochrany.

#### 4.2 Přístrojové vybavení

- **analytické váhy**, ABJ 220-NM (KERN, Německo)
- **inkubátor pro přístroj LumiCycle**, Incubator KB 115 (Binder, Německo)
- **inkubátor pro explanty**, Incubator BD 53 (Binder, Německo)
- **laminární box**, Safe Flow 1.2 Biohazard box (Bioair, Itálie)
- **LumiCycle**, LumiCycle 32 (Actimetrics, USA)
- **magnetická míchačka**, ARED heating magnetic stirrer high power (VELP Scientifica, Itálie)
- **mechanický sekáček**, 51425 Tissue Slicer (Stoelting Co., USA)
- **mikroskop**, NIB-100 (Novel optics, Čína)
- **osmometr**, Osmomat 3000 basic – Freezing point osmometer (Gonotec, Německo)
- **pH metr**, pHenomenal pH 1100L (VWR, USA)
- **přístroj pro výrobu demineralizované vody**, IWA 20iol (WATEK, Česká republika)
- **vodní lázeň**, Termostat GD 120 (Grant Instruments, Velká Británie)

#### 4.3 Seznam použitých chemikálií

- **B27**, B-27<sup>TM</sup> Supplement (50X), serum free (Gibco, USA)
- **ddH<sub>2</sub>O**, destilovaná deionizovaná voda (WATEK, Česká republika)
- **DMEM**, Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
- **DPBS**, Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, USA)
- **Ethanol 96%** (Penta, Česká republika)
- **Glukóza**, D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, USA)
- **GlutaMAX**, GlutaMAX<sup>TM</sup> Supplement (100×) (Gibco, USA)
- **HCl**, Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- **HEPES**, HEPES solution (Sigma-Aldrich, USA)
- **Kvercetin**, Quercetin (Sigma-Aldrich, USA)
- **Luciferin**, D-Luciferin (Biosynth, Švýcarsko)

- **NaCl**, Chlorid sodný p.a. (Penta, Česká republika)
- **NaHCO<sub>3</sub>**, Sodium bicarbonate solution 7,5% (Sigma-Aldrich, USA)
- **NaOH**, Hydroxid sodný 98% (Lach-Ner, Česká republika)
- **penicilin-streptomycin**, Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)

#### 4.4 Postup přípravy médií a roztoků

Příprava všech uvedených roztoků a médií probíhala v laminárním boxu, aby byla minimalizována možnost kontaminace vzorků. Složení jednotlivých médií je shrnuto v *Tab. 1*.

##### **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)**

Pro přípravu HBSS média bylo zapotřebí 500 ml DPBS, 5ml 1M HEPES a 2,5 ml 7,5% NaHCO<sub>3</sub>. Tyto složky byly smíchány do reagenční láhve. Byla změřena hodnota pH roztoku pomocí pH metru. V případě potřeby bylo médium upraveno přidáním 2M NaOH nebo 2M HCl k dosažení výsledné hodnoty pH 7,2. Médium bylo uchováno v teplotě 6 °C.

##### **AIR médium STOCK (vzduchem pufrované nahrávací médium, zásobní roztok)**

Z přístroje na výrobu ddH<sub>2</sub>O byl odebrán 1 litr redestilované a filtrované vody, ze kterého bylo 850 ml přeneseno do skleněné kádinky. Zbývající objem byl uchován stranou pro pozdější použití. Za stálého míchání na magnetické míchače bylo do kádinky přidáno 8,3 g DMEM a 4,5 g glukózy, poté se směs míchala do úplného rozpuštění. Bylo přidáno 10 ml 1M HEPES, 4,7 ml 7,5% NaHCO<sub>3</sub> a 10 ml směsi antibiotik penicilin-streptomycin. Pro správnou hodnotu pH bylo podle potřeby přidáno 2M NaOH nebo 2M HCl na výslednou hodnotu pH 7,2. Následně byl přidán zbývající objem ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu jednoho litru a celý roztok byl ještě několik desítek sekund promíchán v míchače. Pro minimalizaci kontaminace bylo médium přefiltrováno přes nádobu s póry o velikosti 0,2 μm pomocí vakuového odsávání a následně uloženo do lednice o teplotě 6 °C.

##### **AIR médium pro SCN (vzduchem pufrované nahrávací médium pro SCN, pracovní roztok)**

Do 50ml Falconovy zkumavky bylo přidáno 48 ml zásobního roztoku AIR média, 500 μl GlutaMAX (100x), 1000 μl B-27 a 50 μl 0,1M luciferinu. Z tohoto roztoku se odebralo 50 μl pro kontrolu osmolarity pomocí osmometru a případně byla upravena na 285–315 mOsm/kg přidáním 5,3M NaCl. Poté bylo médium přefiltrováno přes 0,22 μm filtr. K tomu byla použita

50ml plastová injekční stříkačka, přes kterou bylo médium protlačeno filtrem do nové Falconovy zkumavky. Hotové médium bylo uloženo v teplotě 6 °C.

Tab. 1: Seznam použitých médií a jejich složení.

Název	Složení média a množství použitých látek
<b>HBSS médium</b>	DPBS - 500 ml 1M HEPES - 5 ml 7,5% NaHCO <sub>3</sub> - 2,5 ml
<b>AIR médium STOCK</b>	DMEM - 8,3 g D-glukóza - 4,5 g 7,5% NaHCO <sub>3</sub> - 4,7 ml HEPES - 10 ml penicilin-streptomycin - 10 ml ddH <sub>2</sub> O ≈ 1000 ml
<b>Nahrávací AIR médium pro SCN</b>	AIR médium STOCK - 48 ml B-27 - 1000 µl GlutaMAX (100x) - 500 µl 0,1M Luciferin - 50 µl 5,3M NaCl – dle potřeby (osmolarita)

#### **Příprava zásobního roztoku kvercetinu**

Pro přípravu 50 mM zásobního roztoku bylo 0,25 g kvercetinu (Q) rozpuštěno v 16,6 ml DMSO (dimethylsulfoxid). Roztok byl napipetován do sterilních 1,5ml Eppendorfových mikrozkuvek a uchován při teplotě – 70 °C.

#### **4.5 Postup pro získání organotypických explantů**

Dospělci a březí samice myši *mPer2<sup>Luc</sup>* byly mezi 8:00 a 13:00 usmrceny mechanickou dislokací krční páteře a následnou dekapitací. Po usmrcení březích samic byly z dělohy vyjmuty fety s placentou pomocí skalpelu a pinzety. Fety ve stadiu E17 byly usmrceny rychlou dekapitací nůžkami. Z fetálních hlav byla postupně odstraněna kůže, následně byla lebka odhalena a nastříhnutá pomocí nůžek. Fetální mozek byl opatrně vyjmut a přesunut do Petriho misky s chlazeným HBSS médiem na ledu. Ve stejném HBSS médiu byly po celou dobu

přípravy uchovávány i zbylé tkáně. Fetální mozky byly mechanickým sekáčkem nakrájeny na řezy o tloušťce 500  $\mu\text{m}$ . Na základě morfologie řezu byl identifikován řez s požadovanou strukturou, tedy obsahující SCN. Tento řez byl pomocí žiletky upevněné v pinzetě dále zúžen na oblast s SCN. Pro ověření kvality byly připravené explanty zkontrolovány v mikroskopu. Stejný postup byl proveden i při získání SCN u dospělých myší. Každý explant byl následně přenesen plastovou Pasteurovou pipetou na inzert – mikroporézní teflonovou membránu o průměru 30 mm, a umístěn do 6jamkové destičky. Do každé jamky byl předem přidán 1 ml vzduchem pufrovaného AIR média pro SCN. Víčko destičky bylo po vnitřním obvodu potaženo sterilní silikonovou vazelínou pomocí plastové injekční stříkačky z důvodu minimalizace odpařování média. Připravené explanty byly následně inkubovány při teplotě 37 °C připravené pro nadcházející experimenty, v případě delšího skladování bylo nezbytné každé 2 týdny provádět výměnu AIR média.

#### **4.6 Záznam bioluminiscenční aktivity pomocí přístroje LumiCycle**

LumiCycle je specializovaný přístroj pro dlouhodobé měření bioluminiscence. Je vybaven karuselovým nosičem, jehož funkce je postupně přesunout jednotlivé vzorky díky otáčivému mechanismu ke snímači fotonů (PMTs – photon multiplying tubes, fotonásobiče), který každých 8 minut snímá emitované fotony po dobu 1 minuty. LumiCycle pojme celkem 32 Petriho misek, tedy 32 inzertů s explanty.

Inzerty s explanty byly vyjmuty z inkubátoru a z 6jamkových destiček přeneseny do Petriho misek o průměru 35 mm, obsahujících 1 ml vzduchem pufrovaného AIR média pro SCN, které bylo předem zahřáto na 37 °C ve vodní lázni. Přenos explantů z destiček do Petriho misek probíhal v laminárním boxu s použitím sterilní pinzety. Na každou Petriho misku bylo přilepeno kruhové sklíčko pomocí sterilní vazelíny, aby bylo minimalizováno odpařování média. Každá Petriho miska s explantem byla před vložením do přístroje LumiCycle číselně označena, aby bylo možné identifikovat pozici a přiřadit naměřená data ke konkrétnímu vzorku.

Měření probíhalo kontinuálně a získaná data byla automaticky uložena do počítače pro pozdější analýzu v softwaru LumiCycle Analysis (Actimetrics), který umožňuje zpracování časových záznamů a vyhodnocení cirkadiánních oscilací PER2::LUC v explantech.

Během celého experimentu byl přístroj LumiCycle umístěn v inkubátoru, který má za normálních podmínek konstantně nastavenou teplotu na 37 °C. Teplota inkubátoru musela být buď manuálně naprogramována podle požadavků prováděného teplotního experimentu (viz kapitola 4.7 *Rozpis jednotlivých teplotních experimentů*), nebo teplota zůstala nezměněná

během nahrávání a vzorky sloužily jako negativní kontrola. Do přístroje LumiCycle byla vložena jedna Petriho miska s médiem bez explantu (blank), která sloužila ke kontrole nespecifické odezvy bioluminiscence na změny teploty.

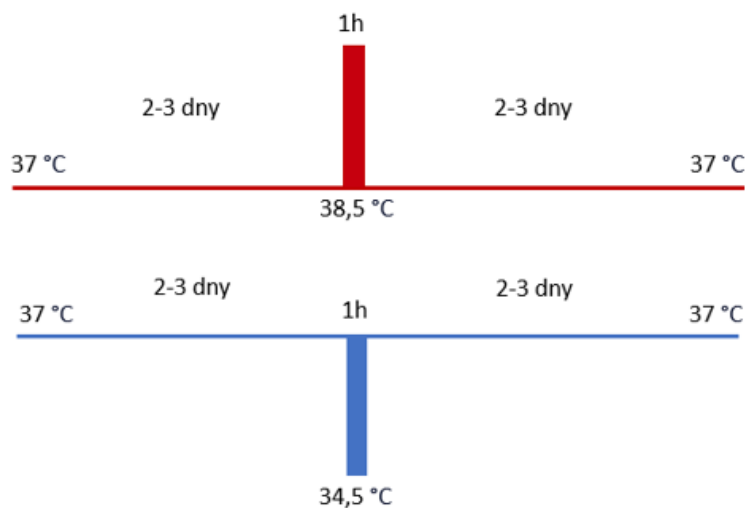
Po ukončení nahrávání byly Petriho misky s explanty vyjmuty z přístroje LumiCycle a inzerty s SCN byly přeneseny do 6jamkových destiček s novým AIR médiem pro SCN, které byly utěsněny pomocí sterilní vazelíny a umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 37 °C. Takto uchované vzorky mohly být použity opakovaně na další experimenty, mají však svoji omezenou životnost a pro teplotní experimenty mohly být použity maximálně dvakrát či třikrát. Všechny vzorky byly pečlivě značeny podle svých vlastností a před každým experimentem byly zhodnoceny charakteristiky daného vzorku, jako například stáří explantu (datum odběru), kvalita řezu, naměřený rytmus v předchozích experimentech či kontaminace. V případě vyhodnocení vzorků jako nevhodné byly explanty vyřazeny z dalších experimentů.

#### **4.7 Rozpis jednotlivých teplotních experimentů**

E17 SCN explanty byly nejprve nahrávány 2–3 dny při stálé teplotě inkubátoru 37 °C. Pro každý experiment bylo potřeba vytvořit návrh průběhu teplotní křivky a správné naprogramování inkubátoru, do kterého byl LumiCycle vložen.

## Teplotní pulz

Byl naprogramován teplotní profil pro hodinový jednorázový pulz podle návrhu níže (Obr. 9).

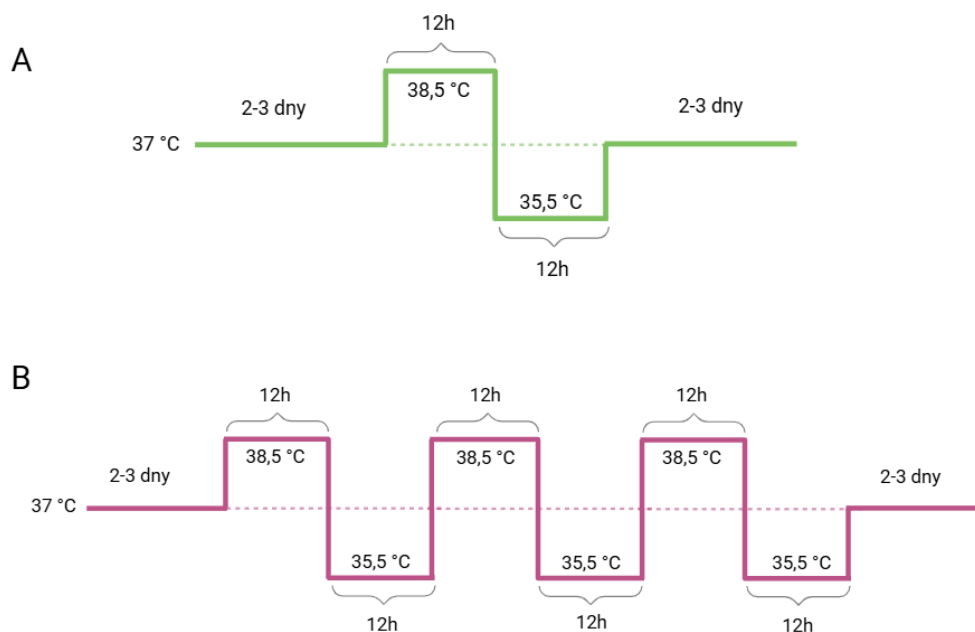


**Obr. 9: Teplotní profil průběhu teplotního pulzu.** Po několika dnech nahrávání E17 SCN v přístroji LumiCycle byl naprogramován hodinový teplotní pulz – ze stálé teploty 37 °C na 38,5 °C, po hodině byla teplota inkubátoru nastavena zpět na 37 °C a nahrávání pokračovalo další 2–3 dny po teplotním pulzu. Stejný postup byl proveden i u druhé skupiny vzorků E17 SCN s tím rozdílem, že hodinový teplotní pulz byl nastaven na teplotu 34,5 °C. Vytvořeno v programu BioRender.

