

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Kristýna Kováčová

Cirkadiánní regulace leukocytů
Circadian regulation of leukocytes

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

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, 14.8.2020

Kristýna Kováčová

Ráda bych vyjádřila nesmírné poděkování své vedoucí práce, paní docentce Aleně Sumové za její časovou investici, podporu a shovívavost. Díky patří i mé rodině, která mě v mém studiu jak finančně, tak psychicky podporuje.

Klíčová slova: cirkadiánní hodiny, imunitní systém, leukocyty, cytokiny, melatonin, glukokortikoidy

Abstrakt: Ve své bakalářské práci se budu zabývat vztahem mezi cirkadiánními hodinami a imunitním systémem, konkrétně pak tím, jak cirkadiánní hodiny působí na leukocyty. Shrnu ty vlastnosti a funkce leukocytů, které mají denní proměnlivost. Vysvětlím molekulární podstatu biologických hodin a mechanismus, jakým ovlivňují fungování leukocytů. Nastíním možnosti seřizování leukocytů a účinky rytmických signálních molekul na leukocyty.

Key words: circadian clock, immune system, leukocytes, cytokines, melatonin, glucocorticoids

Abstract: In my bachelor thesis i will be discussing the relationship between the circadian and the immune system particularly the influence of the circadian clock on leukocytes. I will summarize the time-dependent properties and functions of leukocytes. I will explain the importance of the circadian clock, its molecular mechanism and how it affects leukocytes and their functions. Last but not least i will outline the means by which the central clock synchronizes leukocytes and the effects of rhythmic signaling molecules on leukocytes.

Obsah

Úvod.....	6
1. Cirkadiánní systém.....	6
2. Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin	9
3. Leukocyty a jejich funkční dělení	11
4. Cirkadiánní rytmy leukocytů.....	11
4.1 Pohyb leukocytů v těle	12
4.1.1 Pohyb T lymfocytů lymfatickými uzlinami	13
4.1.2 Recirkulace hematopoiетických kmenových buněk	14
4.1.3 Rytmus migrace monocytů do tkání a jeho důsledky	14
4.2 Syntéza a sekrece cytokinů.....	15
4.2.1 Schopnost sekrece prozánětlivých cytokinů je u myši večer vyšší než ráno	15
4.2.2 Schopnost sekrece prozánětlivých cytokinů je u člověka nejvyšší v noci	16
4.2.3 Rytmus poměru IFN- γ /IL-10 vytváří rytmus Th1/Th2 polarizace.....	16
4.2.4 Rytmus Th1/Th2 polarizace je u nočních i denních živočichů stejný.....	17
4.2.5 Sekrece IFN- γ CD4+ lymfocyty je rytmická a nezávislá na imunomodulátorech..	17
4.3 Syntéza a sekrece imunoglobulinů	18
4.4 Syntéza a sekrece perforinu a granzymu B	19
4.5 Fagocytóza.....	19
4.6 Exprese receptorů	20
5. Cirkadiánní hodiny leukocytů a mechanismus jejich působení	21
5.1 BMAL1 stimuluje a REV-ERB α inhibuje diferenciaci Th17 lymfocytů	22
5.2 BMAL1 stimuluje reaktivitu na DNA patogenu	23
5.3 PER2 inhibuje reaktivitu žírných buněk	24
5.4 CRY inhibuje přepis prozánětlivých cytokinů	24
5.5 BMAL1 stimuluje a REV-ERB α inhibuje přepis <i>Ccl2</i>	25
6. Mechanismy seřizování cirkadiánních hodin leukocytů	25

6.1 Glukokortikoidy.....	26
6.2 Sympatický nervový systém.....	27
6.3 Režim v příjmu potravy	28
7. Rytmičké imunomodulátory a jejich vliv na leukocyty	29
7.1 Glukokortikoidy.....	29
7.2 Norepinefrin.....	30
7.3 Melatonin.....	32
Závěr.....	33
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35

Úvod

Leukocyty jsou součástí nejen imunitního, ale také cirkadiánního systému. Jsou to periferní oscilátory, které mají své vlastní cirkadiánní hodiny. Spojnicí mezi nimi a centrálním oscilátorem jsou rytmické neurální a humorální signály. Tyto signály mohou zásahem do chodu cirkadiánních hodin leukocytů regulovat jejich fázi a periodu. Na fungování leukocytů mají mnohé účinky, kterých mohou dosahovat i způsobem nezávislým na jejich vnitřních hodinách. V sérii nebo paralelně s proteinovými produkty hodinových genů regulují v leukocytech expresi efektorových proteinů a zodpovídají tak za denní proměnlivost mnoha imunologických dějů. Cílem této bakalářské práce je seznámit čtenáře s cirkadiánním systémem a jeho organizací, vysvětlit účel tohoto systému a způsob, jakým je realizován. Dále pak podrobně popsat denní proměnlivost s leukocyty spjatých imunologických dějů, denní profil cirkadiánních hodin v leukocytech a konkrétní způsoby, kterými cirkadiánní hodiny leukocytů zasahují do buněčných dějů. V neposlední řadě bude tato práce pojednávat o tom, jakými rytmickými signály a jak jsou hodiny leukocytů seřizovány a o výsledných účincích rytmických modulátorů na tyto buňky. Na základě sebraných dat si poté dává tato práce za cíl sestavit denní profil imunitního systému, porovnat, jak se liší u denních a nočních živočichů, klasifikovat hodinové geny podle charakteru jejich účinků a v neposlední řadě také nastínit možnosti klinické aplikace zjištěných poznatků.

