

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kseniia Lavrova**

Cirkadiánní hodiny v buňkách imunitního systému

Circadian clocks in cells of the immune system

Bakalářská práce

Školitelka: Doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

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

V Praze, 5.9.2019

Kseniia Lavrova

## **Abstrakt**

Cirkadiánní rytmy ovlivňují všechny fyziologické procesy v organismu, včetně imunitních funkcí. Cirkadiánní oscilace pozorujeme téměř u všech složek imunitního systému. Tyto oscilace generují molekulární hodiny, které jsou v každé buňce a jsou synchronizované s hlavním pacemakerem CSN pomocí sekrece hormonů a neuronální inervace. Díky nastavení cirkadiánním systémem je imunitní systém více připraven k odpovědi na patogeny během aktivní fáze dne, kdy je riziko setkání s patogenem vyšší.

Makrofágy jsou buňky vrozeného imunitního systému a hlavní modulátory zánětu. Jejich aktivita, včetně produkce cytokinů, fagocytózy a polarizace na M1 a M2 fenotypy je těsně spojena s molekulárními hodinami. Toto spojení cirkadiánního a imunitního systému má význam pro průběh řady zánětlivých onemocnění, jako jsou artritida a ateroskleróza.

### **Klíčová slova:**

cirkadiánní hodiny, hodinové geny, makrofág, melatonin, glukokortikoidy

## **Abstract**

Circadian rhythms affect all physiological processes in the body, including immune function. Circadian oscillations are observed in almost all components of the immune system. This oscillation generates molecular clocks that are in each cell and are synchronized by the main CSN pacemaker with help hormone secretion and neuronal innervation. As a result, the immune system is ready for increased responses to pathogens during the active phase when is higher risk of bruising with it.

Macrophages are cells of the natural immune system and main modulators of inflammation. Their activity, including cytokine production, phagocytosis and polarization to M1 and M2 phenotypes is closely linked to the molecular clock. This association between circadian and immune systems has implications for the course of a series of inflammatory diseases, such as arthritis and atherosclerosis.

The aim of this thesis is to investigate the effect of circadian system on macrophage function in inflammatory response.

### **Keywords:**

circadian clocks, circadian genes, macrophage, melatonin, glucocorticoids

## Seznam použitých zkratek

ACTH	–	adrenocorticotropic hormone
Akt	–	RAC serine/threonine-protein kinase
AP-1	–	activator protein 1
ARNTL	–	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
ASC	–	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BMAL	–	brain and muscle ARNT-Like 1
bZIP	–	basic leucine zipper domain
cAMP	–	cyclic adenosine monophosphate
CBP	–	CREB-binding protein
CCL	–	chemokine ligand
CCR2	–	C-C chemokine receptor type 2
CFU-GM	–	granulocyte-macrophage progenitor
CK1 $\delta/\epsilon$	–	casein kinase 1 isoform delta / epsilon
CLOCK	–	circadian locomotor output cycles kaput
CLR	–	C-type lectin receptors
CNS	–	central nervous system
COX-2	–	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
CREB	–	cAMP response element-binding protein
CRH	–	corticotropin-releasing hormone
CRY	–	cryptochromes
CSF-1	–	colony stimulating factor 1
DAG	–	diacylglycerol
DAMP	–	damage associated molecular patterns
DBP	–	D site of albumin promoter binding protein
DNA	–	deoxyribonucleic acid
ERK	–	extracellular signal–regulated kinases
FBXL3	–	F-box/LRR-repeat protein 3
GABA	–	gamma-aminobutyric acid
GC	–	glucocorticoid
GILZ	–	TSC22 domain family protein 3

GMP	-	granulocyte-macrophage progenitor
GPCR	-	G protein-coupled receptors
GR	-	glucocorticoid receptor
GRIP1	-	glutamate receptor-interacting protein
HAT	-	histone acetyltransferases
HDAC3	-	histone deacetylase 3
HIF-1 $\alpha$	-	hypoxia-inducible factor 1-alpha
HLF	-	hepatic leukemia factor
HRE	-	hormone response element
HSC	-	hematopoietic stem cells
IFN $\gamma$	-	interferon gamma
IKK	-	I $\kappa$ B kinase
IL	-	interleukin
IL-1R	-	interleukin-1 receptor
IML	-	intermediolateral nucleus
iNOS	-	nitric oxide synthases
IP3	-	inositol trisphosphate
ipRGC	-	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
IRAK	-	interleukin-1 receptor associated kinase
IRF 1/8	-	interferon regulatory factor
IRS	-	insulin receptor substrate
JAK	-	janus kinase
JNK	-	c-Jun N-terminal kinases
KLF-4	-	kruppel-like factor 4
LDL	-	low-density lipoprotein
LPS	-	lipopolysaccharide
LXR	-	liver X receptor
MAPK	-	mitogen-activated protein kinase
MCP2	-	monocyte chemoattractant protein 2
M-CSF	-	macrophage colony-stimulating factor
MKP-1	-	MAPK phosphatase

MT	-	melatonin receptor
MyD88	-	myeloid differentiation primary response 88
NCoR	-	nuclear receptor co-repressor
NEMO	-	NF-kappa-B essential modulator
NFIL3	-	nuclear factor, interleukin 3 regulated
NF-kB	-	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK cell	-	natural killer cell
NLRP3	-	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NLR	-	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NPAS2	-	neuronal PAS domain protein 2
NRF2	-	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NRs	-	nuclear receptor
p65	-	nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit
PAMP	-	pathogen-associated molecular pattern
PI3K	-	phosphoinositide 3-kinase
PIP2	-	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	-	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKB	-	protein kinase B
PKC	-	protein kinase C
PLC	-	enzyme phospholipase C
PPAR-y	-	peroxisome proliferator-activated receptor
PRC2	-	polycomb repressive complex 2
PRR	-	pattern recognition receptor
PVN	-	paraventricular nucleus
RA	-	rheumatoid arthritis
REV-ERB	-	nuclear receptor subfamily 1, group D
RNA	-	ribonucleic acid
RORs	-	RAR-related orphan receptor
ROS	-	reactive oxygen species
RRE	-	Rev response element
SCG	-	superior cervical ganglion

SCN	-	suprachiasmatic nucleus
SIRT-1	-	Sirtuin 1
SMRT	-	silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors
SOCS	-	suppressor of cytokine signaling
STAT	-	signal transducer and activator of transcription protein
TBK1	-	serine/threonine-protein kinase TBK1
TEF	-	thyrotroph embryonic factor
TF	-	transcription factor
TLR	-	toll-like receptor
TNF-a	-	tumor necrosis factor alpha
TRAF6	-	TNF receptor associated factor
TRIF	-	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
Tyk2	-	non-receptor tyrosine-protein kinase
VSMC	-	vascular smooth muscle
WT	-	wild type
ZT	-	zeitgeber time

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Cirkadiánní hodiny u savců .....	1
2.1. Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin u savců.....	2
2.1.1. První zpětnovazebná smyčka .....	2
2.1.2. Druhá zpětnovazebná smyčka.....	2
2.1.3. Třetí zpětnovazebná smyčka.....	3
2.2. Synchronizace periferních hodin s SCN pomocí melatoninu a glukokortikoidu.....	3
2.2.1. SCN moduluje sekreci glukokortikoidu.....	4
2.2.2. SCN moduluje sekreci melatoninu .....	5
2.3. Periferní hodiny imunitního systému.....	5
3. Úloha makrofágů v zánětlivé reakci .....	6
4. Signalizace makrofágů.....	6
4.1. JAK/STAT signální cesta.....	7
4.2. TLR signalizace .....	8
4.2.1. NF-kB signální drahá.....	8
4.2.2. MAPK signální drahá.....	9
4.3. PI3K / PKB signální dráha.....	10
4.4. NLRP3 inflamazóm.....	10
5. Diferenciace monocytů a makrofágů.....	10
5.1. Cirkadiánní hodiny a diferenciace makrofágů.....	11
6. Cirkadiánní hodiny modulují zánětlivou reakci.....	12
6.1. Melatonin.....	12
6.2. Glukokortikoidy.....	14
6.3. CLOCK/BMAL .....	15
6.4. CRY.....	17
6.5. REV-ERB .....	17
6.6. RORs .....	18
7. Molekulární hodiny ovlivňují zánětlivou reakci pomocí regulace buněčného metabolismu .....	19
8. Choroby spojené se zánětem .....	19
8.1. Revmatoidní artritida.....	20
8.2. Ateroskleróza.....	21
9. Závěr .....	23
Přehled cirkadiánních mechanismů v makrofázích.....	24
Bibliografie.....	24

## 1. Úvod

Cirkadiánní rytmy představují evoluční adaptaci na životní prostředí s 24-hodinovým solárním dnem. Tyto rytmy jsou generovány a udržovány cirkadiánním systémem a řídí téměř všechny procesy v organizmech: fyziologické, metabolické a behaviorální.

Existuje hodně důkazů, které potvrzují těsné spojení mezi cirkadiánními hodinami a imunitními reakcemi, například denní změny citlivosti k patogenu, změny hladiny cytokinů a počet imunitních buněk v krvi a tkáních. Kromě toho, mnoho symptomů patologických stavů vykazuje cirkadiánní oscilace.

Cílem této bakalářské práce je popsat vliv cirkadiánního systému na funkce makrofágů v zánětlivé odpovědi.

## 2. Cirkadiánní hodiny u savců

Cirkadiánní hodiny u savců jsou koncipovány jako hierarchický systém, který funguje na úrovni buněk, tkání a systémů. Hlavní pacemaker cirkadiánního systému se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu (Welsh, Takahashi, & Kay, 2010) a slouží k synchronizaci periferních hodin v celém těle (Ralph, Foster, Davis, & Menaker, 1990). SCN se skládá z přibližně 20 000 autonomně oscilujících neuronů, vzájemně spojených do sítí a oscilujících s periodou od 22 do 30 hodin (Herzog, 2007).

Ačkoliv jsou neurony SCN schopné oscilovat samostatně, potřebují pro svoji koordinaci s prostředím nějaký environmentální vstup neboli Zeitgeber (doslovně "časovač", "synchronizátor") (Grandin, Alloy, & Abramson, 2006). Světlo je hlavní synchronizátor. Kromě klasických fotoreceptorů, tyčinek a čípků se v sítnici oka nacházejí speciální buňky ipRGC (z angl. intrinsic photoreceptive ganglion cells), které jsou citlivé na světlo a předávají informaci o světle přímo do SCN prostřednictvím retinohypothalamického traktu (Do & Yau, 2010).

SCN pak přenáší časové informace do buněk v jiných oblastech mozku a periferních orgánech prostřednictvím různých výstupů. Mezi ně patří neuronální spojení, endokrinní signály (jako jsou glukokortikoidy), rytmy tělesné teploty a časované přijímání potravy či jiné oscilující chování (Dibner, Schibler, & Albrecht, 2010)

Pro výzkumy se vytvářejí experimentální podmínky 12 hodin ve světle a 12 hodin ve tmě (12:12 LD). Čas v takových podmínkách je označen jako ZT (Zeitgeber time). ZT0 označuje začátek denního světla a ZT12 označuje začátek noci.

## 2.1. Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin u savců

Cirkadiální hodiny generují cirkadiální oscilace nezávisle na okolním prostředí. Toho je docíleno vzájemnými zpětnovazebnými interakcemi mezi tzv. hodinovými geny a jejich posttranskripčními a posttranslačními modifikacemi.

### 2.1.1. První zpětnovazebná smyčka

První zpětnovazebná smyčka je tvořena dvěma transkripčními faktory – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (BMAL1, známy taky jako ARNTL, MOP3) a circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) (Gekakis et al., 1998; Honma et al., 1998), které indukují expresi tří *Period* (*Per1-3*) (Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy, & Malik, 2014) a dvou *Cryptochrome* (*Cry1/2*) genů (Emery, So, Kaneko, Hall, & Rosbash, 1998). V některých případech, například ve tkáni prefrontální mozkové kůry, je místo proteinu CLOCK přítomen jeho paralog, neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2). NPAS2 je, stejně jako CLOCK, schopen tvořit heterodimer s BMAL1, aktivovat exprese *Cry* a *Per* genů a navíc inhibovat exprese *Bmal1* genu (Reick, Garcia, Dudley, & McKnight, 2001).