## Teplotní cykly

Byl naprogramován teplotní profil s tzv. obdélníkovým průběhem (z angl. *square-wave*) teplotní změny, kdy teplota střídavě přechází mezi dvěma pevně stanovenými hodnotami v pravidelném intervalu. Inkubátor byl nastaven na jeden teplotní cyklus, kdy došlo k vystřídání teplot 38,5 °C a 35,5 °C po 12 hodinách. Poté se teplota vrátila zpět na konstantních 37 °C (Obr. 10 A). Samotný teplotní cyklus tedy trval jeden den.

Stejný profil teplotního cyklu byl nastaven i v následujícím pokusu, hodnoty a intervaly zůstaly stejné, ale cyklus byl naprogramován s třináásobným opakováním (Obr. 10 B). Teplotní cyklus tak odpovídal třem dnům.



**Obr. 10: Teplotní profil průběhu jednodenního (A) a třídenního (B) teplotního cyklu.**

**A) Jednodenní teplotní cyklus.** Po několika dnech nahrávání E17 SCN v přístroji LumiCycle se stálou teplotou 37 °C byl spuštěn jednodenní teplotní cyklus v poměru 12:12 – ze stálé teploty 37 °C byla zvýšena teplota na 38,5 °C na 12 hodin, poté byla teplota inkubátoru snížena na 35,5 °C po dobu 12 hodin. Po ukončení cyklu se teplota stabilizovala na 37 °C a nahrávání pokračovalo další 2–3 dny po teplotním cyklu. **B) Třídenní teplotní cyklus.** Po několika dnech nahrávání E17 SCN v přístroji LumiCycle se stálou teplotou 37 °C byl spuštěn třídenní teplotní cyklus v poměru 12:12 každého cyklu – ze stálé teploty 37 °C byla zvýšena teplota na 38,5 °C na 12 hodin, poté byla teplota v inkubátoru snížena na 35,5 °C po dobu 12 hodin. Celý cyklus probíhal třikrát za sebou. Po ukončení všech tří cyklů se teplota stabilizovala na 37 °C a nahrávání pokračovalo další 2–3 dny po teplotních cyklech. Vytvořeno v programu BioRender.

### Teplotní cykly s *in vitro* aplikací kvercetinu a VEH

Do 25 ml nahrávacího AIR média pro SCN bylo aplikováno 50  $\mu$ l 50 mM roztoku kvercetinu (Q) (100  $\mu$ M účinná koncentrace v médiu). Aplikace 50  $\mu$ l vehikula (VEH) do 25 ml nahrávacího AIR média sloužila jako negativní kontrola (Tab. 2). Aplikace látek do média proběhla před samotným nahráváním v přístroji v LumiCycle z důvodu zamezení manipulace s explanty během teplotního experimentu. Následně byla naprogramována teplotní změna. Po několika dnech nahrávání E17 SCN byl nastaven stejný třídenní teplotní cyklus zmíněn v předešlém teplotním experimentu (Obr. 10 B); tedy opět tři teplotní cykly, každý se změnami teplot z 38,5 °C na 35,5 °C po 12 hodinách. Po ukončení nahrávání byly explanty

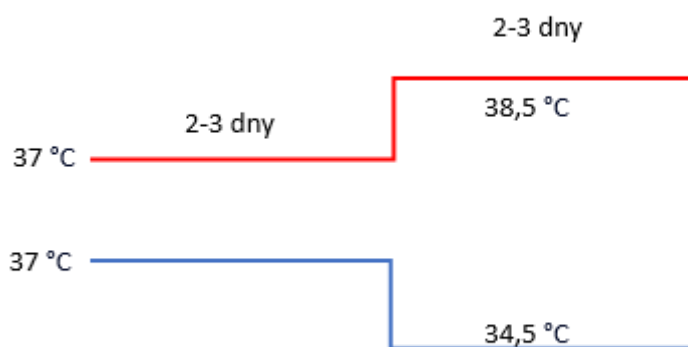
vyjmuty z přístroje LumiCycle a promyty 2x5 minut v PBS. Až poté byly stejně jako ostatní explanty přesunuty do nového média a uloženy do inkubátoru.

Tab. 2: Aplikace Q a VEH

Aplikovaná látka	Objem	Složení roztoku
Q	50 $\mu$ l	50mM Q (rozpuštěn v DMSO), naředěno v 25 ml AIR média STOCK
VEH	50 $\mu$ l	DMSO, naředěno v 25 ml AIR média STOCK

### Test teplotní kompenzace

Byl naprogramován teplotní profil jednorázové změny teploty z 37 °C na 38,5 °C, která přetrvala až do konce nahrávání. Stejný postup byl dodržen i u druhé skupiny vzorků, ale zde byla teplotní změna nastavena z 37 °C na teplotu 34,5 °C (Obr. 11). V tomto experimentu byly použity i skupiny dospělých SCN, kterým byly nastaveny stejné teplotní podmínky.

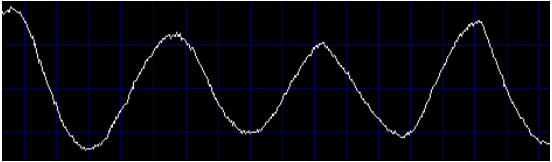
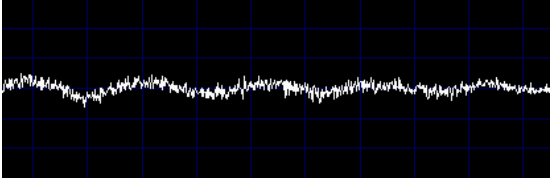
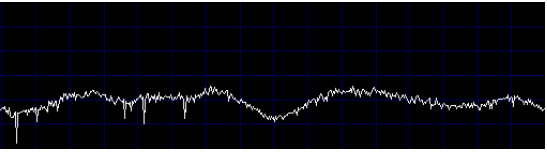


**Obr. 11: Teplotní profil průběhu jednorázové změny teploty.** Po několika dnech nahrávání E17 SCN a dospělých SCN v přístroji LumiCycle bylo nastaveno zvýšení teploty z 37 °C na 38,5 °C, která byla nastavena několik dní až do konce nahrávání. Stejný průběh byl nastaven i u druhé skupiny vzorků, ale teplotní změna byla nastavena na teplotu 34,5 °C.

#### 4.8 Analýza dat v programu LumiCycle Analysis a GraphPad Prism

Luminiscenční data získaná z přístroje LumiCycle byla uložena do počítače a analyzována v softwarovém programu LumiCycle Analysis (Actimetrics, USA). Naměřené hodnoty z jednotlivých vzorků byly sepisovány do tabulky v programu Microsoft Excel, kde byly pomocí matematických vzorců vypočítány i další hodnoty pro následnou statistickou analýzu v programu GraphPad Prism. Bylo třeba také zaznamenat celkovou kvalitu vzorku, tvar samotného rytmu, stoupající či klesající trend křivky a další poznámky pro analýzu každého vzorku. Ze statistické analýzy byly vyřazeny vzorky, jejichž hodnota amplitudy před nastavením teplotní změny klesla pod hodnotu 10 (počet fotonů/s) (Tab. 3).

Tab. 3: Vyhodnocení kvality vzorků

Skupina	Vlastnosti rytmu	Záznam PER2-bioluminiscence
R (rytmický)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pravidelná oscilace</li> <li>- jasně definované maximum/minimum</li> <li>- amplituda &gt; 10</li> </ul>	
NA (nízká amplituda)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- oscilace přítomné</li> <li>- hůře definované maximum/minimum</li> <li>- amplituda &lt; 10</li> </ul>	
N (nerytický)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- náhodné kolísání signálu</li> <li>- amplituda &lt; 10</li> </ul>	

Hlavními měřenými parametry cirkadiálního rytmu pro analýzu z LumiCycle Analysis byla perioda a amplituda. Změna periody byla stanovena porovnáním hodnot průměrné periody naměřené alespoň 2 dny před a 2 dny po aplikaci teplotní změny. Hodnoty byly porovnány pomocí párového t-testu. Vydělením hodnoty „perioda po“ s hodnotou „perioda před“ byla získána hodnota relativní periody. Pokud hodnota relativní periody byla rovna 1, nedošlo během experimentu ke změně periody. K porovnání relativní periody mezi skupinami byl využit nepárový t-test. Změna amplitudy byla rovněž stanovena porovnáním hodnot průměrné

amplitudy naměřené alespoň 2 dny před a 2 dny po aplikaci teplotní změny. Vydělením hodnoty „amplituda po“ s hodnotou „amplituda před“ byla získána hodnota relativní amplitudy. Dalším sledovaným parametrem byla akutní změna relativní amplitudy sledující okamžitý efekt na teplotní změnu. Byla vypočtena jako a podíl amplitudy těsně po teplotní manipulaci s amplitudou těsně před teplotní manipulací. Pokud byly hodnoty relativních amplitud rovny 1, nedošlo během experimentu k jejím změnám. K porovnání relativních amplitud mezi skupinami byla využita jednofaktorová ANOVA s Dunnettovým srovnávacím testem, nebo nepárový t-test. Všechny kvantitativní výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (mean ± SD). Perioda je uváděna v hodinách (h), amplituda v počtech fotonů za sekundu (počet fotonů/s).

#### 4.9 Výpočet teplotní kompenzace

Teplotní kompenzace ve fetálních a dospělých SCN byla pro každý explant vypočtena pomocí teplotního koeficientu ( $Q_{10}$ ). Vzorec pro výpočet teplotního koeficientu:

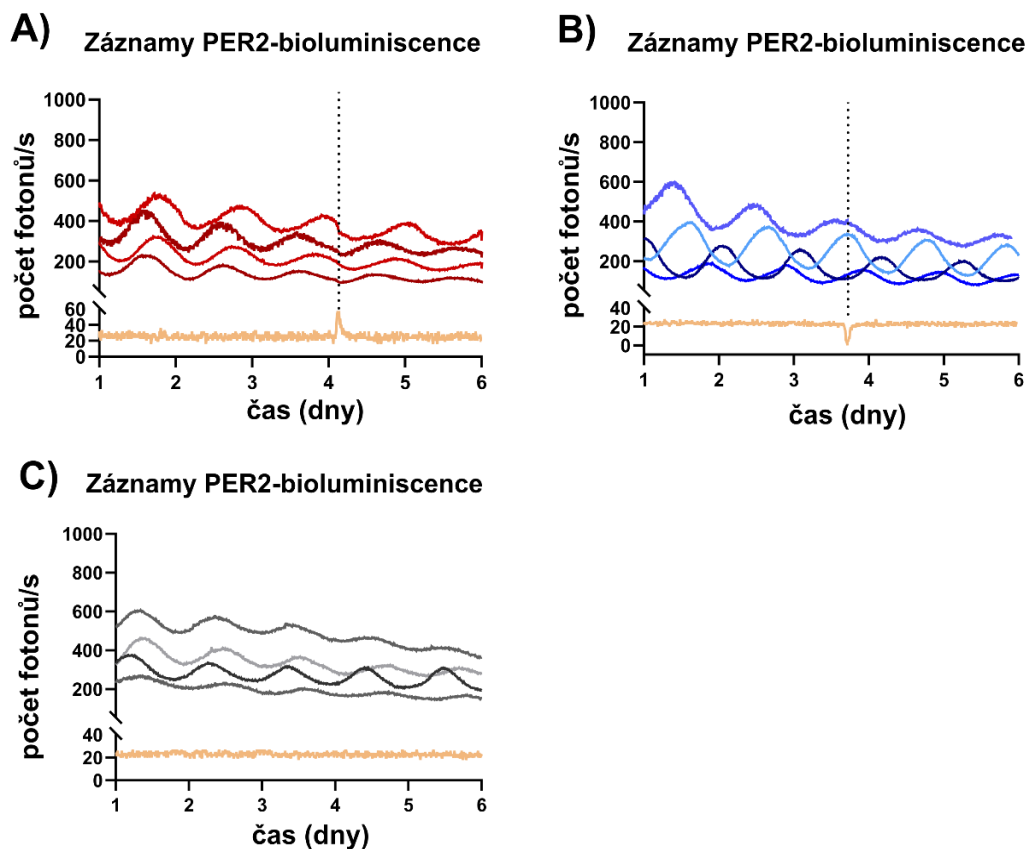
$$Q_{10} = \left( \frac{\tau_1}{\tau_2} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

$\tau_1$  představuje průměrnou periodu (tau) explantu naměřenou při teplotě  $T_1$ ,  $\tau_2$  představuje průměrnou periodu explantu naměřenou při teplotě  $T_2$ . Pro tento vzorec platí, že  $T_2 > T_1$ . Byla změřena délka cirkadiánní periody při teplotách během zvýšení teploty z 37 °C na 38,5 °C a při snížení teploty z 37 °C na 34,5 °C. Do analýzy byly zahrnuty vzorky s periodou v rozmezí 20–28 h.