1. Cirkadiánní systém

Zemská rotace, potažmo střídání dne a noci, je hlavní evoluční silou, jež vedla ke vzniku vnitřních cirkadiánních hodin. Cirkadiánní hodiny slouží živým systémům k adaptaci jejich tělesných funkcí na čtyřicetihodinové světelné a teplotní cykly. U savců včetně člověka je tato adaptace manifestována nejen střídáním aktivní a spánkové fáze, a s tím spojenými rytmickými změnami tělesné teploty, krevního tlaku či aktivity trávicího ústrojí, ale také rytmickou povahou imunologických procesů. Cirkadiánní hodiny jsou systémem hierarchizovaných oscilátorů, na jehož vrcholu stojí tzv. pacemaker neboli centrální oscilátor. Pacemaker spontánně generuje rytmický výstupní signál, je schopen seřadit jej podle vnějších světelných podmínek a jeho prostřednictvím synchronizovat semiautonomní periferní oscilátory uložené v ostatních buňkách v těle (shrnutí v Albrecht, 2012).

Všechny buňky v těle jsou vybaveny intracelulárními cirkadiánními hodinami, které fungují na principu samoudržovacích transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček (shrnutí v Albrecht, 2012). Buňky pacemakeru se od ostatních buněk těla odlišují tím, že je v nich chod těchto hodin, prostřednictvím jejich vzájemné komunikace, autonomně a organizovaně regulován. Díky tomu mohou poskytovat koherentní signál periferním oscilátorům, upravovat tak jejich fázi a periodu. Samotný pacemaker je pak dominantně seřizován světlem. Koherence jeho výstupu a tím pádem schopnost seřizovat periferní oscilátory tím sice není podmíněna, ale existence cirkadiánního systému neschopného přijímat signály z vnějšího prostředí by však postrádala smysl. Hlavním účelem cirkadiánního systému je totiž přizpůsobovat fyziologické parametry měnícím se vnějším podmínkám (shrnutí v Albrecht, 2012). Pokud by tomu tak nebylo, fáze cirkadiánních hodin, jejichž endogenní perioda může být kratší nebo delší, než je jeden den, (Czeisler et al., 1999) by se vůči fázi solárního dne každý den posouvala.

Anatomickou strukturou plnící funkci pacemakeru jsou párová suprachiasmatická jádra (SCN) předního hypotalamu. V obou suprachiasmatických jádrech nacházíme dvě funkčně odlišné oblasti, a to tzv. jádro (*z angl. core*) a obal (*z angl. shell*) (Moore et al., 1996). Oblast jádra je přes retinohypotalamickou dráhu inervována fotosenzitivními retinálními gangliovými buňkami (ipRGCs) (Robert et al., 1972; Baver et al., 2008). Prostřednictvím této inervace jsou neurony jader SCN seřizovány podle vnějších světelných podmínek. Když jsou ipRGCs stimulovány světlem, uvolňují na synapsích v jádrech SCN glutamát (de Vries et al., 1993). Pokud k této stimulaci dojde v průběhu subjektivní noci, kdy jsou endogenní hodiny ve fázi nočního fenotypu, spouští glutamát signalizační kaskádu ústící v indukci denního fenotypu vnitřních hodin (Shearman et al., 1997). Neurony jader převádějí tento světelný synchronizační signál prostřednictvím synaptického výlevu vasoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP) neuronům v obalu SCN (Maywood et al., 2006). Neurony SCN se vyznačují tím, že spontánně generují akční potenciály, jejichž frekvence se v průběhu dne mění (Inouye et al., 1979). S denním fenotypem se u nich totiž pojí exprese vysoce vodivých vápníkem aktivovaných sodíkových kanálů (BK kanálů), které zapříčiňují jejich depolarizaci (Meredith et al., 2006). Frekvence akčních potenciálů, s kterou axony neuronů SCN signalizují neuronům v jiných oblastech mozku, je proto ve dne vyšší než v noci. Tento rytmický výstup je podstatou synchronizačního působení pacemakeru a je stejný u denních (člověk) i nočních (myš, potkan) živočichů. SCN jsou propojena se subparaventriculární

zónou (sPVZ) a dorzomediálním (DMH) jádrem hypotalamu (Abrahamson et al., 2001) a s paraventriculárním jádrem hypotalamu (PVN) (Buijs et al., 1994).