Heterodimer CLOCK/ BMAL1 se váže na promotorové oblasti obsahující E-boxy genů kódujících represorové proteiny PERIOD a CRYPTOCHROME. CLOCK aktivuje BMAL1 během dne, což vede k expresi *Per* a *Cry* genů odpoledne a k píku koncentrace proteinu PER a CRY večer. Hladiny *Bmal1* mRNA jsou také rytmické, v antifázi k *Per* a *Cry* genům. Proteiny PER a CRY na sebe vzájemně působí, tvoří PER/CRY komplexy, které jsou fosforylovány kinázou CK1 $\delta/\epsilon$  a translokovány do jádra. Tam proteiny fungují jako negativní regulátory CLOCK/BMAL1, inhibují tak transkripci vlastních genů, a vytvářejí negativní zpětnovazebnou smyčku. (Ko & Takahashi, 2006; C. Lee, Etchegaray, Cagampang, Loudon, & Reppert, 2001).

Hladiny proteinu PER a CRY se snižují, protože jejich stabilita je regulována fosforylací, která vede k ubikvitinaci pomocí E3-ubiquitin ligázami FBXL3 (Siepka et al., 2007). Tento proces degradace CRY a PER proteinu začíná nový cyklus aktivity CLOCK/BMAL1 (Obr. 1).

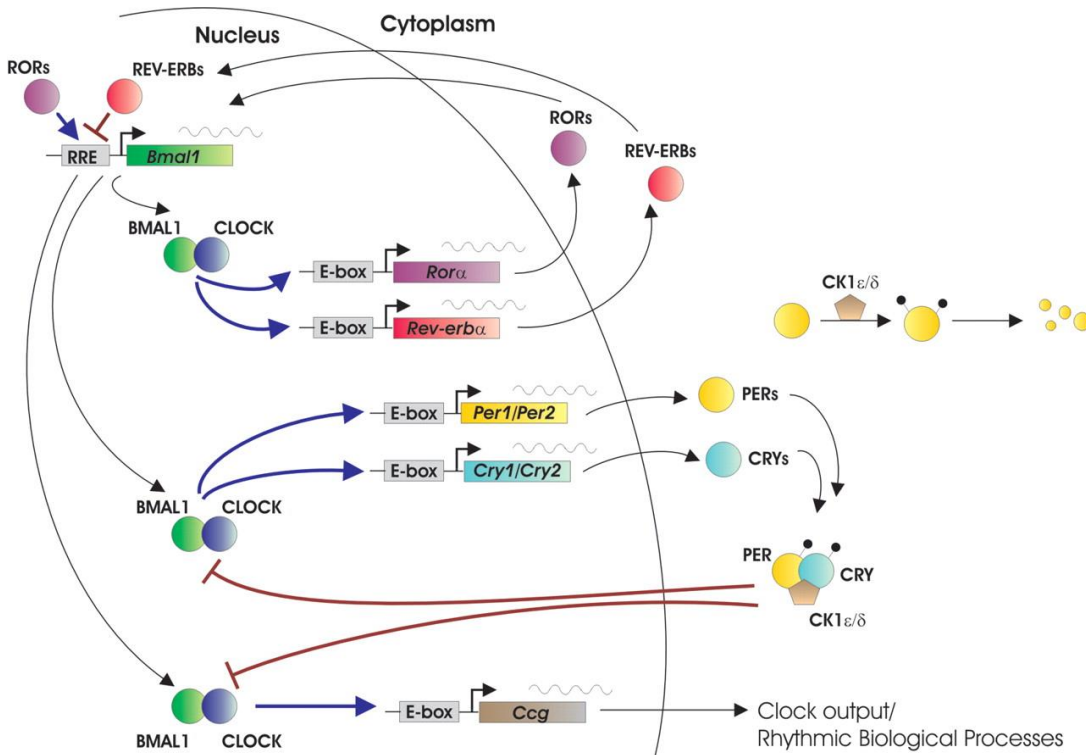
### 2.1.2. Druhá zpětnovazebná smyčka

Další mechanismus zpětné vazby je založen na kompetici transkripčních faktorů RAR-related orphan receptors (RORs) a jaderných receptorů REV-ERB $\alpha/\beta$  (geny *Nr1d1* a *Nr1d2*), které kontrolují transkripci *Bmal1* vazbou na RRE element v promotorové oblasti (Guillaumond, Dardente, Giguère, & Cermakian, 2005). Expese Rev-erb  $\alpha/\beta$  je pozitivně regulována heterodimerem CLOCK/ BMAL1 a negativně proteiny PER a CRY (Preitner et al., 2002).

### 2.1.3. Třetí zpětnovazební smyčka

Třetí transkripční smyčka zahrnuje několik transkripčních faktorů: D site of albumin promoter binding protein (DBP), thyrotroph embryonální faktor (TEF) a hepatic leukemia factor (HLF), které mají rytmickou expresi (Falvey, Fleury-Olela, & Schibler, 1995; Fonjallaz, Ossipow, Wanner, & Schibler, 1996; Lopez-Molina, Conquet, Dubois-Dauphin, & Schibler, 1997). Tyto proteiny kompetují na místech obsahujících D-boxy s represorem NFIL3 (nuclear factor interleukin 3 regulated, neboli E4BP4), který je řízen smyčkou REV-ERB / ROR, podobně jako *Bmal1* (Mitsui, Yamaguchi, Matsuo, Ishida, & Okamura, 2001).

Transkripce DBP je pozitivně regulována CLOCK/BMAL1, a negativně regulována proteiny PER a CRY prostřednictvím E-box motivů v promotoru *Dbp* genu. DBP spolu s NFIL3 taky přispívá k aktivaci transkripce *Per1/2*, *Rev-erb* a *Ror* (Yamaguchi et al., 2000).



Obrázek 1. Transkripční mechanismus cirkadiálních hodin (Ko & Takahashi, 2006)

### 2.2. Synchronizace periferních hodin s SCN pomocí melatoninu a glukokortikoidů

Periferní cirkadiální hodiny používají stejné molekulární komponenty jako SCN a hodinové geny byly detekovány ve všech jaderných buňkách těla. Nedávné studie ukazují, že více než 40% bílkovin kódujících RNA u myši a 80% u paviánů vykazuje ~ 24-hodinovou rytmickou expresi (Mure et al., 2018; R. Zhang, Lahens, Ballance, Hughes, & Hogenesch, 2014).

Centrální hodiny poskytují časový program pro celý organismus díky neuronální signalizaci (F. N. Buijs et al., 2016), důležitou roli však hraje také rytmická sekrece hormonů (Dumbell, Matveeva, & Oster, 2016).

Jedním z hlavních regulátorů periferních hodin, jsou glukokortikoidy (GC) a melatonin, přenášené krví k cílovým orgánům (H. Guo, Brewer, Champhekar, Harris, & Bittman, 2005). Sekrece melatoninu a glukokortikoidů je pevně řízena z SCN. Ačkoliv glukokortikoidy mají nejvyšší koncentrace během aktivní fáze (v noci u nočních zvířat a ve dne u denních), sekrece melatoninu probíhá vždy v noci (Andries Kalsbeek et al., 2008).

### **2.2.1. SCN moduluje sekrece glukokortikoidů**

Glukokortikoidy (GC) jsou steroidní hormony produkované v kůře nadledvinek. Jejich uvolňování do krve osciluje s ultradiánní periodou (Conway-Campbell, Pooley, Hager, & Lightman, 2012), ale celková amplituda se mění v průběhu dne a je modulována SCN (A. Kalsbeek et al., 2012). Mnoho druhů zvířat navíc vykazuje i sezónní změny hladin glukokortikoidů (Ellis et al., 2012).

Jejich sekrece je regulovaná primárně HPA osou (hypotalamus – hypofýza – nadledviny). SCN pomocí vazopresinu moduluje aktivitu PVN (paraventriculární hypotalamické jádro), jednoho z hlavních jader přenášejících cirkadiánní informace z SCN do zbytku těla (Saeb-Parsy et al., 2000). PVN produkuje peptidový hormon kortikoliberin (CRH, hormon uvolňující kortikotropin), který pak stimuluje syntézu a sekreci hormonu ACTH (adrenokortikotropinu) z adenohipofýzy do krevního oběhu a ACTH pak stimuluje sekreci GC z kůry nadledvin. (F. N. Buijs et al., 2016). Citlivost kůry nadledvin na ACTH a sekrece GC je také modulována signály přicházejícími z PVN hypotalamu prostřednictvím sympatických nervových cest (R. M. Buijs et al., 1999).

Vazopresin je uvolňován vždy během světelné periody, ale jeho účinky na neurony PVN obsahující CRH jsou odlišné u denních a nočních zvířat. Pomocí interneuronů u nočních zvířat vazopresin inhibuje tyto neurony, u denních – je aktivuje (Andries Kalsbeek et al., 2008).

Uvolněné GC tvoří negativní zpětnovazebnou smyčku a inhibují aktivitu HPA osy vazbou na glukokortikoidní receptory (GR) a mineralokortikoidní receptory v mozku a v hypofýze (Berardelli et al., 2013; Jacobson, 2005).

Aktivace HPA osy probíhá nejen v synchronizaci s SCN, ale akutní a chronický stres a autonomní inervace řízená SCN prostřednictvím jiných oblastí mozku také stimuluje uvolňování CRH z PVN, což vede k produkci GC (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

### **2.2.2. SCN moduluje sekreci melatoninu**

Cirkadiánní rytmy v sekreci melatoninu jsou řízeny multisynaptickou dráhou vedoucí od SCN do epifýzy.

Během dne vylučuje SCN GABA do PVN a inhibuje jeho glutamátergní stimulaci intermediolaterálního jádra míchy (IML), která vyvolá uvolnění noradrenalinu ze zakončení superior cervical ganglionu (SCG) v epifýze. Noradrenalin působí na  $\beta$ -adrenergní receptory v epifýze, čímž aktivuje transkripci hlavního enzymu v syntetické řadě melatoninu, arylalkylamin-N-acetyltransferázy, a tak i sekreci melatoninu (Drijfhout, van der Linde, de Vries, Grol, & Westerink, 1996).

Ve tmě produkuje SCN glutamát a tím podporuje aktivitu PVN (Hermes, Coderre, Buijs, & Renaud, 1996). Melatonin je syntetizován pouze v noci (Challet, 2007), světlo dopadající na sítnici oka v noci indukuje GABAergní neurotransmisi z SCN do PVN a inhibuje uvolňování noradrenalinu (Ebling, 1996).

### **2.3. Periferní hodiny imunitního systému**

Cirkadiánní regulace imunitního systému byly pozorovány již v roce 1960, když Halberg a kolegové zjistili, že míra úmrtnosti na podání endotoxinu lipopolysacharidu (LPS) u myší závisí velmi na denní době, kdy se LPS podává (Halberg, Johnson, Brown, & Bittner, 1960). Za posledních 20 let bylo prokázáno, že mnoho typů vrozených imunitních buněk má vlastní hodiny, včetně monocytů (K. D. Nguyen et al., 2013), makrofágů (Keller et al., 2009), mastocytů, eozinofilů (Baumann et al., 2013), neutrofilů (Ella, Csépanyi-Kömi, & Káldi, 2016), NK buněk (Arjona & Sarkar, 2005) a jejich funkce jsou pod kontrolou cirkadiánního systému. Navíc mnoho lidských zánětlivých onemocnění vykazuje rytmickou patologii, jako například revmatoidní artritida (Maurizio Cutolo, 2012) nebo alergická rinitida a bronchiální astma (Smolensky, Lemmer, & Reinberg, 2007).

Výzkumy posledních let ukázaly, že až 8% transkriptů makrofágů osciluje s cirkadiánní periodou (Keller et al., 2009) a tyto geny řídí celou řadu funkcí, včetně produkce cytokinů (Early et al., 2018) fagocytózy (Hriscu, 2005) a antibakteriální (Oliva-Ramírez, Moreno-Altamirano, Pineda-Olvera, Cauich-Sánchez, & Sánchez-García, 2014) a antivirální aktivity (Zhuang, Rambhatla, Lai, & McKeating, 2017).

### **3. Úloha makrofágů v zánětlivé reakci**

Makrofágy jsou vysoce heterogenní populace buněk, které se nachází ve všech tkáních a orgánech, a hrají důležitou roli v protiinfekční imunitní odpovědi proti cizím mikroorganismům, včetně bakterií, virů, hub a parazitů. Makrofágy jsou základní složkou vrozeného imunitního systému, účastní se celého zánětlivého procesu od rozpoznávání patogenů a produkci zánětlivých mediátorů po inhibici zánětlivé reakce a opravu tkání. (Murray & Wynn, 2011)

Makrofágy mohou být rozděleny do dvou funkčních skupin: klasicky aktivované makrofágy (M1), které mají prozánětlivé účinky a alternativně aktivované makrofágy (M2), které se podílí na protizánětlivé funkci a regulují hojení ran (Martinez, Helming, & Gordon, 2009). Ačkoli existují rozdíly mezi makrofágy těchto dvou skupin, makrofágy jsou schopné snadno změnit svůj fenotyp v reakci na mikroprostředí (Mylonas, Nair, Prieto-Lafuente, Paape, & Allen, 2009).