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv teplotního pulzu na fetální hodiny v SCN

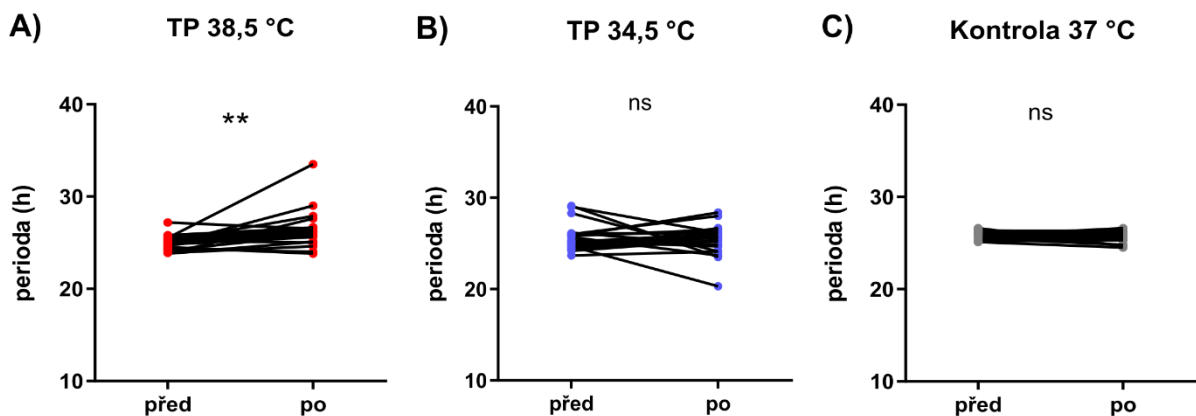
V těchto experimentech byly použity pouze explanty s vysokou amplitudou, označené v kapitole 4.8 jako rytmické (R). Byl nastaven jednorázový teplotní pulz se zvýšením teploty z 37 °C na 38,5 °C na 1 h, nebo snížením teploty z 37 °C na 34,5 °C na 1 h. V obou případech byla teplota po teplotním pulzu vrácena zpět na hodnotu 37 °C. U kontrolních vzorků byla ponechána konstantní teplota 37 °C. Obr. 12 A a 12 B ukazuje vliv teplotního pulzu na bioluminiscenci u reprezentativních explantů. Reprezentativní záznamy bioluminiscence u explantů kontrolní skupiny jsou ukázány na Obr. 12 C.



**Obr. 12:** Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence explantů E17 SCN během **A)** hodinového teplotního pulzu o teplotě 38,5 °C, **B)** hodinového teplotního pulzu o teplotě 34,5 °C, **C)** konstantní teploty 37 °C sloužící jako kontrolní skupina. Zobrazeny jsou záznamy od 1. dne po zahájení měření. Osa x vyjadřuje čas ve dnech nahrávání PER2-bioluminiscence, osa y představuje naměřenou bioluminiscenci vyjádřenou počtem emitovaných fotonů za sekundu. V každém grafu je zobrazena křivka (žlutá), která představuje záznam z misky s médiem bez tkáně (blank), který slouží ke kontrole nespecifické odezvy fotonásobiče na změny teploty z důvodu zvýšeného termálního šumu a zároveň umožňuje přesně graficky znázornit okamžik změny teploty bez nutnosti kontinuálního záznamu teploty. Svislá přerušovaná přímka značí dobu zahájení teplotního pulzu.

Velikost změny periody vlivem teplotního pulzu byla vyhodnocena pomocí srovnání period před a po aplikaci pulzu pomocí párového t-testu (*Obr. 13*). Jednorázový pulz o teplotě 38,5 °C způsobil signifikantní prodloužení periody ( $p = 0,0025$ ; průměrná velikost změny periody  $1,35 \pm 1,89$  h;  $n = 23$ ). Jednorázový pulz o teplotě 34,5 °C nezpůsobil signifikantní změny periody ( $p = 0,5726$ ; průměrná velikost změny periody  $-0,27 \pm 2,23$  h;  $n = 22$ ). Kontrolní skupina explantů ponechaná v konstantní teplotě 37 °C také neprokázala signifikantní změny periody ( $p = 0,0871$ ; průměrná velikost změny periody  $-0,23 \pm 0,56$  h;  $n = 19$ ).

## Perioda



**Obr. 13: Porovnání rozdílů změny v periodě během A) jednorázového teplotního pulzu 38,5 °C, B) jednorázového teplotního pulzu 34,5 °C, C) konstantní teploty 37 °C. Rozdíly byly vyhodnoceny pomocí párového t-testu. Během jednorázového teplotního pulzu 38,5 °C došlo k signifikantnímu prodloužení periody ( $p = 0,0025$ ). Symbol hvězd označuje úroveň statistické významnosti (\*\* $p < 0,01$ ); ns = nesignifikantní ( $p > 0,05$ ). TP = teplotní pulz.**

Pro kvantifikaci rozdílů v hodnotě relativní amplitudy (poměru mezi amplitudou rytmu před a po teplotním pulzu) mezi skupinami byla využita jednofaktorová ANOVA ( $p = 0,0150$ ;  $F(2, 61) = 4,500$ ). Dunnettův post-hoc test prokázal statisticky významný rozdíl v relativní amplitudě u skupiny s jednorázovým pulzem o teplotě 38,5 °C ve srovnání s kontrolní skupinou ( $p = 0,0102$ ) (*Tab. 4*). Výsledky jsou shrnuty na *Obr. 14 A*, kde je zobrazen graf rozdílů v relativní amplitudě mezi skupinami.

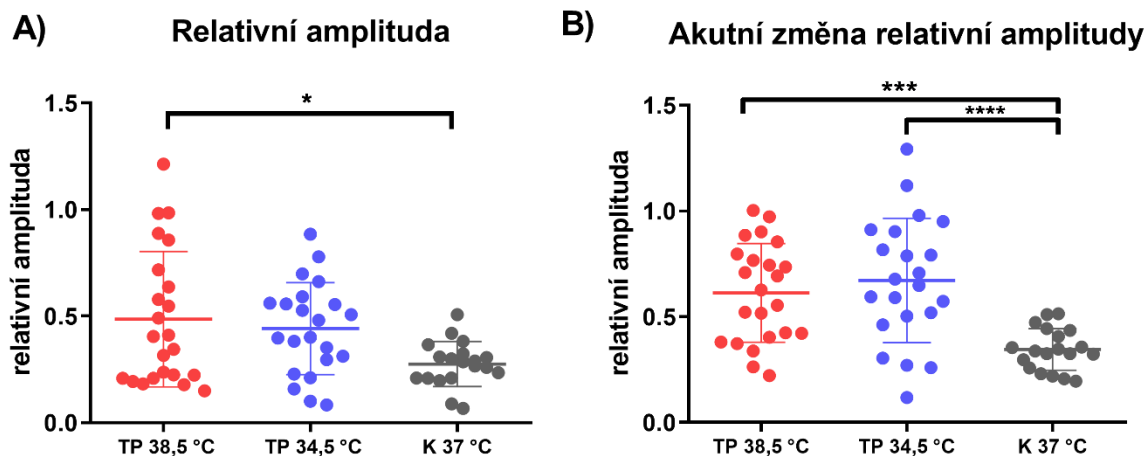
Tab. 4: Jednofaktorová ANOVA – Vliv teplotního pulzu na změnu relativní amplitudy

Skupina	Počet vzorků	Relativní amplituda (průměr ± SD)	Pozorované skupiny	p hodnota
Teplotní pulz 38,5 °C	n = 23	0,4857 ± 0,3171	TP 38,5 °C vs. K 37 °C	*0,0102
Teplotní pulz 34,5 °C	n = 22	0,4416 ± 0,2157	TP 34,5 °C vs. K 37 °C	0,0502
Kontrola	n = 19	0,2750 ± 0,1052	-	-

Pro analýzu akutní změny relativní amplitudy (poměru mezi amplitudou píku těsně před a těsně po teplotním pulzu) byla rovněž použita jednofaktorová ANOVA ( $p < 0,0001$ ;  $F(2, 61) = 11,61$ ). Dunnettův post-hoc test prokázal signifikantní zvýšení akutní relativní amplitudy jak u skupiny s jednorázovým pulzem o teplotě 38,5 °C ( $p = 0,0007$ ), tak u skupiny s jednorázovým pulzem o teplotě 34,5 °C ( $p < 0,0001$ ) vzhledem ke kontrolní skupině s konstantní teplotou 37 °C (Tab. 5). Na Obr. 14 B je zobrazen graf rozdílu akutní změny relativní amplitudy mezi skupinami.

Tab. 5: Jednofaktorová ANOVA – Vliv teplotního pulzu na akutní změnu relativní amplitudy

Skupina	Počet vzorků	Relativní akutní amplituda (průměr ± SD)	Porovnávané skupiny	p hodnota
Teplotní pulz 38,5 °C	n = 23	0,6135 ± 0,2339	TP 38,5 °C vs. K 37 °C	***0,0007
Teplotní pulz 34,5 °C	n = 22	0,6720 ± 0,2938	TP 34,5 °C vs. K 37 °C	****0,0001
Kontrola	n = 19	0,3453 ± 0,0989	-	-



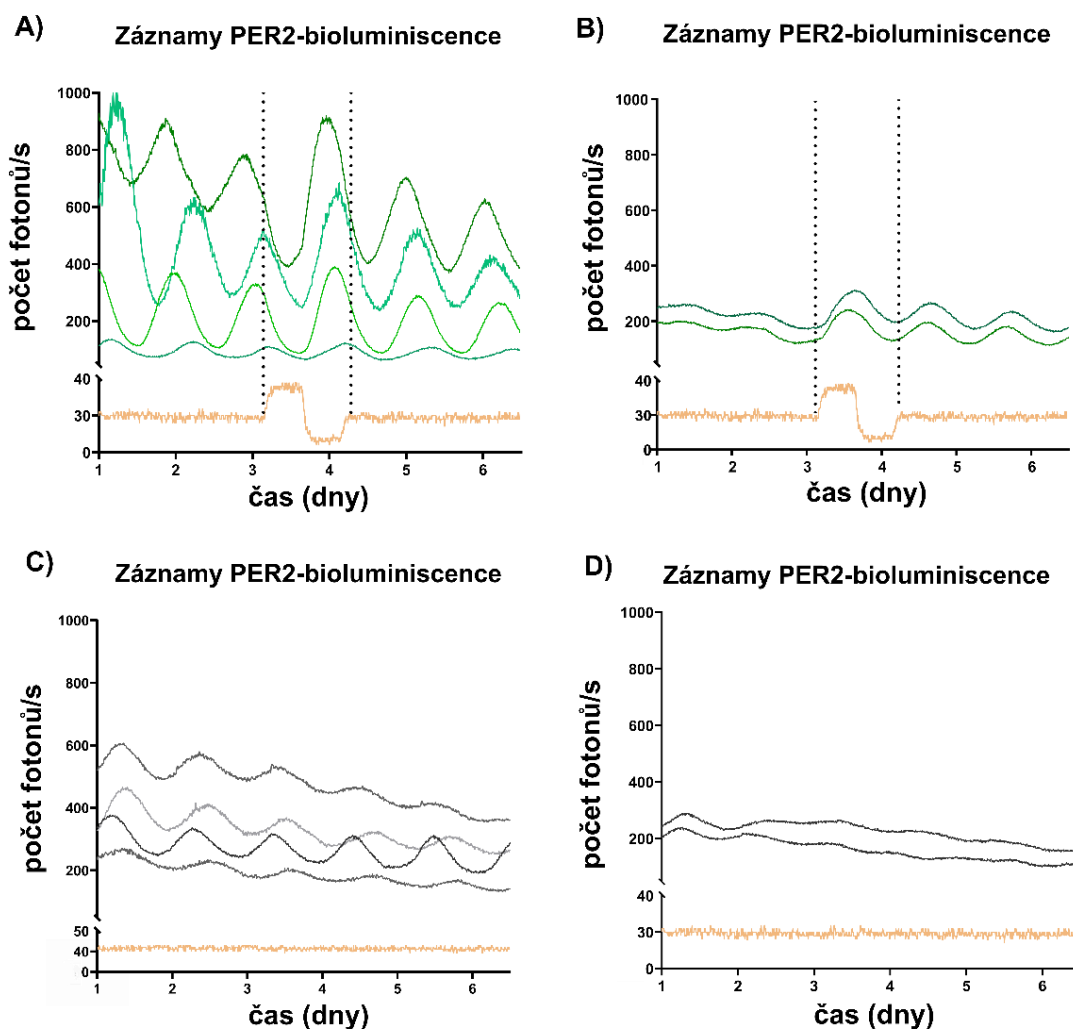
**Obr. 14:** Rozdíl v A) relativní amplitudě a B) akutní změně relativní amplitudy mezi jednorázovým pulzem o teplotě 38,5 °C, 34,5 °C a konstantní teplotou 37 °C. Ke statistickému vyhodnocení byla v obou případech použita jednofaktorová ANOVA. Rozdíly v relativní amplitudě byly signifikantní mezi skupinou s jednorázovým pulzem o teplotě 38,5 °C a kontrolní skupinou se stálou teplotou 37 °C ( $p = 0,0102$ ). Skupiny s jednorázovým pulzem o teplotě 38,5 °C i 34,5 °C signifikantně zvýšily akutní změnu relativní amplitudy ve srovnání s konstantní teplotou 37 °C ( $p = 0,0007$ ;  $p < 0,0001$ ). Symbol hvězdy označuje signifikantní výsledek Dunnettova post-hoc testu mezi skupinami (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Prezentovaná data jsou zobrazena jako jednotlivé hodnoty a jejich průměr  $\pm$  SD. TP = teplotní pulz; K 37 °C = kontrolní skupina se stálou teplotou 37 °C.

## 5.2 Vliv teplotního cyklu na fetální hodiny v SCN

V následujícím experimentu byl sledován vliv jednodenního teplotního cyklu se zvýšením teploty z 37 °C na 38,5 °C na 12 h a poté jejím snížením na 35,5 °C na 12 hodin. Následně byla teplota vrácena na hodnotu 37 °C. Kontrolním vzorkům byla ponechána konstantně teplota 37 °C.