Prostřednictvím DMH kontrolují SCN rytmus příjmu potravy i rytmus spánku a bdění (Deurveilher et al., 2005). DMH vysílá inhibiční GABAergní projekce do spánku podporujícího ventrolaterálního preoptického jádra (VLPO) a excitační glutamatergní projekce do laterálního hypotalamu, který podporuje bdění a příjem potravy (Deurveilher et al., 2005). Z DMH a sPVZ vedou projekce do PVN a ovlivňují zde sekreci hormonu kortikoliberinu (CRH) (Vrang et al., 1995). Ten se dostává portálním systémem přímo do hypofýzy, kde stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který dále působí v kůře nadledvin, kde stimuluje sekreci glukokortikoidů (shrnuto v Tsigos et al., 2002). U nočních i denních živočichů uvolňují neurony SCN během světlé fáze dne v DMV a sPVZ vazopresin. U nočních živočichů vazopresin stimuluje GABAergní neurony DMV a sPVZ. U denních živočichů vazopresin stimuluje glutamatergní neurony DMV a sPVZ (Kalsbeek et al., 2008). U nočních živočichů pozorujeme maximální hladiny glukokortikoidů v krvi na začátku noci (shrnuto v Moore et al., 1972), kdy SCN nestimuluje inhibiční působení DMH a sPVZ na PVN (Kalsbeek et al., 2008) a u denních živočichů naopak na začátku dne (shrnuto v Chan et al., 2010), kdy SCN stimuluje excitační působení DMH a sPVZ na PVN (Kalsbeek et al., 2008). Dalším hormonem, jehož sekrece je regulována SCN je melatonin. Melatonin je secernován epifýzou, která je s SCN propojena multisynaptickou dráhou probíhající přes PVN, intermediolaterální jádro (IML) páteřní míchy a superiorní cervikální ganglion (SCG), jenž je součástí sympatického nervového systému (SNS) (Borjigin et al., 1999). Z SCN vedou do PVN zakončení dvou typů neuronů. Jsou to rytmicky signalizující GABAergní neurony a kontinuálně signalizující glutamatergní neurony. Frekvence akčních potenciálů těchto GABAergních neuronů je nejvyšší ve dne, kdy proto dochází k inhibici glutamatergních neuronů PVN a tím nakonec i k inhibici sekrece melatoninu z epifýzy (Kalsbeek et al., 2000). V noci je frekvence jejich akčních potenciálů naopak nízká a převažuje tak vliv glutamatergních neuronů. Produkce melatoninu je tím pádem v noci stimulována (Perreault-Lenz et al., 2004). Tato regulace je stejná u denních i nočních živočichů, a proto u obou pozorujeme stejný rytmus melatoninu v krvi s vrcholem v nočních hodinách (Armstrong, 1989). V neposlední řadě jsou SCN prostřednictvím SNS propojena i s celou řadou periferních orgánů (viz. kapitola 6.2). Metabolické signály spojené s příjmem potravy (Damiola et al., 2000), glukokortikoidy (Balsalobre et al., 2000), melatoninem (Redman et al.,

1983) a norepinefrin (neurotransmitter SNS) (Vujović et al., 2008), to vše jsou potenciální synchronizátory periferních oscilátorů.

2. Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin

Podstatou cirkadiálních hodin je systém transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček. Rozlišujeme hlavní a vedlejší smyčku. Účastníky hlavní smyčky jsou proteiny BMAL1, CLOCK, PER (1-3) a CRY (1-2). Proteiny BMAL1 a CLOCK asociují za vzniku heterodimeru BMAL1/CLOCK (Gekakis et al., 1998), který působí v jádře jako transkripční faktor aktivující expresi genů *Per* (Gekakis et al., 1998) a *Cry* (Kume et al., 1999). Sekvence, na kterou se BMAL1/CLOCK v promotoru váže se nazývá E-box a je to enhancer (Hao et al., 1997). Transkripty těchto genů jsou translokovány do cytosolu a následně přepisovány na proteiny PER a CRY. PER a CRY rovněž vytvářejí heterodimery, jako takové jsou translokovány do jádra, zde asociují s BMAL1/CLOCK a způsobují tak inhibici své vlastní transkripce (Kume et al., 1999). Jejich opětovná syntéza může začít poté, co jsou stávající PER/CRY heterodimery degradovány (Akashi et al., 2002). Celý proces se potom opakuje. V SCN probíhá jejich přepis a proteosyntéza ve dne, translokace do jádra a inhibice přepisu v noci (Lee et al., 2001). Účastníky vedlejší smyčky jsou proteiny BMAL1, CLOCK, REV-ERB(α/β) a ROR(α/β). Současně s aktivací přepisu genů *Per* a *Cry*, stimuluje BMAL1/CLOCK také transkripci genu *Rev-erb* (Triqueneaux et al., 2004). Rovněž jako v případě *Per*, probíhá jeho transkripce ve dne (Triqueneaux et al., 2004). REV-ERB je inhibiční transkripční faktor, který je translokován do jádra, kde se váže na responzní element RORE v promotoru genu *Bmall* a inhibuje jeho přepis (Guillaumond et al., 2005). O vazbu na tomto elementu kompetuje s proteinem ROR které naopak přepis genu *Bmall* aktivuje (Guillaumond et al., 2005). Protože PER/CRY blokují BMAL1/CLOCK, vede v noci jejich přítomnost v jádře k inhibici přepisu *Rev-erb* a může proto probíhat přepis *Bmall*, aktivovaný transkripčním faktorem ROR. Díky této regulaci je přepis genu *Bmall* v protifázi s přepisem genů *Per* a *Cry* (Preitner et al., 2002).