Tento proces změny fenotypu makrofágů hraje důležitou roli v zánětlivých reakcích. Nekontrolovaný zánětlivý proces může vést k poškození vlastní tkáně, chronickému zánětlivému onemocnění a autoimunitním poruchám, proto potřebují jemnou regulaci a mechanismy protizánětlivé zpětné vazby, jako je produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 a správný poměr M1 /M2 makrofágů.

Makrofágy M1 vznikají po aktivaci jejich TOLL-like receptoru (TLR) nebo stimulací IFN- $\gamma$ , v důsledku čehož zvyšují produkci cytokinů IL-1b, IL-6, TNF-a, a zvyšují syntézu oxidu dusnatého a produkci volných radikálů. Po stimulaci pomocí IL-4 a IL-13 se změny na makrofágy M2 s větší produkcí protizánětlivých cytokinů IL-10 (Sica & Mantovani, 2012).

STAT proteiny jsou rodinou transkripčních faktorů, které rozhodují o proměně makrofágu na M1 nebo M2 typ. Po společné stimulaci receptoru IFN a TLR se aktivuje dráha aktivovaná STAT1 a fenotyp makrofágu se změny na prozánětlivý M1. Pokud STAT signalizační dráha bude aktivovaná pomocí IL-10, fenotyp makrofágu se změny na protizánětlivý M2 prostřednictvím STAT3/6 (Ní Gabhann et al., 2014).

### **4. Signalizace makrofágů**

Zánětlivá odpověď je charakterizována koordinovanou aktivací různých signalizačních drah, které regulují expresi jak pro-, tak protizánětlivých mediátorů v rezidentních tkáňových buňkách i leukocytech, které jsou získávány z krve. Rozpoznání patogenů vrozenými nebo adaptivními imunitními receptory vede k aktivaci buněk, které vykazují tyto receptory, např. makrofágy, dendritické buňky a lymfocyty.

Makrofágy mají širokou řadu povrchových receptorů PRR (pattern recognition receptor) pro molekulární vzory asociované s patogenem (PAMP) a molekulární vzory asociované s poškozením tkáně (DAMP) (Taylor et al., 2005). Vazba ligandu na tyto receptory aktivuje signální kaskády, které spouští transkripci různých prozánětlivých a protizánětlivých transkripčních faktorů, jako je nukleární faktor NF- $\kappa$ B, AP-1.

Regulace exprese a represe genů je spojena s remodelací struktury chromatinu enzymatickou modifikací histonů, hlavně acetylací lyzinových zbytků, které se nacházejí na N-konci histonů. V klidovém stavu jsou histony neacetylované a DNA navinutá na histony neschopna transkripce. Po acetylaci histonů se mění jejich elektrický náboj a struktura chromatinu se otevírá a nukleosom se rozvolňuje tak, že se RNA polymeráza II a transkripční komplexy mohou navázat na DNA a začít transkripci.

Iniciace transkripce genů pro zánětlivé cytokiny vyžaduje připojení koaktivátoru (CBP), interagujícího s transkripčními faktory (CREB, AP-1, NF- $\kappa$ B a jiné), které se pak vážou na promotorové oblasti cílových genů. Koaktivátory mají vnitřní histon acetyltransferázovou aktivitu (HAT), což vede k acetylaci histonů, snížení jejich náboje a změně konformace na aktivovanou otevřenou formu (Roth, Denu, & Allis, 2001). Proces deacetylace histonů je zprostředkován histonovými deacetylázami (HDAC) a dalšími korepresorovými proteiny (NCoR, SMRT) (de Ruijter, van Gennip, Caron, Kemp, & van Kuilenburg, 2003; Privalsky, 2004).

Stejnou dráhu aktivuje a jiné PRR, jako jsou lektinové receptory typu C (CLR) (Osorio & Reis e Sousa, 2011) a NOD-Like receptory (NLRs), které jsou schopny tvořit inflamatomy (Elinav, Strowig, Henao-Mejia, & Flavell, 2011; Sabbah et al., 2009).

#### **4.1. JAK/STAT signální cesta**

IFN $\gamma$  se váže na své receptory, což vede k aktivaci JAK1/2 kináz, následně k aktivaci regulačních faktorů interferonů IRF 1/8 a dimerizaci STAT1. STAT1 homodimer a IRF se váží na místa v promotoru cílových genů, tím podporují expresi M1 genů, iNOS a IL-12 (Darnell, Kerr, & Stark, 1994). IL-4 nebo IL-13 se vážou na receptor IL-4R $\alpha$ , což vede k fosforylaci JAK1/3 nebo JAK1/Tyk2 a následné aktivaci STAT6 a STAT3, které aktivují expresi genů fenotypu M2 včetně protizánětlivého cytokinu IL-10 (Bhattacharjee et al., 2013).

Aktivace JAK/STAT dráhy pomocí IL-4 aktivuje syntézu SOCS1 (suppressor of cytokine signaling proteins), který blokuje fosforylaci STAT1 a proměnu makrofága na M1. SOCS1 aktivuje také STAT6, který je transkripčním faktorem pro M2 fenotyp. A naopak aktivace JAK/STAT pomocí IFN- $\gamma$  a TLR4 aktivuje syntézu SOCS3, který blokuje STAT3 a proměnu

makrofága na M2. SOCS3 podporuje fosforylaci STAT1, který je transkripčním faktorem pro M1 fenotyp (Croker, Kiu, & Nicholson, 2008; Qin et al., 2012).

SOCS1 translokuje do jádra, kde se váže na p65 podjednotku NF-kB a funguje jako ubiquitin ligáza, vede k polyubikvitinaci a proteasomální degradaci p65 (Strebosky, Walker, Lang, & Dalpke, 2011).

## **4.2. TLR signalizace**

TLR je nejvýznamnější skupina PRR receptoru. Patří mezi transmembránové proteiny typu I, jejichž části jsou umístěny na povrchu buněk (například TLR4, receptor pro LPS), zatímco jiná část (například TLR9, receptor pro patogenní DNA) jsou uvnitř intracelulárních vezikul (Kawai & Akira, 2011). Vazba LPS na TLR4 aktivuje signální dráhu NF-kB, což zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů, nebo TRAF6 signální dráhu, která indukuje fosforylaci transkripčního faktoru STAT1 (Luu et al., 2014). Celkem tato signalizace podporuje polarizaci makrofágů do prozánětlivého M1.

Signalizační cesty TLR aktivují NF-kB a mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK), což indukuje prozánětlivý stav v buňce a produkci prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 atd) (Kawai & Akira, 2011).

TLR signalizace zahrnuje dvě odlišné signální dráhy: MyD88 závislou a MyD88 nezávislou signální dráhu. Ačkoliv MyD88 signální dráha je universální pro TLR, TRIF signální dráha (neboli dráha nezávislá na MyD88) je typická jenom pro TLR4 a TLR3 (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001).

MyD88 je adaptérový protein, který je spojen TIR doménou s TLR. Po navázání ligandu na TLR MyD88 rekrutuje kinázu asociovanou s receptorem IL (IRAK1 nebo IRAK4) a fosforyluje ji. TRAF6 asociuje s IRAK, aktivuje se a přenáší signál k dalším složkám TLR dráhy: NF-kB a MAPK (Takeda & Akira, 2004).

TRIF je druhý adaptérový protein, který také obsahuje TIR doménu pro vazbu s TLR. TRIF může aktivovat kinázu TBK1 a následně fosforylovat IRF3, který putuje do jádra a indukuje expresi IFN (Kawai & Akira, 2011). TRIF aktivace také vede k aktivaci NF-kB pomocí TRAF6 (Takeda & Akira, 2004).

### **4.2.1. NF-kB signální dráha**

NF-kB (nukleární faktor kappa B-buněk) je proteinový komplex, který hraje důležitou roli v zánětlivých reakcích, ovlivňuje transkripci DNA a produkci cytokinů.

Aktivace NF- $\kappa$ B je vyvolávána různými mikrobiálními a virovými faktory prostřednictvím PRR a jejich vazby k TLR a receptorů IL-1, které patří do rodiny IL-1R, NOD-like receptorů (NLR) nebo receptorů pro imunomodulátory, jako je TNF receptor. Ačkoliv jsou tyto receptory strukturně odlišné, používají podobné mechanismy aktivace I $\kappa$ B kinázy (IKK) a NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B je složena ze dvou různých podjednotek rodiny transkripčních faktorů Rel, ve většině z p65 (RelA) a p50 podjednotky (Ghosh & Karin, 2002). I $\kappa$ B proteiny, přítomné v cytoplazmě, inhibují NF- $\kappa$ B a udržují komplex v neaktivní formě.

Rozpoznání ligandu vede k aktivaci I $\kappa$ B kinázového komplexu IKK skládajícího se ze dvou kinázových podjednotek IKK $\alpha$  (IKK1) a IKK $\beta$  (IKK2) a regulační podjednotky IKK $\gamma$  (NEMO) (Zandi, Rothwarf, Delhase, Hayakawa, & Karin, 1997).

IKK fosforyluje I $\kappa$ B což vede k jeho degradaci proteazomem a tím aktivuje a uvolňuje NF- $\kappa$ B komplex, který pak translokuje do jádra, váže se na jednotlivé elementy promotoru specifických genů a aktivuje jejich transkripci (Lawrence, 2009).

Tato dráha nastavuje prozánětlivý stav a její nadměrná nebo deregulovaná aktivace může vést k patologickému chronickému nebo akutnímu zánětu. Proto NF- $\kappa$ B dráha taky obsahuje autoregulační negativní zpětnovazebné smyčku. NF- $\kappa$ B-dependentní transkripce genu vede k rychlé znovusyntéze proteinu I $\kappa$ B. I $\kappa$ B vstupuje do jádra, váže NF- $\kappa$ B transkripční faktor a tím inhibuje jeho vazbu na DNA (Arenzana-Seisdedos et al., 1995).

#### **4.2.2. MAPK signální dráha**

Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) jsou serin-threoninové kinázy, které zprostředkovávají intracelulární signalizaci. MAPK signální dráha obsahuje alespoň tři složky: kinázu kinázy MAPK (MAP3K), kinázu MAPK (MAP2K) a MAPK. MAP3K fosforyluje a aktivuje MAP2K, která dále fosforyluje a aktivuje MAPK. Aktivované MAPK fosforylují další kinázy, jako jsou ERK, p38 a JNK (c-Jun NH2 terminální kinázy), které již aktivují různé proteiny včetně transkripčních faktorů (Johnson, 2002).

Po aktivaci JNK je například tvořen AP-1, nejčastěji složený z heterodimeru c-Fos/c-Jun, který dále přímo spouští transkripci prozánětlivých proteinů (McCubrey, LaHair, & Franklin, 2006).

### **4.3. PI3K / PKB signální dráha**

TLR MyD88 závislá dráha a cytokinové receptory aktivuje fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K). PI3K produkuje PIP3 (fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát), který následně aktivuje protein kinázu B (PKB, známou také jako Akt). Tato kináza má tři izoformy: Akt1, Akt2 a Akt3. Akt1 podporuje proměnu na M2 fenotyp, Akt2 naopak podporuje M1 (Arranz et al., 2012).

MikroRNA (miRNA) tvoří velkou rodinu malých, přibližně 21-nukleotidových, nekódujících RNA, které jsou regulátory exprese genů, kontrolují u savců aktivitu přibližně 30% genů a podílejí na regulaci téměř všech buněčných procesů. miRNA kontrolují genovou expresi po transkripci, zprostředkovávají translační represi nebo degradaci mRNA (Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008; Valencia-Sanchez, Liu, Hannon, & Parker, 2006)

miR-155 je prozánětlivá mikroRNA indukovaná po aktivaci TLR přímým navázáním NF- $\kappa$ B na promotor genu MIR155HG (McCoy et al., 2010; Thompson, Vardinogiannis, & Gilmore, 2013). miR-155 hraje klíčovou roli v Akt-dependentní polarizaci makrofágů a způsobí proměnu makrofágů na M1 fenotyp (Arranz et al., 2012).