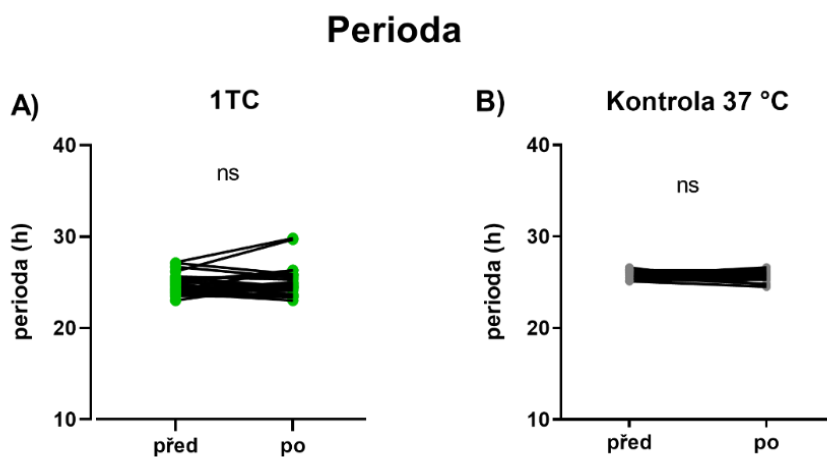
Pro vyhodnocení vlivu teplotního cyklu byly explanty rozděleny do skupin podle amplitudy rytmu před aplikací teplotního cyklu na explanty se standardní a nízkou amplitudou (kapitola 4.8, Tab. 3). Dělicím parametrem byla hodnota amplitudy nižší než 10. Skupina explantů s nízkou amplitudou (včetně explantů kontrolní skupiny) byla analyzována zvlášť a v grafech značena jako NA (nízká amplituda). Důvodem pro zařazení této skupiny byl fakt, že se u nich po aplikaci teplotního cyklu amplituda rytmu v PER2-bioluminiscenci významně zvýšila.

Obr. 15 A ukazuje vliv teplotního cyklu na bioluminiscenci u reprezentativních explantů se standardní amplitudou a Obr. 15 B na explanty s nízkou amplitudou. Reprezentativní záznamy bioluminiscence explantů odpovídajících kontrolních skupin jsou ukázány na Obr. 15 C a Obr. 15 D.



**Obr. 15: Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence explantů E17 SCN během A) jednorázového teplotního cyklu, B) jednorázového teplotního cyklu (NA), C) konstantní teploty 37 °C, D) konstantní teploty 37 °C (NA).** Zobrazeny jsou záznamy od 1. dne po zahájení měření. Na ose x je vyjádřen čas ve dnech nahrávání PER2-bioluminiscence v přístroji LumiCycle, osa y představuje naměřenou bioluminiscenci vyjádřenou počtem emitovaných fotonů za sekundu. V každém grafu je zobrazena křivka (žlutá), která představuje záznam z misky s médiem bez tkáně (blank), který slouží ke kontrole nespecifické odezvy fotonásobiče na změny teploty z důvodu zvýšeného termálního šumu a zároveň umožňuje přesně graficky znázornit okamžik změny teploty bez nutnosti kontinuálního záznamu teploty. Svislé přerušované přímky značí dobu zahájení a ukončení teplotního cyklu.

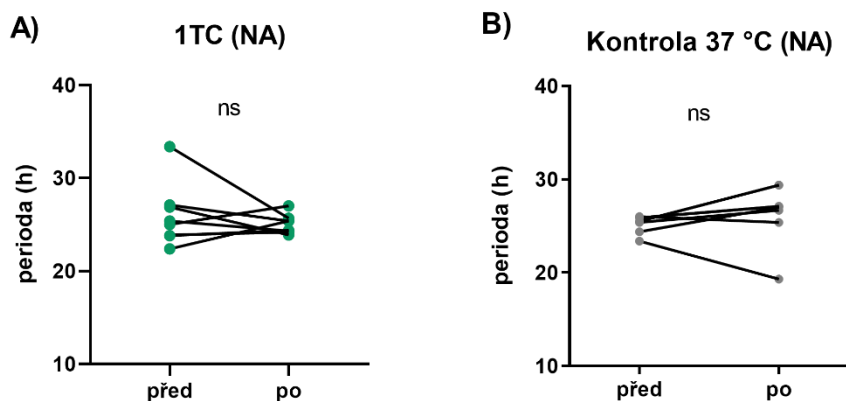
Velikost změny periody vlivem teplotního cyklu byla vyhodnocena pomocí srovnání period před a po aplikaci cyklu pomocí párového t-testu (Obr. 16, 17). U skupiny se standardní amplitudou neprokázal párový t-test signifikantní prodloužení nebo zkrácení periody po jednorázovém cyklu ( $p = 0,4509$ ; průměrná změna periody  $0,19 \pm 1,28$  h;  $n = 26$ ). U kontrolní skupiny explantů inkubovaných při konstantní teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) také nedošlo v odpovídajícím období ke změně periody ( $p = 0,0871$ ; průměrná změna periody  $-0,23 \pm 0,56$  h;  $n = 19$ ).



**Obr. 16: Porovnání rozdílů změny v periodě během A) jednodenního teplotního cyklu a B) konstantní teploty  $37^\circ\text{C}$ . Párový t-test neprokázal signifikantní změnu délky periody. ITC = jednorázový teplotní cyklus; ns = nesignifikantní ( $p > 0,05$ ).**

U skupiny s nízkou amplitudou párový t-test rovněž neprokázal signifikantní prodloužení nebo zkrácení periody po jednorázovém cyklu ( $p = 0,4490$ ; průměrná změna periody  $-0,95 \pm 3,35$  h;  $n = 8$ ). U kontrolní skupiny explantů inkubovaných při konstantní teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) také nedošlo v odpovídajícím období ke změně periody ( $p = 0,2444$ ; průměrná změna periody  $1,76 \pm 2,62$  h;  $n = 8$ ).

## Perioda (NA)

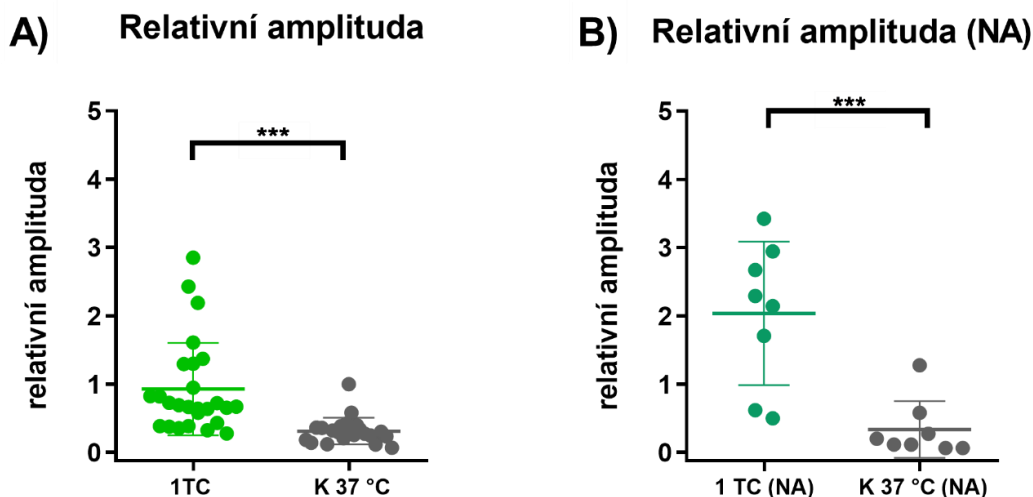


**Obr. 17: Porovnání rozdílu změny v periodě během A) jednodenního teplotního cyklu (NA) a B) konstantní teploty 37 °C (NA). Párový t-test neprokázal signifikantní změnu délky periody. 1TC = jednorázový teplotní cyklus; NA = explanty s nízkou amplitudou; ns = nesignifikantní ( $p > 0,05$ ).**

Pro kvantifikaci rozdílů v hodnotě relativní amplitudy (poměru mezi amplitudou rytmu před a po teplotním pulzu) mezi skupinami byl využit nepárový t-test, který prokázal signifikantní zvýšení relativní amplitudy u skupiny s jednorázovým teplotním cyklem vzhledem ke kontrolním skupinám s konstantní teplotou 37 °C jak u skupiny explantů se standardní amplitudou ( $p = 0,0001$ ), tak i u skupiny explantů s nízkou amplitudou ( $p = 0,0008$ ) (Obr. 18).

U skupiny se standardní amplitudou byla průměrná relativní amplituda u explantů vystavených teplotnímu cyklu  $0,93 \pm 0,68$  ( $n = 26$ ), u explantů kultivovaných při konstantní teplotě 37 °C  $0,31 \pm 0,19$  ( $n = 22$ ).

U skupiny s nízkou amplitudou byla průměrná relativní amplituda u explantů vystavených teplotnímu cyklu  $2,04 \pm 1,05$  ( $n = 8$ ), u explantů kultivovaných při konstantní teplotě 37 °C  $0,34 \pm 0,42$  ( $n = 8$ ).



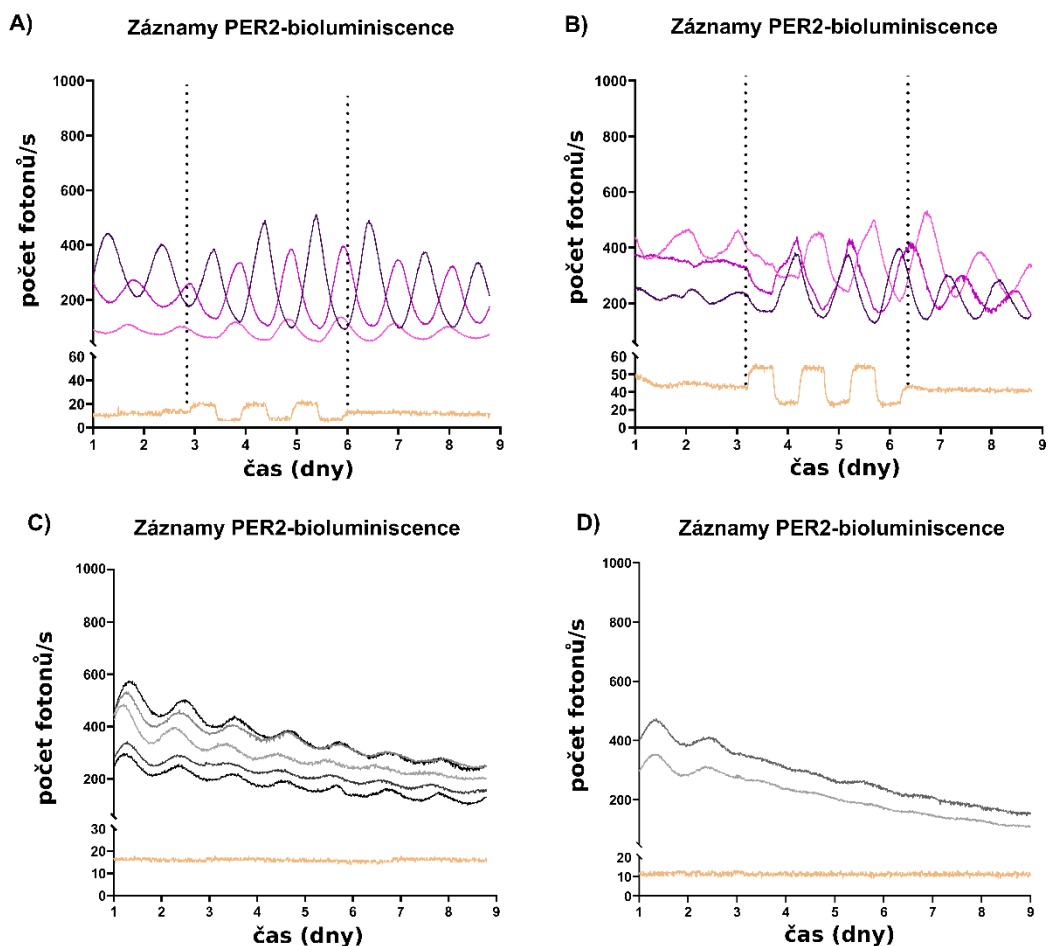
**Obr. 18:** Porovnání rozdílu ve změně relativní amplitudy po jednorázovém teplotním cyklu nebo kultivaci v konstantní teplotě 37 °C u skupin A) se standardní amplitudou, B) s nízkou amplitudou (NA). Ke statistickému vyhodnocení byl použit nepárový t-test. Rozdíl v relativní amplitudě byl statisticky významný mezi oběma skupinami. Symboly hvězd označují signifikantní rozdíly mezi skupinami (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Prezentovaná data jsou zobrazena jako individuální hodnoty a jejich průměr  $\pm$  SD. 1TC = jednorázový teplotní cyklus; K 37 °C = kontrolní skupina se stálou teplotou 37 °C; NA – explant s nízkou amplitudou.

### 5.3 Vliv tří teplotních cyklů na fetální hodiny v SCN

Byl sledován vliv tří teplotních cyklů se zvýšením teploty z 37 °C na 38,5 °C na 12 h a poté jejím snížením na 35,5 °C na 12 h v časovém intervalu tří dnů. Následně byla teplota vrácena na hodnotu 37 °C. Kontrolním vzorkům byla ponechána konstantně teplota 37 °C.

Pro vyhodnocení vlivu teplotních cyklů byly explanty rozděleny do skupin podle amplitudy rytmu před aplikací teplotních cyklů na explanty se standardní a nízkou amplitudou (Tab. 3). Dělicím parametrem byla hodnota amplitudy nižší než 10. Skupina explantů s nízkou amplitudou (včetně explantů kontrolní skupiny) byla analyzována zvlášť a v grafech značena jako NA (nízká amplituda). Důvodem pro zařazení této skupiny byl fakt, že se u nich po aplikaci tří teplotních cyklů amplituda rytmu v PER2-bioluminiscenci významně zvýšila.