Kromě genů *Per*, *Cry* a *Rev-erb* existuje mnoho dalších genů regulovaných transkripčním faktorem BMAL1/CLOCK. Tyto geny se nazývají hodinami řízené geny. I zde se BMAL1/CLOCK váže na E-box a aktivuje jejich transkripci (Rey et al., 2011). Produkty těchto hodinami řízených genů se účastní rozličných fyziologických dějů. Právě prostřednictvím nich se cirkadiální hodiny manifestují. Rytmičtý předpis hodinami řízených

genů může kromě BMAL1/CLOCK zajišťovat také REV-ERB, jelikož v promotorech řady těchto genů je přítomen RORE. Přepis těchto genů je vazbou REV-ERB rytmicky inhibován (Cho et al., 2012).

Výše byl popsán chod cirkadiálních hodin tak, jak ho známe z buněk SCN. Cirkadiální hodiny periferních oscilátorů fungují na stejném principu, liší se však svým časovým průběhem. Zatímco k akrofázi¹ *Per2* mRNA v SCN dochází u denních i nočních živočichů v druhé polovině světlé fáze dne (ZT10)² (Takata et al., 2002; Dardente et al., 2002), v periferních oscilátorech nočních živočichů, jako např. v játrech, slezině a mononukleárních buňkách periferní krve (PBMCs) k ní dochází v tmavé fázi (ZT14-ZT19) (Takata et al., 2002; Silver et al., 2012). Informace o transkripčním profilu *Per2* v periferních oscilátorech denních živočichů jsou dosti omezené. Několik studií na lidských PBMCs však zjistilo akrofázi *Per2* mRNA na začátku světlé fáze (Cermakian, 2009; Kusanagi et al., 2008). Denní profil *Rev-erba* mRNA je v periferních oscilátorech nočních živočichů v protifázi s jeho rytmem v SCN. V SCN je *Rev-erba*, stejně jako *Per1*, nejvíce exprimován v první polovině světlé fáze (ZT4) (Onishi et al., 2002), v periferních oscilátorech v druhé polovině světlé fáze až v první polovině tmavé fáze (ZT9-ZT15) (Torra et al., 2000; Silver et al., 2012). Z toho vyplývá, že fáze cirkadiálních hodin periferních oscilátorů je u nočních i denních živočichů o několik hodin posunuta. Fenotyp, který je v SCN typicky denní, pozorujeme v periferních oscilátorech nočních živočichů v noci.

V souvislosti s rytmickým přepisem hodinami řízených genů nás však více než rytmus hladin mRNA hodinových genů zajímá rytmus, s kterým jejich proteinové produkty obsazují promotory hodinami řízených genů. V játrech myši je fáze těchto dvou rytmů u BMAL1, REV-ERB α , PER1 i PER2 přibližně stejná (Koike et al., 2012; Atger et al., 2015), a tak je možné, že je tomu tak i v jiných periferních oscilátorech. Z tohoto předpokladu budeme v této práci také vycházet.

¹ vrchol rytmu

² Zeitgeber time (ZT) je standardizovaná jednotka času založená na vnějším 24hodinovém cyklu světla a tmy. ZT0 označuje počátek světlé fáze cyklu, ZT12 počátek tmavé fáze cyklu. Doba aktivity denních živočichů je mezi ZT0 a ZT12, doba aktivity nočních živočichů mezi ZT12 a ZT0.