### **4.4. NLRP3 inflamazóm**

Inflamazóm NLRP3 je proteinový komplex, složený z NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) a kaspázy-1. Může být aktivován širokým rozsahem agonistů, PAMP nebo DAMP (Ratsimandresy, Dorfleutner, & Stehlik, 2013). Aktivace inflamazómu NLRP3 podporuje aktivaci kaspázy-1 následně štěpení pro-IL-1 $\beta$  a pro-IL-18 do jejich maturovaných sekretovaných forem (Thornberry et al., 1992).

Aktivace inflamazómu NLRP3 vyžaduje dva postupné signály. První signál, vyvolaný PAMP, aktivuje dráhu NF- $\kappa$ B a vede k expresi Nlrp3 a pro-IL-1 $\beta$ . Druhý signál, například DAMP, spouští aktivaci NLRP3, sestavení komplexu inflamazómu a nakonec aktivaci kaspázy-1 (Sutterwala, Haasken, & Cassel, 2014).

## **5. Diferenciace monocytů a makrofágů**

Cirkulující monocyty pocházejí z prekurzorů pluripotentních hematopoetických kmenových buněk (HSC), které se většinou nachází v kostní dřeni a malé množství cirkuluje v krvi a nachází se v periferní tkáni. Vývoj monocytů a makrofágů z HSC závisí na řadě stimulů,

jako jsou například růstové faktory, které ovlivňují expresi genů specifických pro vývoj buněčné linie.

Klíčový regulátor pro vývoj monocytů je hematopoetický transkripční faktor PU.1, potřebný pro diferenciaci buněčných linií. Nízká koncentrace proteinu PU.1 vyvolává diferenciaci B buněk, zatímco vysoká koncentrace a dlouhá exprese podporuje diferenciaci makrofágů a blokuje vývoj B lymfocytů (DeKoter & Singh, 2000; Scott, Simon, Anastasi, & Singh, 1994). Vysoká koncentrace PU.1 aktivuje další transkripční faktory specifické pro monopoézu, jako jsou IRF8 (Schönheit et al., 2013), KLF-4 (Feinberg et al., 2007) a Erg1 (H. Q. Nguyen, Hoffman-Liebermann, & Liebermann, 1993). PU.1 také hraje roli v transkripční kontrole indukce genů u makrofágů, například IFN- $\gamma$  (V. T. Nguyen & Benveniste, 2000).

Faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF nebo CSF-1) je cytokin, uvolněný během zánětlivé reakce. CSF-1 přímo indukuje a moduluje PU.1, což vede k diferenciaci hematopoetických kmenových buněk na monocyty a makrofágy (Mossadegh-Keller et al., 2013). Jiné cytokiny, například IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-6 a IL-11, také podporují diferenciaci na monocyty (Gordon, 1995).

Kostní dřev je primárním místem produkujícím monocyty. Monocyty lze rozdělit do dvou funkčních skupin Ly6C<sup>hi</sup> zánětlivé nebo Ly6C<sup>low</sup> patrolující monocyty. Ly6C<sup>hi</sup> monocyty představují klasické monocyty, které jsou rekrutovány infekcí, dále vylučují zánětlivé mediátory a stimulují migraci dalších monocytů. Ly6C<sup>hi</sup> mohou působit jako prekurzory makrofágů pocházejících z monocytů (Geissmann et al., 2010).

Mobilizace monocytů, jejich výstup z kostní dřevě, a průnik do zánětlivých míst je zprostředkován chemokinovým receptorem CCR2 a odpovídajícími ligandy CCL2 a MCP2 (taky znám jako CCL8) (Jia et al., 2008). Cirkadiální mechanismy se podílejí na regulaci diferenciaci makrofágů a náboru monocytů do infikované tkáně.

### **5.1. Cirkadiální hodiny a diferenciaci makrofágů**

Počet HSC v kostní dřevě vykazuje cirkadiální oscilace během dne, které zmizí při dlouhodobém chování pokusných zvířat na stálém světle. Ukazuje, že hematopoéza je řízena hlavními molekulárními hodinami SCN (Méndez-Ferrer, Lucas, Battista, & Frenette, 2008). Proliferace prekurzorů monoblastů a myeloblastů (GMP nebo CFU-GM) má cirkadiální oscilaci, řízenou epifýzou a produkcí melatoninu. Počet GMP v kostní dřevě osciluje s vrcholem v ZT6 a ZT18. Odstranění epifýzy tyto oscilace zruší (Halder, Häubler, & Gupta, 1992).

N-CoR (nuclear receptor co-repressor 1) je nukleární korepresor a spolu s HDAC3 se podílí na inhibici transkripce určitých genů (Ishizuka & Lazar, 2003). HDAC3 je schopen

odstranit acetylové skupiny z histonu a vytvořit chromatinovou strukturu nepřístupnou pro transkripční aparát (Guenther, Barak, & Lazar, 2001). N-CoR/HDAC3 může existovat v asociaci s produktem hodinového genu *Rev-Erba*, který je cirkadiálně regulován a celý komplex tak potlačuje transkripce cílových genů, například *Bmal1* (Yin & Lazar, 2005) a *pu.1* (Lam et al., 2013) pouze v určitém cirkadiálním čase.

Ly6C<sup>hi</sup> monocyty vykazují výrazné změny v počtu během dne. V ZT8 dosahují přibližně 3krát vyšší hladiny než v ZT0, na rozdíl od Ly6C<sup>low</sup>, které nevykazují téměř žádnou oscilaci. Nguyen et al (2013) zjistili, že promotory *Ccl2* a *Ccl8* obsahují E-boxy, na které se váže heterodimer CLOCK/BMAL1 a PRC2 (polycomb repressive complex 2) s histon methyltransferázovou aktivitou, který inhibuje expresi těchto genů a epigeneticky mění konformaci histonu.

U monocytů potlačuje REV-ERB $\alpha$  přímo expresi *Ccl2* vazbou na promotor. REV-ERB $\alpha$  také potlačuje signály aktivované CCL2, kinázy ERK a p38. Tak REV-ERB $\alpha$  brání vstupu monocytu do tkání a potlačuje zánětlivou reakci (Sato et al., 2014).

## 6. Cirkadiální hodiny modulují zánětlivou reakci

Jak už bylo řečeno, funkce makrofágů je silně kontrolovaná cirkadiálním systémem (Keller et al., 2009) ve všech fázích zánětlivé odpovědi, včetně rozpoznání patogenu (Silver et al., 2018), vstupu monocytů do infikované tkáně (Sato et al., 2014), polarizace na M1/M2 a produkce cytokinů (Early et al., 2018).

### 6.1. Melatonin

Melatonin hraje důležitou roli v imunopatologických stavech, má například protizánětlivé účinky při zánětu (Reiter, Calvo, Karbownik, Qi, & Tan, 2006). Ačkoliv protizánětlivé účinky melatoninu převažují, některá patologická zánětlivá a autoimunitní onemocnění, jako například revmatoidní artritida (M Cutolo et al., 2005), ukazují opačný škodlivý efekt po stimulaci melatoninem.

Melatonin řídí imunitní buňky hlavně pomocí regulace produkce cytokinů (Carrillo-Vico et al., 2005) prostřednictvím vazby na specifické receptory spřažené s G-proteiny MT1 / MT2 na membráně cílových buněk (Carrillo-Vico et al., 2005), což vede k aktivaci druhých posílů a modulaci odpovědi pomocí změn hladin cAMP nebo aktivaci ERK1 (Hardeland, 2009).

Důležité je uvést, že makrofágy jsou schopné syntetizovat melatonin po aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. Heterodimer p65/p50 interaguje s promotorem AA-NAT a spouští expresi enzymu a následně tedy i syntézu melatoninu (Muxel, Laranjeira-Silva, Carvalho-Sousa, Floeter-Winter,

& Markus, 2016). Jeden z hlavních účinků melatoninu na makrofágy je inhibice mechanismu exprese genu pro M1 prozánětlivý fenotyp a podpora M2 protizánětlivého fenotypu, což pak vede k expresi protizánětlivých cytokinů a potlačení zánětlivé reakce.

Po navázání melatoninu na membránový receptor spřažený s G-proteinem podjednotka  $G_{\alpha}$  aktivuje PLC, která následně hydrolyzuje PIP<sub>2</sub> na DAG a IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> vyvolá aktivaci PKC přímo, nebo pomocí uvolňování vápníku (Masana & Dubocovich, 2001). PKC aktivuje další proteiny, například kinázu ERK, a nakonec dochází k fosforylaci STAT3 (Lau, Ng, Lee, Chan, & Wong, 2012). Vazba melatoninu vede k aktivaci podjednotky  $G_i$ , která inhibuje produkce cGMP (Capsoni, Viswanathan, De Oliveira, & Saavedra, 1994). V nedávných experimentech se ukázalo, že podání melatoninu výrazně snižuje koncentraci aktivovaného STAT1 a zvyšuje fosforylaci STAT3 (Yi & Kim, 2017). Jak už bylo uvedeno výše, STAT3 podporuje proměnu na M2 fenotyp, zvyšuje expresi SOCS1 a tlumí NF- $\kappa$ B dráhu. Takže melatonin nepřímo podporuje fosforylaci STAT6 přes fosforylaci tyrosinu IRS, která pak pomáhá aktivaci samotného STAT6.

Melatonin má také přímý vliv na signalizaci TLR4. Jak už bylo uvedeno výše, stimulace TLR4 pomocí LPS aktivuje MyD88-dependentní a TRIF signální dráhu. Studie ukázaly, že melatonin MyD88 a IRF7 inhibuje (Xia et al., 2012).

Melatonin také významně ovlivňuje expresi miRNA (Banaei, 2015). Přesné mechanismy působení melatoninu na miRNA u makrofágů nejsou známy, existuje ale předpoklad, že jeho účinky jsou stejné jako v jiných typech buněk. V gliomových buňkách melatonin inhibuje expresi rodiny transkripčních regulátorů miR-155 MYB (myeloblastosis) (Elton, Selemon, Elton, & Parinandi, 2013), který u makrofágů podporuje polarizaci na M1 (Cao et al., 2017).

Expresi miR-34a u makrofágů je vyvolána aktivací NF- $\kappa$ B dráhy a tyto miRNA mají prozánětlivé účinky (Jiang et al., 2012). SIRT-1 (sirtuin 1) deacetyluje podjednotku p65 a inhibuje NF- $\kappa$ B. miR-34a inhibuje aktivitu SIRT-1, čímž podporuje aktivitu NF- $\kappa$ B a vytvoří tak pozitivní zpětnovazebnou smyčku (Kauppinen, Suuronen, Ojala, Kaarniranta, & Salminen, 2013). Melatonin inhibuje expresi miR-34a a podporuje protizánětlivý stav buňky (Carloni et al., 2016). Protizánětlivé účinky melatoninu mohou být způsobeny inhibicí TLR signální dráhy (Xia et al., 2012).

Cluster miR-23a~27a~24-2 má významnou úlohu při polarizaci makrofágů. Vazba patogenu na TLR spouští polarizaci makrofágů na M1 prozánětlivý fenotyp a tlumí expresi miR-23a~27a~24-2, vazba IL-4 ji naopak podporuje. Zinc-finger protein A20 je inhibitor NF- $\kappa$ B signální dráhy. MiR-23a jej inhibuje a nepřímo tak podporuje aktivaci NF- $\kappa$ B, který se pak váže na promotor miR-23a a inhibuje její transkripce, vytváří tak negativní zpětnovazebnou smyčku.

Po vazbě IL-4 na receptor, se autofosforyluje kináza JAK a následně aktivuje řadu proteinů, jako jsou STAT6, JAK1, IRF4 a PPAR- $\gamma$ . STAT6 se váže na promotor a spouští transkripci clusteru miR-23a~27a~24-2 během M2 polarizace. miR-23a tvoří negativní zpětnovazebnou smyčku a inhibuje aktivitu JAK a STAT6 (shrnuto S. Ma et al., 2016). Melatonin v obou případech inhibuje expresi miR-23a, ale nemá žádný vliv na další členy clusteru miR-27a a miR-24-2. Vzhledem k tomu, že melatonin inhibuje expresi jenom jedné složky clusteru miR-23a~27a~24-2, mechanismy jeho působení na stabilitu zralého miRNA jsou neznámé (Kim et al., 2015).

Podání melatoninu navíc inhibuje aktivitu inflamazómu a následnou produkci IL-1  $\beta$  a IL-18 (Cao et al., 2017; Y. Zhang et al., 2016). Aktivace inflamazómu je indukována řadou signálů, jako jsou ROS, DAMP a vyžaduje signalizaci NF- $\kappa$ B dráhy. Inhibice sestavení inflamazómu po melatoninu může být způsobena, jak inhibičním účinkem melatoninu na NF- $\kappa$ B (Xia et al., 2012), tak i jeho antioxidantním účinkem bránícím nadměrné produkci ROS (Espino, Pariente, & Rodríguez, 2012). Přesný mechanismus ještě není znám.