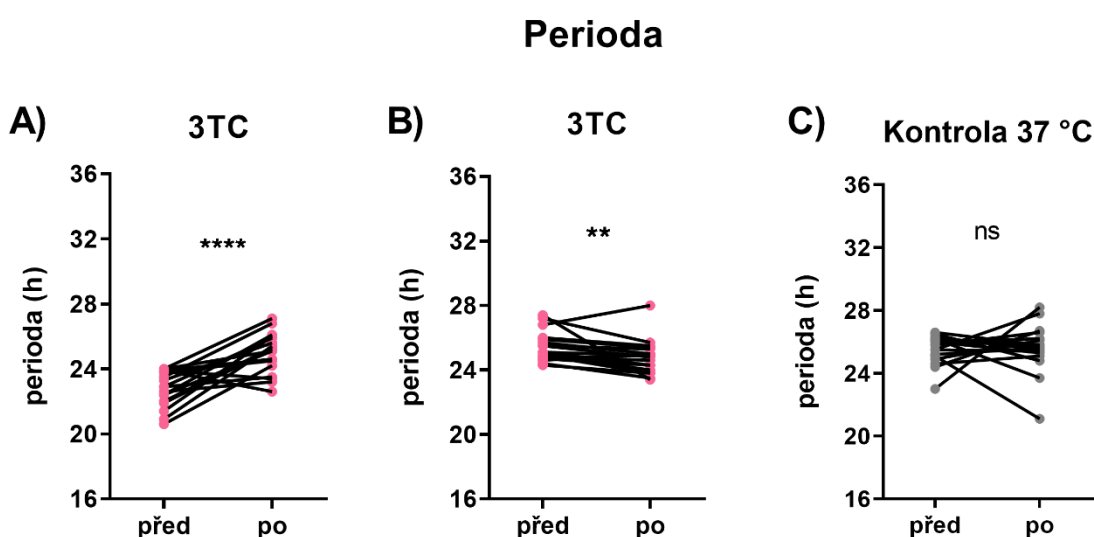
Obr. 19 A ukazuje vliv teplotních cyklů na bioluminiscenci u reprezentativních explantů se standardní amplitudou a Obr. 19 B na explanty s nízkou amplitudou. Reprezentativní záznamy bioluminiscence explantů odpovídajících kontrolních skupin jsou ukázány na Obr. 19 C a Obr. 19 D.



**Obr. 19: Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence explantů E17 SCN během A) tří teplotních cyklů, B) tří teplotních cyklů (NA), C) konstantní teploty 37 °C, D) konstantní teploty 37 °C (NA).** Zobrazeny jsou záznamy od 1. dne po zahájení měření. Na ose x je vyjádřen čas ve dnech nahrávání PER2-bioluminiscence v přístroji LumiCycle, osa y představuje naměřenou bioluminiscenci vyjádřenou počtem emitovaných fotonů za sekundu. V každém grafu je zobrazena křivka (žlutá), který slouží ke kontrole nespecifické odezvy fotonásobiče na změny teploty z důvodu zvýšeného termálního šumu a zároveň umožňuje přesně graficky znázornit okamžik změny teploty bez nutnosti kontinuálního záznamu teploty. Svislé přerušované přímky značí dobu zahájení a ukončení teplotních cyklů.

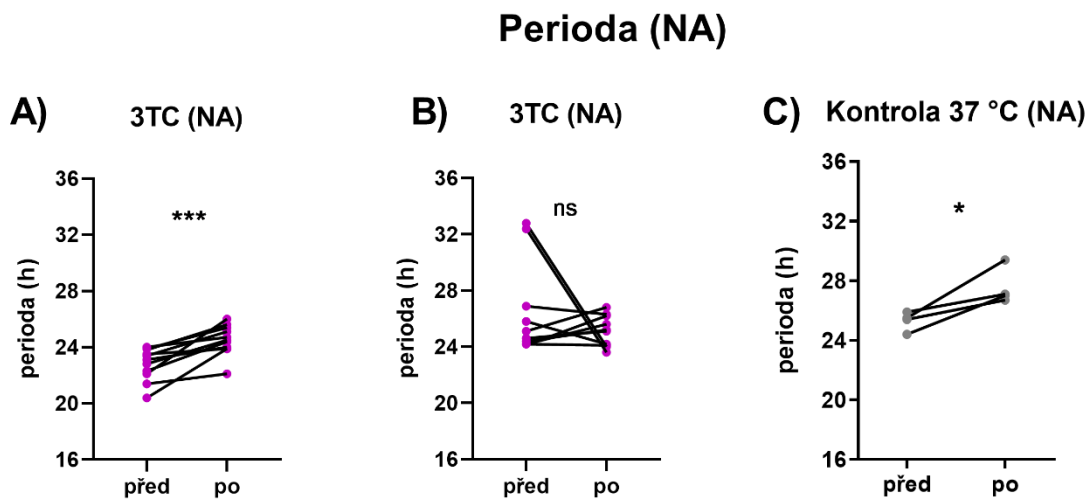
Velikost změny periody vlivem teplotních cyklů byla vyhodnocena pomocí srovnání period před a po aplikaci cyklů pomocí párového t-testu (Obr. 20).

U skupiny se standardní amplitudou prokázal párový t-test signifikantní změny v periodě (Obr. 20 A, B). U explantů s periodou kratší než 24 h došlo po aplikaci tří teplotních cyklů k signifikantnímu prodloužení periody ( $p < 0,0001$ ; průměrná změna periody  $2,18 \pm 1,73$  h;  $n = 18$ ). Naopak u explantů s periodou delší 24 h došlo k signifikantnímu zkrácení periody ( $p = 0,0087$ ; průměrná změna periody  $-0,66 \pm 0,99$  h;  $n = 20$ ). U kontrolní skupiny explantů inkubovaných při konstantní teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) nedošlo v odpovídajícím období ke změně periody ( $p = 0,8794$ ; průměrná změna periody  $0,07 \pm 1,99$  h;  $n = 18$ ).



**Obr. 20: Porovnání rozdilu změny v periodě.** *A) perioda před nastavením tří teplotních cyklů je nižší než 24 h, B) perioda před nastavením tří teplotních cyklů je vyšší než 24 h, C) konstantní teplota 37 °C. Párové t-testy prokázaly signifikantní změny v periodě během tří teplotních cyklů ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0087$ ). Symboly hvězd označují signifikantní rozdíly ve změně periody (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). 3TC = tři teplotní cykly; ns = nesignifikantní ( $p > 0,05$ ).*

Podobně byl zaznamenán i vliv teplotních cyklů na periodu u explantů s nízkou amplitudou (Obr. 21). U explantů s periodou kratší než 24 h došlo po aplikaci tří teplotních cyklů rovněž k signifikantnímu prodloužení periody ( $p = 0,0005$ ; průměrná změna periody  $1,72 \pm 1,12$  h;  $n = 11$ ). U explantů s periodou delší 24 h nedošlo k signifikantním změnám periody ( $p = 0,3264$ ; průměrná změna periody  $-1,340 \pm 4,083$  h;  $n = 10$ ). U kontrolní skupiny explantů inkubovaných při konstantní teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) došlo v odpovídajícím období k prodloužení periody ( $p = 0,0384$ ; průměrná změna periody  $2,250 \pm 1,271$  h;  $n = 4$ ).

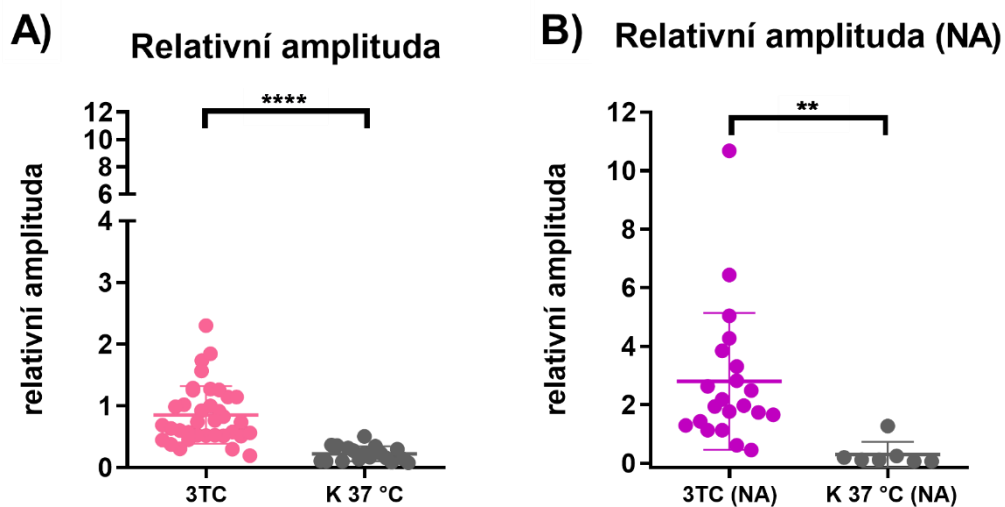


**Obr. 21: Porovnání rozdílu změny v periodě (vzorky s nízkou amplitudou – NA).** **A)** explanty s hodnotou periody před nastavením tří teplotních cyklů nižší než 24 h, **B)** explanty s hodnotou periody před nastavením tří teplotních cyklů vyšší než 24 h, **C)** konstantní teplota  $37^\circ\text{C}$ . Párové *t*-testy prokázaly signifikantní prodloužení periody nižší než 24 h během tří teplotních cyklů ( $p = 0,0005$ ) a během stálé teploty  $37^\circ\text{C}$  ( $p = 0,0384$ ). Symboly hvězd označují signifikantní rozdíly ve změně periody (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). 3TC = tři teplotní cykly; NA – explant s nízkou amplitudou; ns = nesignifikantní ( $p > 0,05$ ).

Pro kvantifikaci rozdílů v hodnotě relativní amplitudy (poměru mezi amplitudou rytmu před a po teplotním pulzu) mezi skupinami byl využit nepárový t-test, který prokázal signifikantní zvýšení relativní amplitudy u skupiny s aplikací tří teplotních cyklů vzhledem ke kontrolním skupinám s konstantní teplotou 37 °C jak u skupiny se standardní amplitudou ( $p < 0,0001$ ), tak i u skupiny s nízkou amplitudou ( $p = 0,0099$ ) (Obr. 22).

U skupiny se standardní amplitudou byla průměrná relativní amplituda u explantů vystavených třem teplotním cyklům  $0,85 \pm 0,47$  ( $n = 37$ ), u explantů kultivovaných při konstantní teplotě 37 °C  $0,22 \pm 0,12$  ( $n = 18$ ).

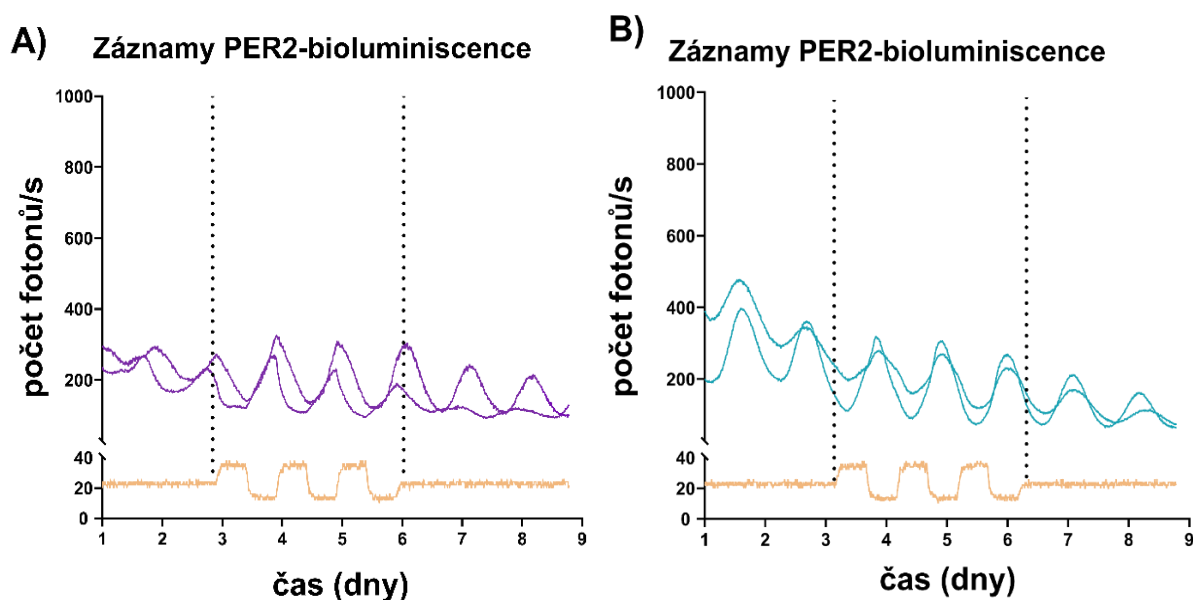
U skupiny s nízkou amplitudou byla průměrná relativní amplituda u explantů vystavených třem teplotním cyklům  $2,8 \pm 2,34$  ( $n = 21$ ), u explantů kultivovaných při konstantní teplotě 37 °C  $0,3 \pm 0,44$  ( $n = 7$ ).



**Obr. 22: Porovnání rozdílů ve změně relativní amplitudy po třech teplotních cyklech nebo kultivaci v konstantní teplotě 37 °C u skupin A) se standardní amplitudou, B) s nízkou amplitudou (NA). Ke statistickému vyhodnocení byl použit nepárový t-test. Rozdíl v relativní amplitudě byl statisticky významný mezi oběma skupinami. Symboly hvězd označují signifikantní rozdíly mezi skupinami (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Prezentovaná data jsou zobrazena jako jednotlivé hodnoty a jejich průměr  $\pm$  SD. 3TC = tři teplotní cykly; K 37 °C = kontrolní skupina se stálou teplotou 37 °C; NA – explanty s nízkou amplitudou.**

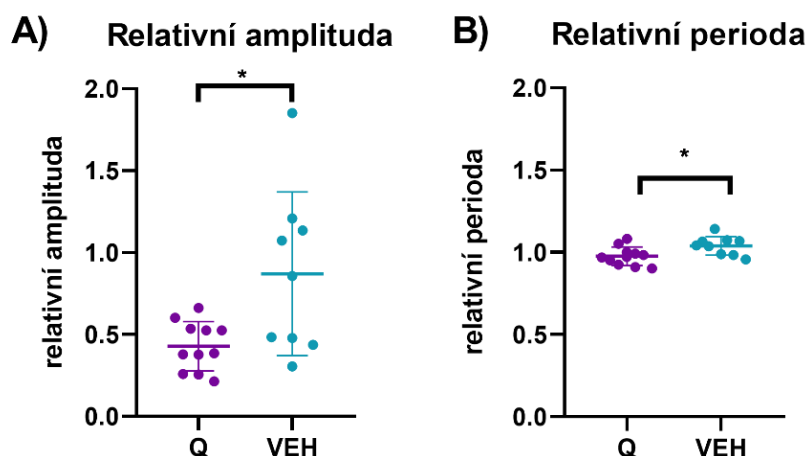
## 5.4 Vliv aplikace kvercetinu na parametry cirkadiálních hodin E17 SCN

Byl sledován vliv aplikace kvercetinu (Q) na fetální SCN během teplotních cyklů se zvýšením teploty z 37 °C na 38,5 °C na 12 h a poté jejím snížením na 35,5 °C na 12 h v časovém intervalu tří dnů. Obr. 23 A ukazuje vliv teplotních cyklů na bioluminiscenci u reprezentativních explantů při aplikaci kvercetinu. Reprezentativní záznamy bioluminiscence u explantů kontrolní skupiny s aplikací VEH jsou ukázány na Obr. 23 B.