3. Leukocyty a jejich funkční dělení

Leukocyty jsou specializované buňky imunitního systému. Lze je klasifikovat na základě mnoha různých kritérií, v souvislosti s obsahem této práce je však nejrelevantnější jejich dělení podle Th1/Th2 paradigmatu a to na buňky stimulované Th1 lymfocyty a na buňky stimulované Th2 lymfocyty (shrnutí v Romagnani, 1997). Th1 lymfocyty se diferencují za pomoci IL-12 a IFN- γ a produkují IL-2, IFN- γ a TNF- α , kterými stimulují aktivitu monocytů (shrnutí v Espinoza-Delgado et al., 1995) makrofágů (Wu et al., 2014), neutrofilů (Moreno et al., 2006), NK buněk (Martinez et al., 2008), cytotoxických T lymfocytů (Yang et al., 1995) a rovněž i svou vlastní aktivitu, čímž vytvářejí pozitivní zpětnou vazbu (shrnutí v Romagnani, 1997). Monocyty, makrofágy a neutrofilů zabíjejí své vlastní intracelulární patogeny a také fagocytují extracelulární patogeny, NK buňky a cytotoxické T lymfocyty zabíjí pouze intracelulární patogeny (a to včetně infikovaných buněk). Výše vyjmenované buňky se účastní takzvané buněčné imunitní odpovědi. Th2 lymfocyty se diferencují za pomoci IL-2, IL-4 a IL-6 a produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13, kterými stimulují aktivitu B buněk, eozinofilů, bazofilů a mastocytů a rovněž i svou vlastní aktivitu, čímž vytvářejí pozitivní zpětnou vazbu (shrnutí v Romagnani, 1997). Eozinofily, bazofily a mastocyty aktivují jak samotnými cytokiny, tak prostřednictvím IgE, k jehož produkci B buňky stimulují (shrnutí v Romagnani, 1997). Tyto buňky se účastní obrany proti mnohobuněčným extracelulárním patogenům (shrnutí v Romagnani, 1997) a toxinům (shrnutí v Gutierrez & Rodewald, 2013). Kromě IgE stimulují Th2 lymfocyty také sekreci IgA (shrnutí v Harriman et al., 1988), který působí především na sliznicích, kde neutralizuje patogeny (shrnutí v Corthésy, 2013). Tyto složky se účastní takzvané humorální imunitní odpovědi. Dendritické buňky produkují IL-12 nebo IL-6 v závislosti na druhu patogenu, kterého rozpoznaly, a tím určují typ odpovědi (shrnutí v Kim & Kim, 2018). Kromě již zmíněných buněk jsou součástí imunitního systému také protizánětlivě působící Treg lymfocyty a prozánětlivě působící Th17 lymfocyty (shrnutí v Eisenstein & Williams, 2009).

4. Cirkadiánní rytmy leukocytů

Denní doba má významný vliv na průběh mnoha imunologických procesů. Některé, jako třeba pohyb leukocytů, exprese receptorů nebo sekrece IgA probíhají kontinuálně a jejich rytmus lze zjistit měřením jejich změn v různých částech dne. Naproti tomu existují děje, které jsou nekontinuální. Je to například sekrece cytolytických faktorů nebo fagocytóza. U takových

dějů pak zjišťujeme, jaký má doba, kdy vyvoláme jejich aktivaci, vliv na jejich kvalitu a kvantitu.

4.1 Pohyb leukocytů v těle

Počet leukocytů v krevním oběhu se v průběhu dne mění. Nejvyššího celkového množství leukocytů v krvi je dosaženo v průběhu spánkové fáze, nejnižšího pak během fáze aktivní. Jde o obecný proces pozorovatelný jak u nočních, tak denních živočichů. Maximální množství (akrofázi) cirkulujících leukocytů nacházíme u myši v ZT5, minimální (nadir) pak v ZT13 (He et al., 2018). U člověka nastává akrofáze ve 23:00 a nadir v 8:00 (Lange et al., 2010). Jednotlivé typy leukocytů se dobou akrofáze a nadiru svých krevních hladin od celkového průměru více nebo méně liší, a to jak u myši, tak člověka (He et al., 2018; Lange et al., 2010). Amplituda oscilace hladin jednotlivých buněčných typů také není stejná a rozdíl mezi jejich hladinami v akrofázi a nadiru může být u myši dvounásobný až sedminásobný (He et al., 2018).

Tento cirkadiánní rytmus je utvářen třemi dílčími rytmy, a to 1) rytmem migrace leukocytů do tkání s vrcholem v aktivní fázi (He et al., 2018), 2) rytmem uvolňování T lymfocytů z lymfatických uzlin s vrcholem v neaktivní fázi (Druzd et al., 2017), 3) a s největší pravděpodobností také rytmem uvolňování leukocytů z kostní dřeně s vrcholem v neaktivní fázi (Méndez-Ferrer et al., 2008). Je obecně známo, že buňky vrozené imunity opouštějí krevní řečiště tehdy, když jsou rekrutovány do místa zánětu, kde svůj život nakonec ukončují. Pravdou je, že mohou migrovat i do zdravých tkání, pravděpodobně za účelem imunologického dozoru (shrnutí v Sokol et al., 2015). T lymfocyty migrují za homeostatických podmínek z krve do lymfatických orgánů, z kterých mohou poté vystupovat a celý proces opakovat, jinými slovy mají schopnost recirkulace (Gowans, 1959). Proto se na utváření rytmu v jejich krevních hladinách, potažmo rytmu v hladinách bílých krvinek, podílí i molekuly účastníci se jejich výstupu ze sekundárních lymfatických orgánů (viz. kapitola 5.1.1). Jaký má rytmická migrace leukocytů do tkání význam není zcela jasné. Je nicméně pravděpodobné, že jde o výsledek „snahy“ o větší imunitní dohled v čase, kdy je kontakt organismu s patogeny nejvyšší.