## 6.2. Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou hlavní cirkadiánní signalizační hormony, jsou také hlavními signály stresu v organismu a regulují širokou řadu fyziologických procesů (Dickmeis, 2009).

GR je ligand-dependentní transkripční faktor, který se nachází v cytoplazmě a po aktivaci ligandem translokuje do jádra, kde ovlivňuje expresi cílových genů (Nicolaidis, Galata, Kino, Chrousos, & Charmandari, 2010). Studie ukázaly velkou skupinu genů přímo regulovaných GR. Mezi ně patří mnoho LPS-indukovaných genů, genů pro zánětlivé cytokiny, některé geny kódující transkripční faktory nebo signální proteiny a další protizánětlivé imunomodulátory, jako je GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper). Celkově můžeme říct, že glukokortikoidy inhibují expresi prozánětlivých genů a aktivují expresi protizánětlivých (Chinenov, Coppo, Gupte, Sacta, & Rogatsky, 2014).

Základní princip protizánětlivých účinků glukokortikoidů je GR-zprostředkovaná represe transkripční aktivity AP-1 (Schüle et al., 1990) a NF- $\kappa$ B, hlavních prozánětlivých transkripčních faktorů (Ito et al., 2006).

GR tvoří heterodimer s NF- $\kappa$ B podjednotkou p65 (Rao et al., 2011) a váže se na promotorovu oblast IRAK-M a indukuje jeho transkripci. IRAK-M působí jako inhibitor aktivity adaptorového proteinu IRAK v signální kaskádě závislé na MyD88 (K. Kobayashi et al., 2002; Miyata et al., 2015)

GR může interagovat s koreceptorem GRIP1 (glutamate receptor-interacting protein 1), který je také nutný pro aktivaci proteinu IRF3 patřícího do TLR signální dráhy. Aktivovaný GR sequestruje GRIP1 od IRF3, čímž potlačuje produkci IRF3-dependentních prozánětlivých cytokinů a navíc používají GRIP1 jako korepresor k vazbě GRE (glucocorticoid response elements) na AP1 nebo NF- $\kappa$ B (Reily, Pantoja, Hu, Chinenov, & Rogatsky, 2006). GR také může potlačit aktivitu NF-KB rekrutováním HDAC2 (histonových deacetyláz) na promotory závislé na NF-KB (Ito et al., 2006).

GC také aktivují syntézu dvou proteinů, které mají vliv na zánětlivé signální dráhy: GILZ, který inhibuje NF- $\kappa$ B a AP-1 (Mittelstadt & Ashwell, 2001), a MKP-1, který inhibuje p38 MAP kinázu (Lasa, Abraham, Boucheron, Saklatvala, & Clark, 2002). GILZ (TSC22D3 nebo glucocorticoid-induced leucine zipper) je hlavní imunomodulátor glukokortikoidů (Ayroldi & Riccardi, 2009), který je produkován v makrofágách po stimulaci GC a protizánětlivým IL-10 (Brown et al., 2001).

GILZ se váže na p65 podjednotku NF- $\kappa$ B a brání transkripci NF- $\kappa$ B-závislých genů (Brown et al., 2001). Studie ukázaly, že GILZ ovlivňuje aktivitu složky MAPK signální dráhy, například GILZ inhibuje fosforylaci Raf-1/Ras kinázy přímou vazbou, což vede k potlačení aktivace ERK1/2 a dalších složek MAPK kaskády (Ayroldi et al., 2007, 2002). U GILZ Knockout myší se vyskytuje nadměrná reakce na LPS, zvyšuje se aktivita NF- $\kappa$ B a produkce cytokinů (Hoppstädter et al., 2015).

Zajímavé je, že GC mají i prozánětlivé účinky. GC rychle indukují expresi NLRP3 mRNA, což vede k produkci zánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18 (Busillo, Azzam, & Cidlowski, 2011).

### **6.3. CLOCK/BMAL**

Heterodimer CLOCK/BMAL významně ovlivňuje expresi mnoha proteinů, nejen hodinových genů a reguluje tak nepřímo také signalizaci makrofágů včetně aktivity povrchových receptorů.

Toll Like receptor 9 (TLR9) se nachází uvnitř intracelulárních vezikul a rozpoznává bakteriální a virovou DNA (Lund, Sato, Akira, Medzhitov, & Iwasaki, 2003). Exprese Tlr9 mRNA u myší vykazuje denní oscilace s maximální hladinou v ZT19, což odpovídá druhé půlce aktivní fáze. Promotorová oblast Tlr9 obsahuje dva nekanonické E-boxy (Leclerc & Boockfor, 2005), což umožňuje přímou vazbu a regulaci transkripce Tlr9 genu pomocí heterodimeru CLOCK/BMAL1. Experimenty ukázaly, že klesající exprese Clock znamená snížení hladiny Tlr9 mRNA u makrofágů WT myši (Silver, Arjona, Walker, & Fikrig, 2012).

Další studie zkoumaly denní oscilace Tlr1-8 u splenocytů a zjistily, že u slezinných makrofágů pouze Tlr2, Tlr4 a Tlr6 mRNA vykazují denní oscilace taky s maximální koncentrací v ZT19. Ostatní Tlr mRNA žádné oscilace neměly (Silver et al., 2018). Tyto výzkumy mohou podporovat myšlenku, že cirkadiánní systém zvyšuje počet TLR během aktivní fáze, kdy má organismus větší šanci setkat se s patogenem.

Protein hodinového genu BMAL1 může ovlivňovat acetylaci podjednotky NF- $\kappa$ B p65 prostřednictvím heterodimerizace s CLOCK (Spengler et al., 2012).

Jiný způsob zasahování BMAL1 do zánětlivých procesů je zprostředkován inhibicí miR155 pomocí regulace exprese IL-10. Tento cytokin potlačuje transkripční faktor ETS2, zodpovědný za expresi miR155 u makrofágů (Shakhov, Collart, Vassalli, Nedospasov, & Jongeneel, 1990). IL-10 má cirkadiánní oscilace a při disfunkci BMAL1 se jeho hladina výrazně sníží. Myši s nefunkčním IL-10 naopak vykazují vysoké hladiny miR155 a nízké hladiny BMAL1 (Curtis et al., 2015). miR155 je schopen přímo potlačit expresi BMAL1 vazbou na místa v rámci 3'UTR genu *Bmal1*.

Podání LPS v ZT18 (během aktivní fáze u nočních zvířat) a v ZT6 (uprostřed doby odpočinku) vyvolalo akutní záněty u myši prostřednictvím aktivace NF- $\kappa$ B dráhy, přičemž úmrtnost myši v ZT18 byla výrazně menší, než v ZT6. Zvířata ZT6 vykazovala také vyšší úroveň aktivace NF- $\kappa$ B a proteinů jeho cílových genů, například IL-1 $\alpha$ . Myši s genetickou delecí CLOCK měly po podání LPS výrazně sníženou odpověď NF- $\kappa$ B v ZT6 a ZT18 v porovnání s WT (Spengler et al., 2012). Jiné studie pozorovaly v reakci na stimulaci LPS u makrofágů s mutací *Clock* celkové snížení exprese zánětlivých genů Il-6, Il-1 $\beta$ , Tnf $\alpha$ , Ifn- $\beta$  a Ccl2 ve srovnání s myši WT (Bellet et al., 2013).

Spenglerová et al (2012) experimentálně ukázali interakce CLOCK, BMAL1 a p65. Nejvyšší promotorová odpověď cílových genů byla pozorovaná po koexpresi CLOCK a p65, o něco menší po koexpresi CLOCK/BMAL1 a p65. To znamená že BMAL1 může negativně ovlivňovat aktivitu CLOCK s p65. Koexprese heterodimeru CLOCK / BMAL1 neměla žádný vliv na aktivitu cílových genů. CLOCK se nachází v komplexech s p65 a jejich hladiny korelují se zvýšenou koncentrací fosforylované formy p65. Dimer CLOCK/p65 funguje jako zesilovač signalizace NF- $\kappa$ B v nepřítomnosti BMAL1.

Kvůli tomu, že exprese CLOCK během cirkadiánního cyklu nevykazuje téměř žádné oscilace a je konstitutivní na úrovni mRNA i proteinu, byla navržena hypotéza: v ZT6 BMAL1 má nejvyšší koncentraci a zprostředkovává nukleární translokaci a specifickou fosforylaci / degradaci CLOCK (Kondratov et al., 2003). Dostupnost CLOCK je tak mnohem více snížena, což pravděpodobně vede ke snížení transkripčního potenciálu NF- $\kappa$ B (Spengler et al., 2012).

CLOCK má prozánětlivé účinky a podporuje aktivaci NF-kB a expresi NF-kB řízených genů. BMAL1 nepřímo vykazuje protizánětlivé účinky vazbou a degradací CLOCK.

#### 6.4. CRY

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) je důležitým intracelulárním druhým poslem, který aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA) a zprostředkovává mnoho různých buněčných odpovědí, například transkripci genů. Jeho signalizace je rytmická a odpovídá na oscilace SCN (O'Neill, Maywood, Chesham, Takahashi, & Hastings, 2008).

Protein kináza A (PKA) je serin/threonin kináza, která vyžaduje pro svou aktivaci cAMP, PKA fosforyluje podjednotky p65, čím stimuluje transkripční aktivitu NF-kB (Zhong, Voll, & Ghosh, 1998).

CRY protein se váže na adenylylcyklázu, enzym, který katalyzuje produkci cAMP, inhibuje její aktivitu a tím snižuje produkce cAMP v reakci na podněty. Naproti tomu u myši s nefunkčním CRY proteinem, se zvýšila signalizace PKA, která způsobí nadměrnou fosforylaci NF-kB a konstantní expresi zánětlivých cytokinů, například IL-6 (Narasimamurthy et al., 2012).

Bylo prokázáno, že CRY inhibuje produkci cAMP v odpovědi na aktivaci receptoru spřaženého s G proteiny (GPCR) vazbou na alfa podjednotku Gs a inhibuje její funkci (E. E. Zhang et al., 2010).

#### 6.5. REV-ERB

Liver X receptor (LXR $\alpha$  a LXR $\beta$ ) je jaderný receptor, transkripční faktor závislý na ligandu, jako jsou například oksyložené formy cholesterolu. V nepřítomnosti ligandu LXR potlačuje transkripční aktivitu cílových genů. Vazba ligandu na LXR vede ke konformační změně, která vede k transkripci cílových genů (Zelcer & Tontonoz, 2006). U makrofágů LXR kontroluje zánětlivou odpověď regulací genů, jako jsou IL-6, IL-1 $\beta$  a chemokiny (Fontaine et al., 2007).

V lidských makrofázích se LXR $\alpha$  váže na místo LXRE v promotoru *Rev-erba*, čímž indukuje expresi *Rev-erba*. Heterodimer CLOCK/BMAL1 taky indukuje expresi *Rev-erba* přímou vazbou na E-box (Preitner et al., 2002). REV-ERB $\alpha$  pak potlačuje aktivitu promotorů lidské TLR-4 vazbou na místo RevRE. Toto místo se překrývá s místem LXRE pro vazbu LXR, a tím znemožňuje jejich interakce a inhibuje exprese TLR-4 (Fontaine et al., 2008).

*Rev-erba* potlačuje expresi IL-1 $\beta$  a IL-18 (Pourcet et al., 2018) a sestavení inflamasomu prostřednictvím inhibice transkripce podjednotky NF-kB p65 vazbou k RevRE elementu v promotoru p65. *Rev-erba* navíc přímo inhibuje transkripci *Nlrp3* vazbou na RevRE v *Nlrp3*

promotoru (Wang et al., 2018), což také otevírá prostor pro hodinami řízenou imunitní odpověď.

Poslední studie prokázala, že REV-ERBa je v komplexu s NCoR/HDAC3 schopný potlačit expresi genů (Yin & Lazar, 2005). Po aplikaci agonisty REV-ERBa GSK4112 do mikroglíí (typ makrofágů v CNS) byla potlačena exprese izoformy oxidu uhličitého iNOS, COX-2 (prostaglandin syntáza) a cytokinů IL-6 a TNFa. GSK4112 zvyšuje vazbu NCoR/HDAC3 na REV-ERBa a inhibuje fosforylaci a nukleární translokaci p65, tím potlačuje NF-kB dráhu a nastavení prozánětlivého stavu v mikroglíí (D. Guo et al., 2019).