**Obr. 23:** Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence explantů E17 SCN během třídenního teplotního cyklu s aplikací **A)** 100 $\mu$ M Q, nebo **B)** VEH. Zobrazeny jsou záznamy od 1. dne po zahájení měření. Na ose x je vyjádřen čas ve dnech nahrávání PER2-bioluminiscence v přístroji LumiCycle, osa y představuje naměřenou bioluminiscenci vyjádřenou počtem emitovaných fotonů za sekundu. V každém grafu je zobrazena křivka (žlutá), která představuje záznam z misky s médiem bez tkáně (blank), který slouží ke kontrole nespecifické odezvy fotonásobiče na změny teploty z důvodu zvýšeného termálního šumu a zároveň umožňuje přesně graficky znázornit okamžik změny teploty bez nutnosti kontinuálního záznamu teploty. Svislé přerušované přímky značí dobu zahájení a ukončení teplotních cyklů.

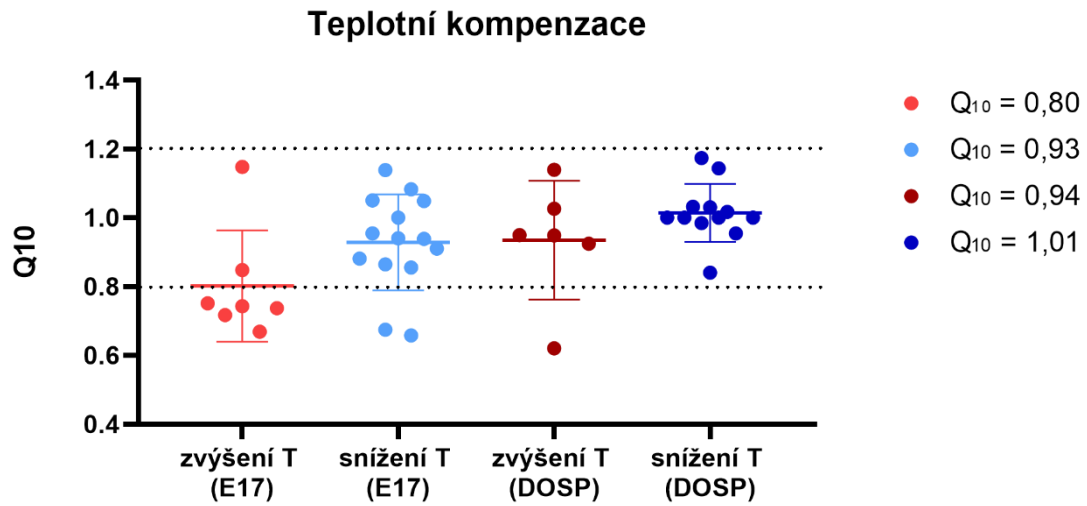
Pro kvantifikaci rozdílů v hodnotě relativní amplitudy (poměru mezi amplitudou rytmu před a po teplotních cyklech) mezi skupinami byl využit nepárový t-test, který prokázal signifikantně nižší relativní amplitudu u skupiny s aplikací kvercetinu vzhledem ke kontrolní skupině ( $p = 0,0120$ ). Průměrná relativní amplituda u explantů s aplikací kvercetinu činila  $0,43 \pm 0,15$  ( $n = 11$ ), u kontrolní skupiny s aplikací VEH  $0,87 \pm 0,50$  ( $n = 9$ ). U skupiny explantů s aplikací kvercetinu byla pomocí nepárového t-testu prokázána i signifikantně nižší relativní perioda vzhledem ke kontrolní skupině ( $p = 0,0225$ ). Průměrná relativní perioda u explantů s aplikací kvercetinu činila  $0,98 \pm 0,06$  h ( $n = 11$ ), u kontrolní skupiny s aplikací VEH  $1,04 \pm 0,06$  h ( $n = 9$ ).



**Obr. 24:** Porovnání rozdílů ve změně **A) relativní amplitudy a B) relativní periody** po třech teplotních cyklech s aplikací  $100\mu\text{M}$  **Q** nebo **VEH**. Nepárový *t*-test prokázal signifikantní snížení amplitudy ( $p = 0,0120$ ) i periody ( $p = 0,0225$ ) u explantů s aplikací kvercetinu (**Q**) vzhledem ke kontrolní skupině (**VEH**). Symboly hvězd označují signifikantní rozdíly mezi skupinami (\*\* $p < 0,01$ ). Prezentovaná data jsou zobrazena jako jednotlivé hodnoty a jejich průměr  $\pm$  SD.

## 5.5 Teplotní kompenzace

Teplotní kompenzace v SCN byla posuzována na základě hodnot teplotního koeficientu ( $Q_{10}$ ). Ve skupině E17 SCN při zvýšení teploty z  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl průměrný teplotní koeficient  $Q_{10} = 0,80$ , při poklesu teploty z  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $34,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  činil průměr  $Q_{10} = 0,93$ . U dospělého SCN byla při zvýšení teploty naměřena průměrná hodnota  $Q_{10} = 0,94$  a při poklesu teploty činil průměr  $Q_{10} = 1,01$ . Hodnoty teplotních koeficientů jsou znázorněny v grafu na *Obr. 25*. Obecné rozmezí teplotní kompenzace cirkadiálního systému ( $0,8-1,2$ ) je na *Obr. 25* vyznačeno dvěma přerušovanými přímkami.



**Obr. 25: Hodnoty teplotního koeficientu  $Q_{10}$  u E17 SCN a dospělých SCN při zvýšení a snížení teploty.** Přerušované přímky vymezují rozmezí fyziologické teplotní kompenzace. Prezentovaná data jsou zobrazena jako jednotlivé hodnoty a jejich průměr  $\pm$  SD. T = teplota; DOSP = dospělý.

## 6 Diskuze

Diplomová práce přinesla nové poznatky o teplotní synchronizaci fetálních cirkadiálních hodin v SCN s využitím *ex vivo* modelu organotypických explantů SCN transgenní myši *mPer2<sup>Luc</sup>*. Teplotní synchronizace byla testována různými formami teplotní stimulace – aplikací jednorázového teplotního pulzu, jednorázového teplotního cyklu nebo opakovaných teplotních cyklů. Zároveň byla hodnocena míra teplotní kompenzace v SCN pomocí teplotního koeficientu  $Q_{10}$ .

### 6.1 Vliv teplotního pulzu na fetální hodiny v SCN

Nejprve bylo nutné experimentálně ověřit, zda jsou hodiny ve fetálních SCN schopny reagovat na akutní změny teploty. Výsledky ukázaly, že hodinový teplotní pulz zvýšením teploty z 37 °C na teplotu 38,5 °C vedl k signifikantnímu prodloužení periody PER2-bioluminiscenčního rytmu fetálního SCN, zatímco teplotní pulz snížením teploty z 37 °C na 34,5 °C, a ani ponechání teploty 37 °C, periodu významně neovlivnily.

Zároveň při pulzu o teplotě 38,5 °C dochází k signifikantně menšímu spontánnímu poklesu relativní amplitudy ve srovnání s kontrolními podmínkami s konstantní teplotou. Zajímavé je, že oba teplotní pulzy vyvolaly signifikantní nárůst akutní relativní amplitudy. To naznačuje, že hodiny ve fetálních SCN jsou schopny okamžité odpovědi na krátkodobé jednorázové teplotní podněty. V buňkách fibroblastů bylo již dříve prokázáno, že pulz o teplotě 43 °C po dobu 30 minut zvyšuje amplitudu rytmů *Per2* prostřednictvím molekulární dráhy tepelného šoku (HSR) (Tamaru et al., 2011). Lze předpokládat, že tato dráha byla aktivována i v tomto experimentu při teplotním pulzu o teplotě 38,5 °C.

Periferní tkáně vykazují výraznou citlivost na teplotní pulzy – dochází k robustnímu resetování rytmu PER2-bioluminiscence (Buhr e al., 2010). Výsledky této diplomové práce ukazují, že cirkadiální hodiny v SCN mohou během fetálního stádia také reagovat na krátkodobé teplotní změny. Tím se zřejmě liší od hodin v SCN v dospělosti. Ruby et al. (1999) sice popsali, že dvouhodinové teplotní pulzy v rozmezí 34–37 °C způsobují fázové posuny cirkadiálních rytmů neuronální aktivity v SCN dospělého potkana *in vitro*, avšak nemají vliv na periodu rytmu. Rezistence hodin v SCN na teplotní pulzy v dospělém stádiu byla prokázána v několika navazujících studiích. Buhr et al. (2010) demonstrovali, že hodiny v *in vitro* explantech obsahujících SCN dospělých myši nereagují na teplotní pulzy v rozmezí 36–38,5 °C ani změnou fáze, ani změnou periody rytmu. Na druhou stranu autoři ukázali, že pokud byla

neuronální síť SCN farmakologicky narušena aplikací tetrodotoxinu (TTX), blokátoru sodíkových kanálů, hodiny se v dospělém SCN staly na teplotní pulz citlivějšími. Citlivost fetálních SCN na teplotní pulz může tedy v tomto případě souviset s absencí plně vyvrážděné neuronální sítě.

## 6.2 Vliv teplotních cyklů na fetální hodiny v SCN

Dalším krokem bylo ověřit citlivost fetálních SCN na jednorázové nebo opakované teplotní cykly v rozmezí teplot 35,5–38,5 °C. V obou skupinách explantů došlo po aplikaci teplotních cyklů ke zvýšení relativní amplitudy PER2-bioluminiscenčního rytmu, přičemž efekt byl výraznější u explantů vystavených opakovaným teplotním cyklům.

Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími studiemi, ve kterých teplotní cykly v rozmezí fyziologických teplot vyvolaly zvýšení amplitudy rytmu, a to jak *in vitro* v potkaních fibroblastech, tak *in vivo* v játrech myši (Brown et al., 2002; Saini et al., 2012; Sládek & Sumová, 2013). Zatímco Brown et al. (2002) použili *in situ* hybridizaci k detekci exprese genu *Dbp*, v ostatních studiích byla sledována rytmicita hodinových genů v reálném čase pomocí bioluminiscence.

Perioda zůstala u skupiny s jedním teplotním cyklem beze změny. Naopak opakované teplotní cykly vedly k signifikantní modulaci periody. Explanty s výchozí periodou kratší než 24 h vykazovaly prodloužení periody, zatímco u explantů s výchozí periodou delší než 24 h došlo k jejímu zkrácení. Tyto změny periody směrem k hodnotě 24 h naznačují schopnost opakovaných teplotních cyklů fungovat jako synchronizační signál pro fetální SCN. Na schopnost modulace periody a vysokou plasticitu rytmu poukázal i Saini et al. (2012) v periferních hodinách. Dle jeho výsledků jsou rytmy exprese genů v buňkách fibroblastů citlivé na změnu teploty o pouhý 1 °C a mohou se pomocí teplotních cyklů adaptovat na kratší nebo delší periody.

Velmi silný účinek teplotních cyklů byl pozorován také u vzorků, které byly původně vyřazeny z analýzy z důvodu slabých oscilací a nízké amplitudy. Po aplikaci jednorázového nebo opakovaného teplotního cyklu došlo u těchto explantů k obnovení bioluminiscenčních rytmů a výraznému nárůstu amplitudy. U explantů s výchozí periodou kratší než 24 h vedly opakované teplotní cykly k jejímu signifikantnímu prodloužení. Naproti tomu u explantů s periodou delší než 24 h bylo zaznamenáno její zkrácení jen u části vzorků. Modulace periody nebyla ve skupině explantů s nízkou amplitudou oboustranná, což by mohlo souviset s výchozím stavem explantů, tedy nízkou amplitudou a celkově slabou rytmicitou. Nelze

vyločit, že tyto explanty vyžadují silnější nebo delší teplotní stimulaci k jejich plné synchronizaci. Každopádně k obnovení oslabených bioluminiscenčních rytmů genu došlo i ve studii Sládek et al. (2013) po aplikaci dvoudenního teplotního cyklu.

U všech explantů kultivovaných bez teplotní stimulace byl během záznamu pozorován postupný útlum rytmicity, který se projevil poklesem amplitudy, prodloužením periody a nárůstem její variability. Tento jev, označovaný jako tzv. *damping*, se objevil i v jiných studiích při kultivaci ve stálé teplotě bez *Zeitgeberu* (Brown et al., 2002; Sládek & Sumová, 2013). Aplikace teplotních cyklů tento pokles rytmické aktivity zpomalila.

Dospělé SCN je rezistentní nejen vůči teplotním pulzům, ale i opakovaným teplotním cyklům. SCN tuto odolnost ztrácí v případě absence primárních řasinek v SCN, narušením neuronální sítě v SCN pomocí již zmiňovaného tetrodotoxinu (TTX), nebo při použití SCN novorozených a juvenilních potkanů (Buhr et al., 2010; Herzog & Huckfeldt, 2003; Tu et al., 2023). V těchto případech SCN vystavené teplotním cyklům reaguje velmi podobně jako periferní hodiny. Vzhledem k tomu, že naše experimenty byly provedeny na fetálních SCN a tato tkáň ještě nedosáhla plné zralosti neuronální sítě, výsledky plně podporují výše zmíněné studie, a i v tomto případě je nutno vyzdvihnout důležitou úlohu mezibuněčné komunikace a dokončeného vývoje SCN pro správnou teplotní rezistenci.