Rytmické uvolňování leukocytů z tkání a jejich rytmická migrace do tkání je zprostředkována rytmickou expresí 1) adhezních molekul na povrchu leukocytů a endotelů (He et al., 2018), 2) solubilních chemokinů a chemokinových receptorů na povrchu leukocytů (He et al., 2018;

Méndez-Ferrer et al., 2008; Besedovsky et al., 2014). Každý orgán a každý buněčný typ exprimuje odlišnou škálu těchto molekul, a to rovněž v různé míře. Navíc platí, že denní profil exprese určité molekuly se mezi jednotlivými orgány nebo buněčnými typy může lišit. Například, zatímco exprese adhezní molekuly VCAM-1 v lymfatických uzlinách vykazuje denní oscilace, v játrech je tato exprimována kontinuálně (He et al., 2018). Existuje však jeden chemokinový receptor, který nejenže je společný všem leukocytům, ale navíc je u všech exprimován rytmicky a to je CXCR4 (He et al., 2018). Jeho ligandem je CXCL12, který je, za účelem retence leukocytů, exprimován v mnoha různých orgánech, např. v ledvinách, plicích, játrech či mozku (shrnutí v Janssens et al., 2018), ale především kostní dřeni (Bleul et al., 1996).

U myši dochází k vrcholu exprese endoteliálních adhezních molekul v průměru v ZT13, tedy v čase nadiru krevních hladin leukocytů, doba jejich nejnižší exprese však době akrofáze již neodpovídá a nastává nikoliv v ZT5, ale v ZT1, kdy rovněž pozorujeme i nejnižší migraci leukocytů do tkání (He et al., 2018). Důvodem, proč je hladina leukocytů v krvi nejvyšší v ZT5, a nikoliv v ZT1 je ten, že v ZT5 je jednak stimulováno uvolňování T lymfocytů z mízních uzlin (Druzd et al., 2017), především však v ZT5 dochází k maximálnímu uvolňování hematopoietických kmenových buněk (HSCs) z kostní dřeni (Méndez-Ferrer et al., 2008). S největší pravděpodobností tak v tuto dobu dochází i k uvolňování leukocytů, čemuž nasvědčuje skutečnost, že receptor pro CXCL12, chemokin, který tuto rytmickou migraci zprostředkovává (viz. kapitola 4.1.2) nacházíme nejen u HSCs, ale, jak již bylo zmíněno, také u všech leukocytů.

4.1.1 Pohyb T lymfocytů lymfatickými uzlinami

Lymfocyty přecházejí z krve do tkáně lymfatických uzlin v místě tlustostěnných endoteliálních žilek (HEVs). Uzlinu nakonec většinou opouštějí a to eferentními lymfatickými cévami, kterými se odtud dostávají zpět do krve (shrnutí v Cyster, 1999). T lymfocyty exprimují chemokinový receptor CCR7 (Campbell, 2000). Jeho ligandem je chemokin CCL21 (Yoshida et al., 1998), který je exprimován na povrchu buněk HEVs (Druzd et al., 2017). CCL21/CCR7 interakce podporuje migraci T lymfocytů do uzlin (Druzd et al., 2017). Výstup T lymfocytů z uzlin pak zajišťuje interakce sfingosin-1-fosfátu (S1P) a S1P receptoru (S1P1) (shrnutí v Cyster, 2012). S1P je humorální signální molekula, jejíž hladina se na ose lymfatická uzlina-lymfa-krev postupně zvyšuje (Nagahashi et al., 2016). T lymfocyty nesou na svém povrchu S1P1 a lymfatický systém opouštějí pohybem po směru

gradientu S1P (shrnuto v Cyster, 2012). Počty T lymfocytů v uzlinách, zrovna tak jako jejich vstup a výstup, všechny tyto tři parametry se rytmicky mění (Druzd et al., 2017). Nejvyšší počty T lymfocytů v lymfatických uzlinách byly u myši naměřeny v ZT13 (Druzd et al., 2017), což je zcela ve shodě s výše diskutovanými poznatky. Je tomu tak proto, že v ZT13 nabývá exprese CCR7 vrcholu (Druzd et al., 2017). V průběhu celé noci je navíc zvýšená i exprese CCL21 (Druzd et al., 2017). V ZT13 tedy dochází k maximální imigraci T lymfocytů do lymfatických uzlin. Zároveň je v tuto dobu omezen jejich výstup z tkáně sníženou expresí S1P1 (Druzd et al., 2017). Ta dosahuje vrcholu v ZT5 (Druzd et al., 2017), tedy v době, kdy jsou hladiny leukocytů v krvi nejvyšší.