## 6.6. RORs

Staggerer myši jsou zvířata s knockoutem RORs, které mají různé neurologické a imunitní poruchy, například zvýšenou citlivost makrofágů po podání LPS a zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNFa (Dzhagalov, Giguère, & He, 2004; Kopmels et al., 1990). Staggerer myši měly poruchy cirkadiálních rytmů, například, vykazují volně běžící rytmy lokomoční aktivity, nestabilní rytmus a sníženou transkripci *Bmal1* (Akashi & Takumi, 2005)

Vzhledem k tomu, že přítomnost RORs významně tlumí zánětlivé reakce, byl předpokládán mechanismus interakce RORs a NF-kB cestou. RORs přímo reguluje transkripci hlavního inhibičního proteinu signální dráhy NF-KB IκB vazbou na promotor IκBa (Delerive et al., 2001). Předpokládá se také existence negativní zpětnovazebné smyčky. V klidových makrofágách je exprese RORs 5 až 6 krát vyšší, než v aktivovaných pomocí LPS, což ukazuje na inhibici produkce RORs nějakou složkou TLR signalizace (Dzhagalov et al., 2004).

## **7. Molekulární hodiny ovlivňují zánětlivou reakci pomocí regulace buněčného metabolismu**

Reaktivní druhy kyslíku (ROS) jsou klíčové signalizační molekuly, které hrají důležitou roli v progresi zánětlivých onemocnění. ROS působí jako signalizační molekula a mediátor zánětu (Mittal et al., 2014). U makrofágů aktivace TLR4 indukovaná LPS také vede k vytvoření mitochondriální ROS, které pak podporuje prozánětlivou odpověď (Mills et al., 2016; West et al., 2011). Nadměrné množství ROS vyvolává oxidační stres a poškození makromolekul, proto je úroveň ROS kontrolována antioxidačními systémy.

NRF2 je transkripční faktor bazického leucinového zipu (bZIP), který reguluje expresi antioxidačních proteinů a chrání buňky před oxidačním poškozením. ROS podporuje nukleární translokaci NRF2 a usnadňuje vazbu na promotory antioxidačních genů (Q. Ma, 2013). Bylo prokázáno, že promotorová oblast NRF2 obsahuje E-box a jeho exprese je pod kontrolou komplexu proteinu molekulárních hodin BMAL1/ CLOCK (J. Lee et al., 2013). Geny kódující antioxidační enzymy také obsahují E-box transkripčního komplexu CLOCK / BMAL1 a podléhají tak cirkadiánní regulaci (Kondratov, Vykhovanets, Kondratova, & Antoch, 2009).

IL-1 $\beta$  je cytokin, produkováný aktivovanými makrofágy, je důležitým mediátorem zánětlivé odpovědi a podílí se na různých buněčných aktivitách, včetně buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Po podání LPS v ZT8 a v ZT20 byly pozorovány významné změny hladiny IL-1 $\beta$  v séru. IL-1 $\beta$  je zvýšený v ZT8 oproti v ZT20, což koreluje s denními změnami v ROS, BMAL1 a hladiny Nrf2. Je to dáno tím, že BMAL1 prostřednictvím NRF2 reguluje dráhy oxidativního stresu v makrofágách, aby omezil tvorbu prozánětlivého cytokinu IL-1  $\beta$  (Early et al., 2018).

Existují dvě dráhy ovlivňující produkci IL-1 $\beta$ ; na ROS závislá a nezávislá. NRF2 se váže na specifická inhibiční místa v promotoru Ilb, což brání nasednutí RNA Pol II a omezuje transkripci IL-1 $\beta$  nezávisle na ROS (E. H. Kobayashi et al., 2016).

Po stimulaci LPS ROS stabilizují podjednotku transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$  (Sumbayev, 2008), který vazbou na promotorovou oblast HRE vyvolává expresi Il1b a produkci IL-1 $\beta$  (Mills et al., 2016). NRF2 inhibuje produkci IL-1 $\beta$  prostřednictvím suprese ROS a HIF-1a a vazbou na promotorovou oblast a inhibice translace Hif1a (Mills et al., 2018). CLOCK/BMAL1 nepřímo reguluje produkci IL-1 $\beta$  pomocí cirkadiánní indukce NRF2.

## **8. Choroby spojené se zánětem**

Už 70 let je známo, že citlivost organismu na patogeny a následná imunitní odpověď je závislá na denní době. Například, při podání vysokých dávek LPS je úmrtnost myši mnohem

vyšší při podání na začátku jejich aktivní fáze, to je zvečera (Spengler et al., 2012). Tento mechanismus ještě není úplně pochopen, jeden z možných faktorů ovlivňujících průběh imunitní reakce, může být zvýšená exprese adhezivních molekul a chemokinů na začátku aktivní fáze, což vede k aktivnímu náboru monocytů a makrofágů do tkání (Scheiermann et al., 2012).

Spánková deprivace, poruchy spánku, práce na směny a časté cesty přes několik časových pásem vyvolává cirkadiánní desynchronizaci (Lombardi, Folkard, Willetts, & Smith, 2010). Jsou to faktory, které zvyšují riziko mnoha onemocnění, jako jsou obezita a metabolický syndrom (Van Cauter, Spiegel, Tasali, & Leproult, 2008), deprese (Levandovski et al., 2011), kardiovaskulární onemocnění (Peter, Alfredsson, Knutsson, Siegrist, & Westerholm, 1999), onkologická patologie (Stevens et al., 2011) a ateroskleróza (Haupt et al., 2008).

Mnoho chronických onemocnění vykazuje cirkadiánní oscilace ve svých symptomech, například revmatoidní artritida (Maurizio Cutolo, 2012), astma (Panzer, Dodge, Kelly, & Jarjour, 2003) a alergická rýma (Smolensky et al., 2007).

### **8.1. Revmatoidní artritida**

Revmatoidní artritida (RA) je chronické zánětlivé onemocnění kloubů, které primárně ovlivňuje malé klouby rukou a nohou. Příznaky RA často vykazují kolísání v průběhu dne. Symptomy jsou nejhorší při probuzení, pak se zlepšují. Tyto cirkadiánní změny byly pozorované až v roce 1982 (Harkness et al., 1982) a má se za to, že mohou být částečně způsobeny vyšší ranní tvorbou prozánětlivých cytokinů, hlavně IL-6 (Arvidson et al., 1994) IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ .

U zdravých jedinců zánět, především zánětlivé cytokiny (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ), stimuluje produkci hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH) v hypotalamu, produkci kortikotropinu v hypofýze a vylučování GC kůrou nadledvin (Chrousos, 1995). Pacienti s RA vykazují oslabené reakce na zánět, způsobené defekty HPA osy a její nedostatečnou odpovědí na stimulaci. Pacienti také vykazují změny v cirkadiánní sekreci kortizolu a melatoninu (Chikanza, Petrou, Kingsley, Chrousos, & Panayi, 1992). Ve srovnání se zdravými jedinci, je sekrece melatoninu u jedinců s chronickým zánětem významně zvýšena v období po půlnoci a v ranních hodinách (M Cutolo et al., 2005).

K chronickému zánětu v kloubech přispívají i buňky imunitního systému, hlavně CD4+ T-lymfocyty, makrofágy a fibroblast-like synoviocyty, mající vlastní cirkadiánní oscilátor (Bollinger et al., 2011; Haas & Straub, 2012). V reakci na endogenní stimulaci imunitních buněk melatoninem a GC se u pacientů s RA mění exprese prozánětlivých cytokinů. U zdravých jedinců

je exprese TNF- $\alpha$  a IL-6 nepřímo řízena GC a dosahuje nejvyšších hodnot v ZT03-ZT06 (Petrovsky, McNair, & Harrison, 1998), zatímco u pacientů s RA je nejvyšší hladiny cytokinů dosaženo s fázovým zpožděním v ZT07-ZT08.

Ačkoliv jsou hladiny cytokinů TNF-a a IL-6 u pacientů s RA zvýšené až desetinásobně, hladina GC zůstává zvýšená pouze mírně (Imrich et al., 2010).

Vzhledem k těsné vazbě cirkadiálních mechanismů a průběhu nemoci, léčba symptomů RA musí být načasovaná vzhledem k cirkadiální aktivaci buněk zapojených do zánětlivé odpovědi a cirkadiálnímu uvolnění hormonu. Například podání modifikovaného syntetického GC prednisonu se zpožděným uvolňováním aktivní látky v ZT22, poukázalo velmi pozitivní účinky na trvání ranní ztuhlosti oproti podání nemodifikovaného prednisonu v ZT06-08 (Buttgereit et al., 2008; De Silva, Binder, & Hazleman, 1984).

Podání antiproliferačních léčiv, jako jsou methotrexát nebo leflunomid, také ukazuje mnohem lepší výsledky, pokud se podá v určitou denní dobu. Podání methotrexátu před spánkem vyvolá účinný pokles TNF-a a zlepšení symptomů RA ve srovnání se standardními ranními metodami dávkování (To et al., 2009, 2011).

## **8.2. Ateroskleróza**

Ateroskleróza je chronické onemocnění, při kterém dochází k poruchám endotelové vrstvy cév (Libby, Ridker, & Hansson, 2011). Monocyty vstupují do endotelu, pronikají do tunica intima a diferenciují se na prozánětlivé makrofágy, což vyvolá chronický zánět cév. Monocyty a makrofágy, které se nacházejí v aterosklerotických plátech, udržují chronický zánět a lákají do cév další zánětlivé buňky a LDL (low density lipoprotein), což vede ke tvorbě aterosklerotických plátů, disfunkci cév a následným kardiovaskulárním poruchám (Rahman & Woollard, 2017).

Cirkadiální rytmy ovlivňují expresi adhezivních molekul endotelu, vstup monocytů z kostní dřeně do cév (Viswambharan et al., 2007), funkci makrofágů a změny koncentrace LDL v krvi (Sennels, Jørgensen, & Fahrenkrug, 2015).

Buňky hladkého svalstva cév (VSMC od anglického vascular smooth muscle cells) hrají důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. VSMC mají své vlastní hodinové systémy, jejichž funkce je významně změněna u buněk postižených aterosklerózou. VSMC nemocných jedinců tak vykazují nižší amplitudy exprese mRNA hodinových genů, ve srovnání s normálními VSMC, a tyto změny mohou být zahrnuty v progresi aterosklerózy (Lin et al., 2014)

Vzhledem k nižším hladinám exprese mRNA hodinových genů, byly provedeny experimentální studie, které ukázaly, že nadměrná exprese CRY snížila expresi zánětlivých

cytokinů, hladiny lipidů v plazmě a vývoj aterosklerotických plátů pomocí inhibice dráhy NF-kB (Yang et al., 2015; E. E. Zhang et al., 2010).

Jak bylo uvedeno výše, REV-ERB potlačuje zánětlivé dráhy makrofágů a podporuje polarizaci M2 protizánětlivých makrofágů. Knockout REV-ERB makrofágů vedl ke zvýšené tvorbě aterosklerotických plátů (H. Ma et al., 2013), nadměrná aktivace REV-ERB naopak tuto tvorbu plátů významně snížila (Pourcet et al., 2018).

Vstup monocytů do aterosklerotických plátů závisí na ose CCL2-CCR2. Nedostatek PER2 podporuje tvorbu aterosklerotických plátů zvýšenou mobilizací leukocytů na místo zánětu (Viswambharan et al., 2007).

## 9. Závěr

Tato práce shrnuje současné představy o vlivu cirkadiánních hodin na funkci makrofágů v zánětlivých reakcích. Odpověď makrofágů na patogen je závislá na denní době a regulovaná jak přímo SCN pomocí cirkadiánně řízené syntézy hormonů, tak i vlastními buněčnými hodinami. Molekulární mechanismus, který je základem cirkadiánní kontroly funkce a polarizace makrofágů, však není zatím zcela pochopen.

Těsné spojení cirkadiánních hodin a jejich poruch s imunitní odpovědí má důležitý význam pro lidské zdraví. Pochopení mechanismu cirkadiánní regulace imunitních funkcí umožňuje nové přístupy pro terapie onemocnění, včetně autoimunitních onemocnění a rakoviny.

## Bibliografy

Akashi, M., & Takumi, T. (2005). The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(5), 441–448.

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8), 675–680.

Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelierie, F., Thomas, D., & Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), 2689–2696.

Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2005). Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 174(12), 7618–7624.

Arranz, A., Doxaki, C., Vergadi, E., Martinez de la Torre, Y., Vaporidi, K., Lagoudaki, E. D., ... Tsatsanis, C. (2012). Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9517–9522.