### **6.3 Vliv kvercetinu na teplotní odpověď fetálních SCN**

Vzhledem k pozitivní odpovědi fetálních SCN na opakované teplotní cykly bylo dalším cílem ověřit, zda je možné tuto odpověď farmakologicky inhibovat prostřednictvím aplikace kvercetinu (Q). Podobný experiment použili Buhr et al. (2010) na periferních oscilátorech. Přidáním 100 $\mu$ M kvercetinu do média byl inhibována transkripční aktivita HSF1, což je hlavní regulátor molekulární dráhy teplotního šoku (HSR). Aplikace teplotního pulzu o teplotě 38,5 °C nezpůsobila teplotně indukované fázové posuny rytmů PER2-bioluminiscence a kvercetin zcela zablokoval teplotní odpověď.

Výsledky ukázaly, že explanty s aplikovaným kvercetinem v médiu měly signifikantně nižší relativní amplitudu i periodu rytmů PER2-bioluminiscence oproti kontrolní skupině s aplikací VEH. Snížená amplituda rytmu PER2 může souviset s narušenou translokací HSF1 do jádra a jeho vazbou na DNA, jak bylo popsáno v jiných (Reinke et al., 2008; Tamaru et al., 2011). Z výsledků vyplývá, kvercetin by mohl alespoň částečně inhibovat teplotní odpověď ve fetálním SCN.

## 6.4 Teplotní kompenzace ve fetálních a dospělých SCN

Výpočtem teplotních koeficientů ( $Q_{10}$ ) pro fetální i dospělé SCN byla analyzována míra teplotní kompenzace rytmů PER2-bioluminiscence. Hodnoty  $Q_{10}$  v rozmezí 0,8–1,2 jsou považovány za typické pro fyziologickou teplotní kompenzaci v cirkadiánním systému (Dunlap et al., 2004). Výsledky potvrdily, že dospělé SCN vykazují silnou teplotní kompenzaci. Při snížení teploty byla průměrná hodnota  $Q_{10} = 1,01$ , při zvýšení teploty  $Q_{10} = 0,94$ . Nižší hodnota je způsobena jedním z explantů s výslednou hodnotou  $Q_{10} \approx 0,6$ , jehož perioda se prodloužila při zvýšené teplotě. Explant vykazoval stabilní oscilace a vlastnosti rytmu odpovídající ostatním explantům, nebyl proto vyřazen z analýzy. Přesto nelze vyloučit, že nižší hodnota  $Q_{10}$  může souviset například se sníženou viabilitou explantu například z důvodu špatné manipulace během experimentu.

Fetální SCN byly během snížení teploty teplotně kompenzované ( $Q_{10} = 0,93$ ), ale nižší  $Q_{10}$  odpovídá spíše hodnotám pozorovaných u periferních hodin, které se obvykle pohybují mezi 0,89–0,96 v závislosti na typu tkáně (Reyes et al., 2008). Při zvýšení teploty z 37 °C na 38,5 °C byla průměrná hodnota teplotního koeficientu na dolní hranici fyziologické teplotní kompenzace ( $Q_{10} = 0,8$ ). Velká část vzorků při zvýšené teplotě vykazovala překvapivě efekt tzv. overkompenzace, tedy prodloužení periody a zpomalení rytmů při vyšší teplotě. Podobné výsledky byly popsány u myších fibroblastů *in vitro*, kdy měly rytmy hodinových genů kratší periodu v nižších teplotách nebo delší periodu s rostoucí teplotou (Dibner et al., 2009; Izumo et al., 2003).

Teplotní kompenzace byla dříve prokázána i na úrovni jednotlivých neuronů SCN. Herzog et al. (2003) uvádějí průměrnou hodnotu jednotlivých buněk  $Q_{10} \approx 0,99$ , což naznačuje, že tento mechanismus může být přítomen již intracelulárně. Pokud je stabilní teplotní kompenzace v SCN ( $Q_{10} = 1,04$ ) narušena inhibítoem proteinu HSF1 (KNK437), hodnota  $Q_{10}$  stoupla na 1,34 a došlo k narušení teplotní kompenzace. Zablokování neuronálních sítí pomocí TTX nevyvolalo žádné změny a kompenzace zůstala zachována ( $Q_{10} = 1,06$ ), což potvrzuje, že tento jev je řízen především intracelulárními mechanismy na úrovni buněk (Buhr et al., 2010). Je tedy možné, že samotná teplotní kompenzace je zajištěna pomocí intracelulárních mechanismů, zatímco k synchronizaci SCN je potřeba správná mezibuněčná komunikace. Ve vývojovém stádiu E17 fetální SCN nedosahují dokonalé úrovně teplotní kompenzace jako v dospělých SCN. Jedním z vysvětlení by mohla být nižší aktivita signalizační dráhy odpovědi teplotního šoku HSR, která v tomto stádiu nemusí plně fungovat. V budoucnosti by bylo například zajímavé porovnat

hladinu mRNA a proteinu genu *Hsf1* ve fetálním, postnatálním a plně vyvinutém dospělém SCN, a porovnat citlivost odpovědi těchto SCN na HSF1 agonisty.

## 6.5 Limitace

Hlavní limitací této práce může být použití samotného *ex vivo* modelu organotypických explantů fetálního SCN. Tento model sice umožňuje detailní sledování účinku teplotní změny, ale není možné pozorovat komplexní interakce v těle a další vlivy, které mohou modulovat odpověď na cirkadiánní rytmy, jako například hladina hormonů, stres, příjem potravy, pohybová a spánková aktivita, které v *in vivo* modelu do značné míry ovlivňují tělesnou teplotu (Weaver & Reppert, 1989). Kombinace těchto faktorů může mít jiný dopad na amplitudu a periodu rytmů než teplota samotná a tím se lišit od experimentálního modelu.

Přestože byl postup odběrů, kultivace a samotná manipulace s explanty stejná, docházelo k vysoké variabilitě mezi vzorky během teplotní odpovědi. Tato variabilita mohla vzniknout způsobem řezu SCN. U dospělých SCN s aplikací TTX došlo k výraznější reakci na změnu teploty při dorzoventrálním řezu SCN než při řezu sagitálním (pravolevém) (Buhr et al., 2010). Během experimentů této diplomové práce byl během přípravy explantu mozek krájen rostrokaudálně a u některých explantů mohlo dojít k narušení ve směru dorzoventrální osy, tím i poškození síťového propojení potřebného pro teplotní kompenzaci. V neposlední řadě je také třeba zmínit skutečnost, že u fetálních i periferních oscilátorů časem při kultivaci přirozeně dochází ke snižování amplitudy rytmu (z angl. *damping*) (Čečmanová et al., 2019; Yoo et al., 2004), což také může zkrášlovat sílu odpovědi explantů na změny teploty.

Další limitací může být umělé modelování teplotního cyklu typu „square-wave“, který se sice snaží napodobit denní a noční tělesnou teplotu, ale neodpovídá přirozenému kolísání teploty v těle matky, kde výkyvy teploty bývají plynulejší a běžně asymetrické (Brown et al., 2002). Přirozený teplotní profil u savců je navíc výsledkem kombinace metabolických, fyziologických a behaviorálních procesů, které mohou vytvořit jiný typ teplotní odpovědi a synchronizační odezvy než v laboratorních podmínkách.

Další omezení představuje aplikace teplotních pulzů a cyklů ve stejném časovém bodě pro všechny vzorky, bylo tedy obtížné sestavit fázově responzní křivku (PRC), která je velmi často využívána pro zhodnocení fázového posunu a je dalším parametrem cirkadiánních hodin. Přidáním tohoto parametru do dalších výzkumů by mohlo přinést bližší vysvětlení synchronizační odpovědi a efektu teploty na amplitudu a periodu rytmu.

## 7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zkoumat vlivy změny teploty a jejich efekt na synchronizaci fetálních cirkadiálních hodin v SCN s využitím *ex vivo* modelu organotypických explantů *mPer2<sup>Luc</sup>* myši. Byl zkoumán vliv několika forem teplotních změn na základní parametry cirkadiálního rytmu.

Již hodinový jednorázový teplotní pulz způsobil akutní nárůst relativní amplitudy a prodloužení periody rytmu PER2 v případě zvýšení teploty. Opakované teplotní cykly vyvolaly silnější a dlouhodobější efekt. U SCN ve stádiu E17 došlo ke zvýšení amplitudy a modulaci 24hodinové periody. Dále u vzorků se slabými oscilacemi výsledky ukázaly obnovení rytmicity, které přetrvávalo i po ukončení teplotního cyklu. Z hlediska získaných dat jsou fetální SCN citlivé na pouhý hodinový jednorázový pulz, ale pro synchronizační efekt je potřeba silnějšího stimulu, v tomto případě opakované teplotní cykly.

Během inhibice transkripčního faktoru HSF1 a narušení dráhy teplotního šoku (HSR) pomocí kvercetinu došlo u fetálních SCN k utlumené teplotní odpovědi na teplotní cykly oproti kontrolním explantům v podobě snížené relativní amplitudy a periody.

Dále byla v diplomové práci vyhodnocena míra teplotní kompenzace ve fetálních a dospělých SCN pomocí výpočtu teplotního koeficientu  $Q_{10}$ . Výsledky ukázaly, že dospělé SCN si udržuje stabilní periodu při poklesu nebo snížení teploty, ale fetální SCN vykazuje naopak nižší míru teplotní kompenzace.

Všechny tyto výsledky podporují myšlenku, že citlivost na teplotní změny může být důsledkem nedostatečně vyvinutého buněčného spojení mezi neurony v SCN, které zajišťuje odolnost hodin na teplotní změny v dospělém SCN. Jelikož rozmezí teplot během experimentu odpovídá fyziologickému rozhraní tělesné teploty, získaná data podporují hypotézu, že změny tělesné teploty matky mohou sloužit jako významný synchronizační signál pro vyvíjející se cirkadiální hodiny plodu.

Získané poznatky přispívají k lepšímu porozumění vývoje fetálních SCN a jejich reakci na změny teplot. Tyto výsledky otevírají prostor pro další výzkum vývoje SCN a mateřské synchronizace v *in vivo* podmínkách, případně pro rozšíření budoucích studií o další vývojová stádia.

## 8 Literatura

- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) and CKI $\delta$  in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1693–1703. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1693-1703.2002>
- Ansari, N., Agathagelidis, M., Lee, C., Korf, H., & Von Gall, C. (2009). Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *European Journal of Neuroscience*, 29(3), 477–489. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06605.x>
- Aschoff, J. (1981). Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. In J. Aschoff (Ed.), *Biological Rhythms* (s. 81–93). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_6)
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8(4), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn1419>
- Aton, S. J., Huettner, J. E., Straume, M., & Herzog, E. D. (2006). GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19188–19193. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607466103>
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30(2), 525–536. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00302-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00302-6)
- Bates, K., & Herzog, E. D. (2020). Maternal-Fetal Circadian Communication During Pregnancy. *Frontiers in Endocrinology*, 11(198). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00198>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>

---

Sekundární citace označeny \*

- Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31 (Suppl 5), S157–S161. <https://doi.org/10.1086/317521>
- Brown, S. A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current biology*, 12(18), 1574–1583. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01145-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01145-4)
- Buhr, E. D., Yoo, S.-H., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379–385. <https://doi.org/10.1126/science.1195262>
- Buijs, R. M., La Fleur, S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., Kalsbeek, A., Nagai, K., & Nijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/cne.10765>
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., & Bradfield, C. A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), 1009–1017. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00205-1)
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., & Pagano, M. (2007). SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science*, 316(5826), 900–904. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1141194>
- Carmona-Alcocer, V., Abel, J. H., Sun, T. C., Petzold, L. R., Doyle, F. J., Simms, C. L., & Herzog, E. D. (2018). Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 38(6), 1326–1334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-17.2017>
- Čečmanová, V., Houdek, P., Šuchmanová, K., Sládek, M., & Sumová, A. (2019). Development and Entrainment of the Fetal Clock in the Suprachiasmatic Nuclei: The Role of Glucocorticoids. *Journal of Biological Rhythms*, 34(3), 307–322. <https://doi.org/10.1177/0748730419835360>

- Dibner, C., Sage, D., Unser, M., Bauer, C., D'Eysmond, T., Naef, F., & Schibler, U. (2009). Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO Journal*, *28*(2), 123–134. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.262>
- El-Hennamy, R., Matějů, K., Bendová, Z., Sosniyenko, S., & Sumová, A. (2008). Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, *23*(5), 435–444. <https://doi.org/10.1177/0748730408322635>
- Enoki, R., Kon, N., Shimizu, K., Kobayashi, K., Hiro, S., Chang, C. P., Nakane, T., Ishii, H., Sakamoto, J., Yamaguchi, Y., & Nemoto, T. (2023). Cold-induced suspension and resetting of Ca<sup>2+</sup> and transcriptional rhythms in the suprachiasmatic nucleus neurons. *iScience*, *26*(12). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2023.108390>
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, *280*(5369), 1564–1569. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5369.1564>
- Gotic, I., Omidi, S., Fleury-Olela, F., Molina, N., Naef, F., & Schibler, U. (2016). Temperature regulates splicing efficiency of the cold-inducible RNA-binding protein gene *Cirbp*. *Genes and Development*, *30*(17), 2005–2017. <https://doi.org/10.1101/GAD.287094.116>
- Greiner, P., Houdek, P., Sládek, M., & Sumová, A. (2022). Early rhythmicity in the fetal suprachiasmatic nuclei in response to maternal signals detected by omics approach. *PLoS biology*, *20*(5), e3001637. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001637>
- Gu, C., Tang, M., & Yang, H. (2016). The synchronization of neuronal oscillators determined by the directed network structure of the suprachiasmatic nucleus under different photoperiods. *Scientific Reports*, *6*, 28878. <https://doi.org/10.1038/srep28878>
- Hafner, M., Koepl, H., & Gonze, D. (2012). Effect of network architecture on synchronization and entrainment properties of the circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus. *PLoS computational biology*, *8*(3), e1002419. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002419>
- Herzog, E. D., & Huckfeldt, R. M. (2003). Circadian entrainment to temperature, but not light, in the isolated suprachiasmatic nucleus. *Journal of neurophysiology*, *90*(2), 763–770. <https://doi.org/10.1152/JN.00129.2003>