4.1.2 Recirkulace hematopoiетických kmenových buněk

Hematopoiетické kmenové buňky (HSCs) dávají v kostní dřeni vzniknout diferencovaným leukocytům, které jsou poté uvolňovány do krve. Je ale zajímavé, že kostní dřeň mohou opouštět a vstupovat do cirkulace i HSCs. Aby však mohly dokončit svoji diferenciaci, musí se do kostní dřene znovu vrátit. HSCs tedy, stejně jako lymfocyty, mají schopnost recirkulace (shrnuto v Morrison et al., 1995). Uvolňování HSCs do oběhu je rytmický proces, který je určen aktuální mírou jejich retence v kostní dřeni (Méndez-Ferrer et al., 2008). Za tu zodpovídá chemokin CXCL12 secernovaný stromálními buňkami kostní dřene (Bleul et al., 1996). Hladiny HSCs v krvi myšního probandu jsou nejvyšší v ZT5 a nejnižší v ZT17, hladiny CXCL12 v extracelulární tekutině kostní dřene jsou s tímto rytmem přibližně v antifázi s maximem v ZT21 a minimem v ZT9 (Méndez-Ferrer et al., 2008). Tohoto zjištění by se dalo využít v praxi při odběru kmenových buněk z krve za účelem dárcovství lidem s poruchami krvevotvorby. Pokud by byla, dle předpokladu, hladina HSCs v krvi člověka nejvyšší v noci, mohl by se této době přizpůsobit jejich odběr a získané množství buněk by tak bylo větší.

4.1.3 Rytmus migrace monocytů do tkání a jeho důsledky

Jak již bylo řečeno, jednotlivé buněčné typy se mohou dobou svých maximálních hladin v krvi lišit. To nutně souvisí i s proměnlivostí v době jejich maximální migrace do tkání. V myši slezině pozorujeme nejvyšší počty Ly6^{hi} monocytů v ZT8 (Nguyen et al., 2013). V ZT0 jsou jejich počty nízké (Nguyen et al., 2013). Aby se zjistilo, zda má tento rytmus vliv na boj organismu s infekcí, provedla se na myším probandu intraperitoneální infekce bakterií *Listeria monocytogenes* a to buď v ZT0, nebo ZT8. Myši infikované v ZT8 byly dle

předpokladu v boji s bakterií úspěšnější. Dva dny po infekci měli vyšší peritoneální koncentrace prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IFN- γ) a chemokinů (CCL2) a především nižší počty bakterie v peritoneu a slezině, než myši infikované v ZT0 (Nguyen et al., 2013). V případě podání vyšší dávky *L. monocytogenes* však vedla infekce v ZT8 k vyšší mortalitě v důsledku septického šoku (Nguyen et al., 2013). Znamená to tedy, že síla imunitní odpovědi závisí, vzhledem k rytmické migraci monocytů do tkání, na době kontaktu s antigenem. Této znalosti by se dalo využít v klinické praxi a dobu provádění očkování přizpůsobit době maximální migrace monocytů do tkání. V první řadě by však bylo zapotřebí zjistit, jaký má u člověka migrace monocytů do tkání rytmus.

4.2 Syntéza a sekrece cytokinů

Cytokiny jsou secernovány v reakci na podnět, probíhá však i jejich bazální sekrece, jak dokazují například výsledky výzkumu lidských alveolárních makrofágů, u nichž byla zjištěna bazální sekrece IL-1 β , IL-8, IL-6 a TNF- α (García et al., 1999). Její rytmicitou se tento výzkum nicméně nezabýval. Víme sice, že například koncentrace IL-6 v krvi zdravých mužů vykazuje cirkadiánní rytmus s akrofází v 1:00 a nadírem v 10:00 (Sothorn et al., 1995). Toto zjištění nicméně pramálo vypovídá o cirkadiánní rytmicitě v sekreci daného cytokinu. Rytmus v krevní koncentraci nelze ztotožňovat s rytmem sekrece, jelikož může být způsobena oscilacemi v počtech a poměrech cirkulujících leukocytů. Přestože je možné, že k rytmické bazální sekreci cytokinů na buněčné úrovni dochází, nemáme o ni žádné nebo téměř žádné informace. Studie, které se problematikou cirkadiánní rytmicity cytokinů zabývají, totiž zpravidla využívají různých látek, které sekreci cytokinů stimulují. Nejčastěji takto využívanou látkou je lipopolysacharid (LPS), povrchová molekula gram-negativních bakterií, která aktivuje monocyty, makrofágy, dendritické buňky a B lymfocyty (shrnuto v Morrison et al., 1987). Pro stimulaci sekrece cytokinů T buňkami se využívá kombinace forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA) a ionomycinu (Chatila et al., 1989).