Arvidson, N. G., Gudbjörnsson, B., Elfman, L., Rydén, A. C., Tötterman, T. H., & Hällgren, R. (1994). Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(8), 521–524.

Ayroldi, E., & Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal*, 23(11), 3649–3658.

Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., & Riccardi, C. (2007). GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1605–1615.

Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., & Riccardi, C. (2002). Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7929–7941.

Banaei, S. (2015). Novel role of microRNAs in renal ischemia reperfusion injury. *Renal Failure*, 37(7), 1073–1079.

Baumann, A., Gönnerwein, S., Bischoff, S. C., Sherman, H., Chapnik, N., Froy, O., & Lorentz, A. (2013). The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology*, 140(4), 465–474.

- Bellet, M. M., Deriu, E., Liu, J. Z., Grimaldi, B., Blaschitz, C., Zeller, M., ... Sassone-Corsi, P. (2013). Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9897–9902.
- Berardelli, R., Karamouzis, I., D'Angelo, V., Zichi, C., Fussotto, B., Giordano, R., ... Arvat, E. (2013). Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in humans. *Endocrine*, 43(1), 51–58.
- Bhattacharjee, A., Shukla, M., Yakubenko, V. P., Mulya, A., Kundu, S., & Cathcart, M. K. (2013). IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 54, 1–16.
- Bollinger, T., Leutz, A., Leliavski, A., Skrum, L., Kovac, J., Bonacina, L., ... Solbach, W. (2011). Circadian Clocks in Mouse and Human CD4+ T Cells. *PLoS ONE*, 6(12), e29801.
- Brown, R. D., Pope, B., Murray, A., Esdale, W., Sze, D. M., Gibson, J., ... Emilie, D. (2001). Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*, 98(10), 2992–2998.
- Buijs, F. N., León-Mercado, L., Guzmán-Ruiz, M., Guerrero-Vargas, N. N., Romo-Nava, F., & Buijs, R. M. (2016). The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology*, 31(3), 170–181.
- Buijs, R. M., Wortel, J., Van Heerikhuize, J. J., Feenstra, M. G. P., Ter Horst, G. J., Romijn, H. J., & Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience*, 11(5),
- Busillo, J. M., Azzam, K. M., & Cidlowski, J. A. (2011). Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38703–38713.
- Buttgereit, F., Doering, G., Schaeffler, A., Witte, S., Sierakowski, S., Gromnica-Ihle, E., ... Alten, R. (2008). Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 371(9608), 205–214.
- Cao, S., Shrestha, S., Li, J., Yu, X., Chen, J., Yan, F., ... Chen, G. (2017). Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Scientific Reports*, 7(1), 2417.
- Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A. M., & Saavedra, J. M. (1994). Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology*, 135(1), 373–378.
- Carloni, S., Favrais, G., Saliba, E., Albertini, M. C., Chalon, S., Longini, M., ... Balduini, W. (2016). Melatonin modulates neonatal brain inflammation through endoplasmic reticulum stress,

autophagy, and miR-34a/silent information regulator 1 pathway. *Journal of Pineal Research*, 61(3), 370–380.

Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J., Naji, L., Fernández-Santos, J. M., Martín-Lacave, I., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2005). Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *Journal of Pineal Research*, 39(4), 400–408.

Challet, E. (2007). Minireview: Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. *Endocrinology*, 148(12), 5648–5655.

Chikanza, I. C., Petrou, P., Kingsley, G., Chrousos, G., & Panayi, G. S. (1992). Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 35(11), 1281–1288.

Chinenov, Y., Coppo, M., Gupte, R., Sacta, M. A., & Rogatsky, I. (2014). Glucocorticoid receptor coordinates transcription factor-dominated regulatory network in macrophages. *BMC Genomics*, 15(1), 656.

Chrousos, G. P. (1995). The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 332(20), 1351–1363.

Conway-Campbell, B. L., Pooley, J. R., Hager, G. L., & Lightman, S. L. (2012). Molecular dynamics of ultradian glucocorticoid receptor action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), 383–393.

Crocker, B. A., Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(4), 414–422.

Curtis, A. M., Fagundes, C. T., Yang, G., Palsson-McDermott, E. M., Wochal, P., McGettrick, A. F., ... O'Neill, L. A. J. (2015). Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7231–7236.

Cutolo, M, Maestroni, G. J. M., Otsa, K., Aakre, O., Villaggio, B., Capellino, S., ... Sulli, A. (2005). Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(2), 212–216.

Cutolo, Maurizio. (2012). Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 24(3), 312–318.

Darnell, J. E., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164), 1415–1421.

- de Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 737–749.
- De Silva, M., Binder, A., & Hazleman, B. L. (1984). The timing of prednisolone dosage and its effect on morning stiffness in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43(6), 790–793.
- DeKoter, R. P., & Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5470), 1439–1441.
- Delerive, P., Monté, D., Dubois, G., Trottein, F., Fruchart-Najib, J., Mariani, J., ... Staels, B. (2001). The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Reports*, 2(1), 42–48.
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 517–549.
- Dickmeis, T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology*, 200(1), 3–22.
- Do, M. T. H., & Yau, K.-W. (2010). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiological Reviews*, 90(4), 1547–1581.
- Drijfhout, W. J., van der Linde, A. G., de Vries, J. B., Grol, C. J., & Westerink, B. H. C. (1996). Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neuroscience Letters*, 202(3), 185–188.
- Dumbell, R., Matveeva, O., & Oster, H. (2016). Circadian Clocks, Stress, and Immunity. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 37.
- Dzhagalov, I., Giguère, V., & He, Y.-W. (2004). Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor alpha. *Journal of Immunology*, 173(5), 2952–2959. Retrieved from
- Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., Carroll, R. G., ... Curtis, A. M. (2018). Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 $\beta$  in macrophages via NRF2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(36), E8460–E8468.
- Ebling, F. J. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 109–132.
- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., & Flavell, R. A. (2011). Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. *Immunity*, 34(5), 665–679.
- Ella, K., Csépanyi-Kömi, R., & Káldi, K. (2016). Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 209–221.

- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. M. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 163–188.
- Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M., & Parinandi, N. L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*, 532(1), 1–12.
- Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5), 669–679.
- Espino, J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2012). Oxidative Stress and Immunosenescence: Therapeutic Effects of Melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–9.
- Falvey, E., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (1995). The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. *The EMBO Journal*, 14(17), 4307–4317.
- Feinberg, M. W., Wara, A. K., Cao, Z., Lebedeva, M. A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., ... Jain, M. K. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO Journal*, 26(18), 4138–4148.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102–114.
- Fonjallaz, P., Ossipow, V., Wanner, G., & Schibler, U. (1996). The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences. *The EMBO Journal*, 15(2), 351–362.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Nohara, A., Gervois, P., Teissier, E., Fruchart, J.-C., ... Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). Liver X Receptor Activation Potentiates the Lipopolysaccharide Response in Human Macrophages. *Circulation Research*, 101(1), 40–49.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Pourcet, B., Duez, H., Duhem, C., Fruchart, J.-C., ... Staels, B. (2008). The nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Molecular Endocrinology* 22(8), 1797–1811.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, 327(5966), 656–661.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., ... Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280(5369), 1564–1569.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. *Cell*, 109(2), S81–S96.
- Gordon, S. (1995). The macrophage. *BioEssays*, 17(11), 977–986.

- Grandin, L. D., Alloy, L. B., & Abramson, L. Y. (2006). The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: Review and evaluation. *Clinical Psychology Review*, 26(6), 679–694.
- Guenther, M. G., Barak, O., & Lazar, M. A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), 6091–6101.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), 391–403.
- Guo, D., Zhu, Y., Sun, H., Xu, X., Zhang, S., Hao, Z., ... Ren, H. (2019). Pharmacological activation of REV-ERB $\alpha$  represses LPS-induced microglial activation through the NF- $\kappa$ B pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(1), 26–34.
- Guo, H., Brewer, J. M., Champhekar, A., Harris, R. B. S., & Bittman, E. L. (2005). Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3111–3116.
- Haas, S., & Straub, R. H. (2012). Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, role of IL-1 $\beta$ /TNF. *Arthritis Research & Therapy*, 14(3), R122.
- HALBERG, F., JOHNSON, E. A., BROWN, B. W., & BITTNER, J. J. (1960). Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, N.Y.), 103, 142–144.
- Haldar, C., Häubler, D., & Gupta, D. (1992). Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *Journal of Pineal Research*, 12(2), 79–83.
- Hardeland, R. (2009). Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors*, 35(2), 183–192.
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 350–384.
- Harkness, J. A., Richter, M. B., Panayi, G. S., Van de Pette, K., Unger, A., Pownall, R., & Geddawi, M. (1982). Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 284(6315), 551–554.
- Haupt, C. M., Alte, D., Dörr, M., Robinson, D. M., Felix, S. B., John, U., & Völzke, H. (2008). The relation of exposure to shift work with atherosclerosis and myocardial infarction in a general population. *Atherosclerosis*, 201(1), 205–211.

- Hermes, M. L., Coderre, E. M., Buijs, R. M., & Renaud, L. P. (1996). GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *The Journal of Physiology*, 496 ( Pt 3)(Pt 3), 749–757.
- Herzog, E. D. (2007). Neurons and networks in daily rhythms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 790–802.
- Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K., & Nomura, M. (1998). Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(1), 83–87.
- Hoppstädter, J., Kessler, S. M., Bruscoli, S., Huwer, H., Riccardi, C., & Kiemer, A. K. (2015). Glucocorticoid-induced leucine zipper: a critical factor in macrophage endotoxin tolerance. *Journal of Immunology*, 194(12), 6057–6067.
- HRISCU, M. L. (2005). Modulatory Factors of Circadian Phagocytic Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057(1), 403–430.
- Imrich, R., Vlcek, M., Aldag, J. C., Kerlik, J., Radikova, Z., Rovensky, J., ... Masi, A. T. (2010). An endocrinologist's view on relative adrenocortical insufficiency in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193(1), 134–138.
- Ishizuka, T., & Lazar, M. A. (2003). The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), 5122–5131.
- Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(1), 7–13.
- Jacobson, L. (2005). Hypothalamic–Pituitary–Adrenocortical Axis Regulation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 34(2), 271–292.
- Jia, T., Serbina, N. V, Brandl, K., Zhong, M. X., Leiner, I. M., Charo, I. F., & Pamer, E. G. (2008). Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology*, 180(10), 6846–6853.
- Jiang, P., Liu, R., Zheng, Y., Liu, X., Chang, L., Xiong, S., & Chu, Y. (2012). MiR-34a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. *Experimental Cell Research*, 318(10), 1175–1184.
- Johnson, G. L. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 298(5600), 1911–1912.

- Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Endert, E., Buijs, R. M., & Fliers, E. (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), 20–29.
- Kalsbeek, Andries, Verhagen, L. A. W., Schalij, I., Foppen, E., Saboureau, M., Bothorel, B., ... Pévet, P. (2008). Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *European Journal of Neuroscience*, 27(4), 818–827.
- Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K., & Salminen, A. (2013). Antagonistic crosstalk between NF- $\kappa$ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular Signalling*, 25(10), 1939–1948.
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650.
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H.-D., ... Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21407–21412.
- Kim, S.-J., Kang, H. S., Lee, J.-H., Park, J.-H., Jung, C. H., Bae, J.-H., ... Im, S.-S. (2015). Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 462–469.
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl\_2), R271–R277.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., ... Yamamoto, M. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, 7, 11624.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galán, J. E., Janeway, C. A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), 191–202.
- Kondratov, R. V, Chernov, M. V, Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Gudkov, A. V, & Antoch, M. P. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes & Development*, 17(15), 1921–1932.
- Kondratov, R. V, Vykhoanets, O., Kondratova, A. A., & Antoch, M. P. (2009). Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Aging*, 1(12), 979–987.
- Kopmels, B., Wollman, E. E., Guastavino, J. M., Delhaye-Bouchaud, N., Fradelizi, D., & Mariani, J. (1990). Interleukin-1 hyperproduction by in vitro activated peripheral macrophages from cerebellar mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, 55(6), 1980–1985.