- Hoekstra, M. M. B., Ness, N., Badia-Soteras, A., & Brancaccio, M. (2024). Bmal1 integrates circadian function and temperature sensing in the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *121*(17), e2316646121. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2316646121>
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S., & Bradfield, C. A. (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(10), 5474–5479. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.10.5474>
- Houdek, P., Polidarová, L., Nováková, M., Matějů, K., Kubík, Š., & Sumová, A. (2015). Melatonin administered during the fetal stage affects circadian clock in the suprachiasmatic nucleus but not in the liver. *Developmental Neurobiology*, *75*(2), 131–144. <https://doi.org/10.1002/dneu.22213>
- Houdek, P., & Sumová, A. (2014). In Vivo Initiation of Clock Gene Expression Rhythmicity in Fetal Rat Suprachiasmatic Nuclei. *PLoS ONE*, *9*(9), 107360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107360>
- Inouye, S. K., & Charpentier, P. A. (1996). Precipitating factors for delirium in hospitalized elderly persons. Predictive model and interrelationship with baseline vulnerability. *JAMA*, *275*(11), 852–857. <https://doi.org/10.1001/jama.1996.03530350034031>
- Izumo, M., Johnson, C. H., & Yamazaki, S. (2003). Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: temperature compensation and damping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 16089–16094. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2536313100>
- Jud, C., & Albrecht, U. (2006). Circadian Rhythms in Murine Pups Develop in Absence of a Functional Maternal Circadian Clock. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(2), 149–154. <https://doi.org/10.1177/0748730406286264>
- Kabrita, C. S., & Davis, F. C. (2008). Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: Determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus. *Brain Research*, *1195*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.020>
- Kováčiková, Z., Sládek, M., Bendová, Z., Illnerová, H., & Sumová, A. (2006). Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early

- postnatal development. *Journal of Biological Rhythms*, 21(2), 140–148. <https://doi.org/10.1177/0748730405285876>
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4)
- Landgraf, D., Koch, C. E., & Oster, H. (2014). Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 143. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2014.00143>
- Leak, R. K., Card, J. P., & Moore, R. Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*, 819(1–2), 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01317-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01317-1)
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual review of genomics and human genetics*, 5, 407–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
- Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *The Journal of neuroscience*, 20(10), 3830–3842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03830.2000>
- Lu, J., Zhang, Y. H., Chou, T. C., Gaus, S. E., Elmquist, J. K., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *The Journal of neuroscience*, 21(13), 4864–4874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04864.2001>
- Lužná, V., Liška, K., Sládek, M., & Sumová, A. (2021). Hormonal fine-tuning of clock in decidual region of mouse placenta by dopamine, melatonin, insulin, leptin and ghrelin. *Placenta*, 108, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.03.015>
- Matějů, K., Sumová, A., & Bendová, Z. (2010). Expression and light sensitivity of clock genes *Per1* and *Per2* and immediate-early gene *c-fos* within the retina of early postnatal Wistar rats. *Journal of Comparative Neurology*, 518(17), 3630–3644. <https://doi.org/10.1002/cne.22421>

- Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H. A., Spichiger, C., Richter, H. G., Valenzuela, G. J., Seron-Ferre, M., & Torres-Farfan, C. (2012). Timed Maternal Melatonin Treatment Reverses Circadian Disruption of the Fetal Adrenal Clock Imposed by Exposure to Constant Light. *PLoS ONE*, 7(8), e42713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042713>
- Miyake, T., Inoue, Y., Maekawa, Y., & Doi, M. (2024). Circadian Clock and Body Temperature. *Advances in experimental medicine and biology*, 1461, 177–188. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-4584-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-97-4584-5_12)
- Miyake, T., Inoue, Y., Shao, X., Seta, T., Aoki, Y., Nguyen Pham, K. T., Shichino, Y., Sasaki, J., Sasaki, T., Ikawa, M., Yamaguchi, Y., Okamura, H., Iwasaki, S., & Doi, M. (2023). Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. *Cell Reports*, 42(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112157>
- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. In *Annual Review of Neuroscience* (Roč. 35, s. 445–462). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>\*
- Moore, R., & Eichler, V. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42, 201–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, R., & Lenn, N. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 146(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.901460102>
- Moore, R. Y., & Bernstein, M. E. (1989). Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of neuroscience*, 9(6), 2151–2162. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-02151.1989>
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience letters*, 150(1), 112–116. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90120-a](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90120-a)
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and tissue research*, 309(1), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>

- Morf, J., Rey, G., Schneider, K., Stratmann, M., Fujita, J., Naef, F., & Schibler, U. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science*, 338(6105), 379–383. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1217726>
- Morin, L. P., & Allen, C. N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews*, 51(1), 1–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.08.003>
- Naitoh, N., Watanabe, Y., Matsumura, K., Murai, I., Kobayashi, K., Imai-Matsumura, K., Ohtuka, H., Takagi, K., Miyake, Y., Satoh, K., & Watanabe, Y. (1998). Alteration by Maternal Pinealectomy of Fetal and Neonatal Melatonin and Dopamine D1 Receptor Binding in the Suprachiasmatic Nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), 850–854. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9819>
- Narasimamurthy, R., & Virshup, D. M. (2017). Molecular mechanisms regulating temperature compensation of the circadian clock. *Frontiers in Neurology*, 8, 258709. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00161>\*
- Nováková, M., Sládek, M., & Sumová, A. (2010). Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light-dark regime. *Journal of Biological Rhythms*, 25(5), 350–360. <https://doi.org/10.1177/0748730410377967>
- Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tamura, S., & Sagara, Y. (1998). Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *Journal of Pineal Research*, 25(3), 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00550.x>
- Olejniczak, I., Pilorz, V., & Oster, H. (2023). Circle(s) of Life: The Circadian Clock from Birth to Death. *Biology*, 12(3), 383. <https://doi.org/10.3390/biology12030383>\*
- Pardridge, W. M., & Mietus, L. J. (1980). Transport of Albumin-bound Melatonin Through the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, 34(6), 1761–1763. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb11272.x>
- Parraguez, V. H., Valenzuela, G. J., Frgara, C., Ducsay, C. A., Yellon, S. M., & Seron-ferre, M. (1996). Effect of Constant Light on Fetal and Maternal Prolactin Rhythms in Sheep\*. *Endocrinology*, 137(6), 2355–2361. <https://doi.org/10.1210/endo.137.6.8641186>

- Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2020). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 67–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>\*
- Pinato, L., Frazão, R., Cruz-Rizzolo, R. J., Cavalcante, J. S., & Nogueira, M. I. (2009). Immunocytochemical characterization of the pregeniculate nucleus and distribution of retinal and neuropeptide Y terminals in the suprachiasmatic nucleus of the Cebus monkey. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 37(4), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.01.005>
- Pittendrigh, C. S. (1954). On Temperature Independence In The Clock System Controlling Emergence Time In *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40(10), 1018–1029. <https://doi.org/10.1073/PNAS.40.10.1018>
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. *Journal of Comparative Physiology*, 106, 253–266. <https://doi.org/10.1007/BF01417857>
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Refinetti, R. (2016). *Circadian Physiology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039016>
- Refinetti, R., & Menaker, M. (1992). The Circadian Rhythm of Body Temperature. *Physiology & Behavior*, 51(3), 613–637. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90188-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90188-8)\*
- Reinke, H., Saini, C., Fleury-Olela, F., Dibner, C., Benjamin, I. J., & Schibler, U. (2008). Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes & development*, 22(3), 331–345. <https://doi.org/10.1101/GAD.453808>
- Reischl, S., Vanselow, K., Westermark, P. O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzel, H., & Kramer, A. (2007).  $\beta$ -TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics. *Journal of Biological Rhythms*, 22(5), 375–386. <https://doi.org/10.1177/0748730407303926>

- Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Rosales-Corral, S. A. (2014). Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Human Reproduction Update*, 20(2), 293–307. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt054>
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1984). The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *The Journal of neuroscience*, 4(7), 1677–1682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-07-01677.1984>
- Reyes, B. A., Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2008). Mammalian Peripheral Circadian Oscillators Are Temperature Compensated. *Journal of biological rhythms*, 23(1), 95. <https://doi.org/10.1177/0748730407311855>
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., & Scott, M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317(5836), 372–376. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1139740>
- Rothhaas, R., & Chung, S. (2021). Role of the Preoptic Area in Sleep and Thermoregulation. *Frontiers in neuroscience*, 15, 664781. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.664781>
- Ruby, N. F., Burns, D. E., & Heller, H. C. (1999). Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. *The Journal of neuroscience*, 19(19), 8630–8636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-08630.1999>
- Saini, C., Morf, J., Stratmann, M., Gos, P., & Schibler, U. (2012). Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes & development*, 26(6), 567–580. <https://doi.org/10.1101/GAD.183251.111>
- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257–1263. <https://doi.org/10.1038/nature04284>\*
- Satinoff, E. (1978). Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science*, 201(4350), 16–22. <https://doi.org/10.1126/science.351802>
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy

- reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527–537. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2004.07.018>
- Seron-Ferre, M., Valenzuela, G. J., & Torres-Farfan, C. (2007). Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 81(3), 204–214. <https://doi.org/10.1002/BDRC.20101>
- Shao, X., Miyake, T., Inoue, Y., Hasegawa, E., & Doi, M. (2024). Temperature-Dependent Upregulation of Per2 Protein Expression Is Mediated by eIF2 $\alpha$  Kinases PERK and PKR through PI3K Activation. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 47(3), 600–605. <https://doi.org/10.1248/BPB.B23-00739>
- Shibata, S., & Moore, R. Y. (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, 431(2), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90220-3)
- Shimomura, H., Moriya, T., Sudo, M., Wakamatsu, H., Akiyama, M., Miyake, Y., & Shibata, S. (2001). Differential daily expression of *Per1* and *Per2* mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *European Journal of Neuroscience*, 13(4), 687–693. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01438.x>
- Schibler, U. (2024). Steven A. Brown and the synchronization of circadian rhythms by body temperature cycles. *The European journal of neuroscience*, 60(2), 3891–3900. <https://doi.org/10.1111/EJN.16431>\*
- Schmal, C., Maier, B., Ashwal-Fluss, R., Bartok, O., Finger, A. M., Bange, T., Koutsouli, S., Robles, M. S., Kadener, S., Herzog, H., & Kramer, A. (2023). Alternative polyadenylation factor CPSF6 regulates temperature compensation of the mammalian circadian clock. *PLoS biology*, 21(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002164>
- Schmidt, T. M., Taniguchi, K., & Kofuji, P. (2008). Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *Journal of Neurophysiology*, 100(1), 371–384. <https://doi.org/10.1152/jn.00062.2008>
- Sládek, M., & Sumová, A. (2013). Entrainment of spontaneously hypertensive rat fibroblasts by temperature cycles. *PloS one*, 8(10), e77010. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077010>
- Sládek, M., Sumová, A., Kováčiková, Z., Bendová, Z., Laurinová, K., & Illnerová, H. (2004). Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat

- suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 6231–6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401149101>
- Son, G., Neylan, T. C., & Grinberg, L. T. (2024). Neuronal and glial vulnerability of the suprachiasmatic nucleus in tauopathies: evidence from human studies and animal models. *Molecular Neurodegeneration*, 19(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00695-4>
- Sumová, A., & Čečmanová, V. (2020). Mystery of rhythmic signal emergence within the suprachiasmatic nuclei. *European Journal of Neuroscience*, 51(1), 300–309. <https://doi.org/10.1111/ejn.14141>\*
- Takahashi, J. S. (2016). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18(3), 164–179. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Benjamin, I., Ozawa, T., & Takamatsu, K. (2011). Synchronization of circadian *Per2* rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PloS one*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024521>
- Tu, H. Q., Li, S., Xu, Y. L., Zhang, Y. C., Li, P. Y., Liang, L. Y., Song, G. P., Jian, X. X., Wu, M., Song, Z. Q., Li, T. T., Hu, H. Bin, Yuan, J. F., Shen, X. L., Li, J. N., Han, Q. Y., Wang, K., Zhang, T., Zhou, T., ... Li, H. Y. (2023). Rhythmic cilia changes support SCN neuron coherence in circadian clock. *Science*, 380(6648), 972–979. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABM1962>
- Umemura, Y., Koike, N., Ohashi, M., Tsuchiya, Y., Meng, Q. J., Minami, Y., Hara, M., Hisatomi, M., & Yagita, K. (2017). Involvement of posttranscriptional regulation of *Clock* in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), E7479–E7488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703170114>
- Van den Pol, A. N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *The Journal of comparative neurology*, 191(4), 661–702. <https://doi.org/10.1002/cne.901910410>
- Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (1989). Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Developmental Brain Research*, 46(2), 291–296. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(89\)90292-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(89)90292-7)

- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995). Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms. *Neuron*, *14*(4), 697–706. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90214-7)
- Wong, S. D., Wright, K. P., Spencer, R. L., Vetter, C., Hicks, L. M., Jenni, O. G., & LeBourgeois, M. K. (2022). Development of the circadian system in early life: maternal and environmental factors. *Journal of Physiological Anthropology* 2022, *41*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40101-022-00294-0>\*
- Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J., & Uchiyama, Y. (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3846–3851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913256107>
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0308709101>
- Yoshikawa, T., Matsuno, A., Yamanaka, Y., Nishide, S. ya, Honma, S., & Honma, K. ichi. (2013). Daily exposure to cold phase-shifts the circadian clock of neonatal rats in vivo. *The European journal of neuroscience*, *37*(3), 491–497. <https://doi.org/10.1111/EJN.12052>
- Zhang, Z. B., Sinha, J., Bahrami-Nejad, Z., & Teruel, M. N. (2022). The circadian clock mediates daily bursts of cell differentiation by periodically restricting cell-differentiation commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(33), e2204470119. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2204470119/-/DCSUPPLEMENTAL>