- Lam, M. T. Y., Cho, H., Lesch, H. P., Gosselin, D., Heinz, S., Tanaka-Oishi, Y., ... Glass, C. K. (2013). Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature*, 498(7455), 511–515.
- Lasa, M., Abraham, S. M., Boucheron, C., Saklatvala, J., & Clark, A. R. (2002). Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7802–7811.
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651.
- Leclerc, G. M., & Boockfor, F. R. (2005). Pulses of Prolactin Promoter Activity Depend on a Noncanonical E-Box that Can Bind the Circadian Proteins CLOCK and BMAL1. *Endocrinology*, 146(6), 2782–2790.
- Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, 107(7), 855–867.
- Lee, J., Moulik, M., Fang, Z., Saha, P., Zou, F., Xu, Y., ... Yechoor, V. K. (2013). Bmal1 and  $\beta$ -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced  $\beta$ -cell failure in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2327–2338.
- Levandovski, R., Dantas, G., Fernandes, L. C., Caumo, W., Torres, I., Roenneberg, T., ... Allebrandt, K. V. (2011). Depression Scores Associate With Chronotype and Social Jetlag in a Rural Population. *Chronobiology International*, 28(9), 771–778.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317–325.
- Lin, C., Tang, X., Zhu, Z., Liao, X., Zhao, R., Fu, W., ... Guo, D. (2014). The rhythmic expression of clock genes attenuated in human plaque-derived vascular smooth muscle cells. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 14.
- Lombardi, D. A., Folkard, S., Willetts, J. L., & Smith, G. S. (2010). Daily sleep, weekly working hours, and risk of work-related injury: us national health interview survey (2004–2008). *Chronobiology International*, 27(5), 1013–1030.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., & Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *The EMBO Journal*, 16(22), 6762–6771.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., & Iwasaki, A. (2003). Toll-like Receptor 9-mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(3), 513–520.

- Luu, K., Greenhill, C. J., Majoros, A., Decker, T., Jenkins, B. J., & Mansell, A. (2014). STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses. *Immunology and Cell Biology*, 92(9), 761–769.
- Ma, H., Zhong, W., Jiang, Y., Fontaine, C., Li, S., Fu, J., Yan, D. (2013). Increased Atherosclerotic Lesions in LDL Receptor Deficient Mice With Hematopoietic Nuclear Receptor Rev - erb  $\alpha$  Knock - Down. *Journal of the American Heart Association*, 2(4).
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 401–426.
- Ma, S., Liu, M., Xu, Z., Li, Y., Guo, H., Ge, Y., ... Shi, J. (2016). A double feedback loop mediated by microRNA-23a/27a/24-2 regulates M1 versus M2 macrophage polarization and thus regulates cancer progression. *Oncotarget*, 7(12), 13502.
- Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 451–483.
- McCoy, C. E., Sheedy, F. J., Qualls, J. E., Doyle, S. L., Quinn, S. R., Murray, P. J., & O'Neill, L. A. J. (2010). IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20492–20498.
- McCubrey, J. A., LaHair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive Oxygen Species-Induced Activation of the MAP Kinase Signaling Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1775–1789.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186), 442–447.
- Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., ... O'Neill, L. A. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167(2), 457-470.e13.
- Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., ... O'Neill, L. A. (2018). Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 556(7699), 113–117.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., & Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes & Development*, 15(8), 995–1006.
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167.
- Mittelstadt, P. R., & Ashwell, J. D. (2001). Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29603–29610.

- Miyata, M., Lee, J.-Y., Susuki-Miyata, S., Wang, W. Y., Xu, H., Kai, H., ... Li, J.-D. (2015). Glucocorticoids suppress inflammation via the upregulation of negative regulator IRAK-M. *Nature Communications*, 6, 6062.
- Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P. K., Espinosa, L., Stanley, E. R., Nutt, S. L., ... Sieweke, M. H. (2013). M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature*, 497(7448), 239–243.
- Mure, L. S., Le, H. D., Benegiamo, G., Chang, M. W., Rios, L., Jillani, N., ... Panda, S. (2018). Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*, 359(6381)
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737.
- Muxel, S. M., Laranjeira-Silva, M. F., Carvalho-Sousa, C. E., Floeter-Winter, L. M., & Markus, R. P. (2016). The RelA/cRel nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pineal Research*, 60(4), 394–404.
- Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., & Allen, J. E. (2009). Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can Be Reprogrammed to Enable Microbial Killing. *The Journal of Immunology*, 182(5), 3084–3094.
- Narasimamurthy, R., Hatori, M., Nayak, S. K., Liu, F., Panda, S., & Verma, I. M. (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12662–12667.
- Nguyen, H. Q., Hoffman-Liebermann, B., & Liebermann, D. A. (1993). The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell*, 72(2), 197–209.
- Nguyen, K. D., Fentress, S. J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J. S., & Chawla, A. (2013). Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*, 341(6153), 1483–1488.
- Nguyen, V. T., & Benveniste, E. N. (2000). Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23674–23684.
- Ní Gabhann, J., Hams, E., Smith, S., Wynne, C., Byrne, J. C., Brennan, K., ... Jefferies, C. A. (2014). Btk Regulates Macrophage Polarization in Response to Lipopolysaccharide. *PLoS ONE*, 9(1), e85834.
- Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*, 75(1), 1–12.

- O'Neill, J. S., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Takahashi, J. S., & Hastings, M. H. (2008). cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320(5878), 949–953.
- Oliva-Ramírez, J., Moreno-Altamirano, M. M. B., Pineda-Olvera, B., Cauich-Sánchez, P., & Sánchez-García, F. J. (2014). Crosstalk between circadian rhythmicity, mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity. *Immunology*, 143(3), 490–497.
- Osorio, F., & Reis e Sousa, C. (2011). Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity*, 34(5), 651–664.
- Panzer, S. E., Dodge, A. M., Kelly, E. A. B., & Jarjour, N. N. (2003). Circadian variation of sputum inflammatory cells in mild asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), 308–312.
- Peter, R., Alfredsson, L., Knutsson, A., Siegrist, J., & Westerholm, P. (1999). Does a stressful psychosocial work environment mediate the effects of shift work on cardiovascular risk factors? *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 25(4), 376–381.
- Petrovsky, N., McNair, P., & Harrison, L. C. (1998). Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine*, 10(4), 307–312.
- Pourcet, B., Zecchin, M., Ferri, L., Beauchamp, J., Sitaula, S., Billon, C., ... Duez, H. M. (2018). Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice. *Gastroenterology*, 154(5), 1449-1464.e20.
- 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.
- Privalsky, M. L. (2004). The Role of Corepressors in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 315–360.
- Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., & Benveniste, E. N. (2012). SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3439–3448.
- Rahman, M. S., & Woollard, K. (2017). Atherosclerosis. *In Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 1003, pp. 121–144).
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945), 975–978.

- Rao, N. A. S., McCalman, M. T., Moulos, P., Francoijs, K.-J., Chatziioannou, A., Kolisis, F. N., ... Stunnenberg, H. G. (2011). Coactivation of GR and NFκB alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Genome Research*, 21(9), 1404–1416.
- Ratsimandresy, R. A., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2013). An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Frontiers in Immunology*, 4, 440.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., & McKnight, S. L. (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*, 293(5529), 506–509.
- Reily, M. M., Pantoja, C., Hu, X., Chinenov, Y., & Rogatsky, I. (2006). The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *The EMBO Journal*, 25(1), 108–117.
- REITER, R. J., CALVO, J. R., KARBOWNIK, M., QI, W., & TAN, D. X. (2006). Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 376–386.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 81–120.
- Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P. H., ... Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature Immunology*, 10(10), 1073–1080.
- Saeb-Parsy, K., Lombardelli, S., Khan, F. Z., McDowall, K., Au-Yong, I. T., & Dyball, R. E. (2000). Neural connections of hypothalamic neuroendocrine nuclei in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(7), 635–648.
- Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Takahashi, M., Izawa, T., Imaizumi, K., ... Kizaki, T. (2014). A circadian clock gene, Rev-erba, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 192(1), 407–417.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J.-E., Zhang, D., ... Frenette, P. S. (2012). Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues. *Immunity*, 37(2), 290–301.
- Schönheit, J., Kuhl, C., Gebhardt, M. L., Klett, F. F., Riemke, P., Scheller, M., ... Rosenbauer, F. (2013). PU.1 Level-Directed Chromatin Structure Remodeling at the Irf8 Gene Drives Dendritic Cell Commitment. *Cell Reports*, 3(5), 1617–1628.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., ... Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, 62(6), 1217–1226.

- Scott, E., Simon, M., Anastasi, J., & Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265(5178), 1573–1577.
- Sennels, H. P., Jørgensen, H. L., & Fahrenkrug, J. (2015). Diurnal changes of biochemical metabolic markers in healthy young males – the Bispebjerg study of diurnal variations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75(8), 686–692.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., & Jongeneel, C. V. (1990). Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(1), 35–47.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787–795.
- Siepkka, S. M., Yoo, S.-H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., ... Takahashi, J. S. (2007). Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*, 129(5), 1011–1023.
- Silver, A. C., Arjona, A., Walker, W. E., & Fikrig, E. (2012). The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*, 36(2), 251–261.
- Silver, A. C., Buckley, S. M., Hughes, M. E., Hastings, A. K., Nitabach, M. N., & Fikrig, E. (2018). Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells. *Heliyon*, 4(3), e00579.
- Smolensky, M. H., Lemmer, B., & Reinberg, A. E. (2007). Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), 852–882.
- Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Comas, M., Gasparian, A. V, Fedtsova, N., Gleiberman, A. S., ... Antoch, M. P. (2012). Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), E2457-65.
- Stevens, R. G., Hansen, J., Costa, G., Haus, E., Kauppinen, T., Aronson, K. J., ... Straif, K. (2011). Considerations of circadian impact for defining “shift work” in cancer studies: IARC Working Group Report. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(2), 154–162.
- Strebovsky, J., Walker, P., Lang, R., & Dalpke, A. H. (2011). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NF $\kappa$ B signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *The FASEB Journal*, 25(3), 863–874.
- Sumbayev, V. V. (2008). LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling triggers cross-talk of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and HIF-1 $\alpha$  protein. *FEBS Letters*, 582(2), 319–326.

- Sutterwala, F. S., Haasken, S., & Cassel, S. L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), 82–95.
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 901–944.
- Thompson, R. C., Vardinogiannis, I., & Gilmore, T. D. (2013). Identification of an NF- $\kappa$ B p50/p65-responsive site in the human MIR155HG promoter. *BMC Molecular Biology*, 14, 24.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., ... Tocci, M. J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768–774.
- To, H., Irie, S., Tomonari, M., Watanabe, Y., Kitahara, T., & Sasaki, H. (2009). Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumour necrosis factor- $\alpha$  in collagen-induced arthritic rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(10), 1333–1338.
- To, H., Yoshimatsu, H., Tomonari, M., Ida, H., Tsurumoto, T., Tsuji, Y., ... Eguchi, K. (2011). Methotrexate Chronotherapy is Effective Against Rheumatoid Arthritis. *Chronobiology International*, 28(3), 267–274.
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409.
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development*, 20(5), 515–524.
- Van Cauter, E., Spiegel, K., Tasali, E., & Leproult, R. (2008). Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Medicine*, 9, S23–S28.
- Viswambharan, H., Carvas, J. M., Antic, V., Marecic, A., Jud, C., Zaugg, C. E., ... Yang, Z. (2007). Mutation of the Circadian Clock Gene Per2 Alters Vascular Endothelial Function. *Circulation*, 115(16), 2188–2195.
- Wang, S., Lin, Y., Yuan, X., Li, F., Guo, L., & Wu, B. (2018). REV-ERB $\alpha$  integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis. *Nature Communications*, 9(1), 4246. 5
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 551–577.
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472(7344), 476–480.

- Xia, M.-Z., Liang, Y.-L., Wang, H., Chen, X., Huang, Y.-Y., Zhang, Z.-H., ... Song, L.-H. (2012). Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Journal of Pineal Research*, 53(4), 325–334.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., & Okamura, H. (2000). Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4773–4781.
- Yang, L., Chu, Y., Wang, L., Wang, Y., Zhao, X., He, W., ... Gao, C. (2015). Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology*, 28(1), 525–530.
- Yin, L., & Lazar, M. A. (2005). The Orphan Nuclear Receptor Rev-erb $\alpha$  Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene. *Molecular Endocrinology*, 19(6), 1452–1459.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. (1997). The I $\kappa$ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , Necessary for I $\kappa$ B Phosphorylation and NF- $\kappa$ B Activation. *Cell*, 91(2), 243–252.
- Zelcer, N., & Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 607–614.
- Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., ... Kay, S. A. (2010). Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nature Medicine*, 16(10), 1152–1156.
- Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16219–16224.
- Zhang, Y., Li, X., Grailer, J. J., Wang, N., Wang, M., Yao, J., ... Li, X. (2016). Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Journal of Pineal Research*, 60(4), 405–414.
- Zhong, H., Voll, R. E., & Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300. *Molecular Cell*, 1(5), 661–671.
- Zhuang, X., Rambhatla, S. B., Lai, A. G., & McKeating, J. A. (2017). Interplay between circadian clock and viral infection. *Journal of Molecular Medicine*, 95(12), 1283–1289.