4.2.1 Schopnost sekrece prozánětlivých cytokinů je u myši večer vyšší než ráno

Jak již víme, podání LPS stimuluje sekreci cytokinů. Zjistilo se však, že tento účinek není v průběhu dne konstantní (Gibbs et al., 2012). Myším probandům byl podán LPS buď v ZT0 či ZT12 a následně byly měřeny hladiny cytokinů, konkrétně IL-6, IL-12, CCL2, CXCL1 a CCL5, v séru. Ukázalo se, že sekrece cytokinů je u nich výrazně vyšší po podání LPS v ZT12 (Gibbs et al., 2012). Možným vysvětlením tohoto jevu je rytmus migrace leukocytů do tkání,

kde k setkávání leukocytů s antigeny primárně dochází (shrnuto v Cyster, 1999). Jak již bylo uváděno, maximální migraci pozorujeme u myši v ZT13, což by odpovídalo zvýšené sekreci cytokinů v tuto dobu. Druhým možným vysvětlením by mohla být cirkadiánní regulace exprese cytokinů, přičemž v ZT12 by byla jejich exprese stimulována. V kapitole 4.2.4 ukážeme, že v případě IL-12 tomu tak skutečně je.

4.2.2 Schopnost sekrece prozánětlivých cytokinů je u člověka nejvyšší v noci

V jedné studii byly měřeny koncentrace prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-12, TNF- α a IFN- γ v krvi odebrané zdravým mužům a ženám, která byla následně stimulována LPS. Maximální koncentrace byly u všech čtyř cytokinů zjištěny mezi 21:00 a 0:00 (Petrovsky et al., 1998). Jak již bylo zmíněno, koncentrace glukokortikoidů vykazují výraznou cirkadiánní rytmicitu. Hladina kortizolu (hlavní glukokortikoid člověka) v krvi je nejvyšší v průměru v 8:32 a nejnižší v 0:18 (Chan et al., 2010). Jejím porovnáním s rytmy zkoumaných cytokinů zjistíme jejich nápadnou inverzní korelaci. Orální podání syntetického kortizolu ve 21:00, kdy je jeho normální koncentrace téměř v nadíru, způsobilo markantní inhibici sekrece cytokinů (Petrovsky et al., 1998). V krvi, která byla hodinu od podání kortizolu odebrána a stimulována LPS, byly koncentrace cytokinů nižší oproti kontrole o 62% (IL-1) až 95% (TNF- α), počty bílých krvinek však zůstaly nezměněny. Můžeme tedy usuzovat, že rytmické změny v hladinách kortizolu řídí produkci cytokinů, která tak podléhá cirkadiánní regulaci. Kortizol ale pravděpodobně není jediným faktorem, který tuto denní proměnlivost způsobuje. Melatonin, jež vykazuje obrácený denní rytmus než kortizol, totiž u člověka stimuluje expresi IL-1, IL-12 a IFN- γ (viz. kapitola 7.3). Bylo by proto jistě přínosné ověřit, zda by mělo podání melatoninu v průběhu dne stimulační vliv na hladiny těchto cytokinů v krvi.

4.2.3 Rytmus poměru IFN- γ /IL-10 vytváří rytmus Th1/Th2 polarizace.

Rytmicita v krevních koncentracích cytokinů, bez ohledu na to, zda je způsobena jejich rytmickou produkcí nebo jen proměnlivostí v počtech a poměrech leukocytů v krvi, je nicméně velmi zajímavá. Zvláštní význam mají konkrétně IFN- γ a IL-10. Oba dva cytokiny vykazují u člověka (při stimulaci LPS) diurnální rytmicitu (Petrovsky et al., 1997). Určující je pak jejich vzájemný poměr (IFN- γ /IL-10), který je rovněž rytmický s akrofází ve 3:00 a nadírem v 15:00 (Petrovsky et al., 1997). Protože IFN- γ je ukazatelem Th1 polarizace a IL-10 ukazatelem Th2 polarizace, lze předpokládat, že jejich vzájemný poměr vytváří tendenci buď k buněčné (Th1 lymfocyty podporované) nebo humorální (Th2 lymfocyty podporované)

odpovědi (shrnuto v Romagnani, 1997). Hypotézu, že buněčná odpověď je u člověka vyšší v noci, podporují výsledky studií, které pozorovaly symptomy různých, s Th1 polarizací spjatých, zánětlivých onemocnění a jejich denní průběh a zjistili diurnální rytmus s vrcholem, tedy s největší závažností symptomů v noci a brzy ráno. Příkladem může být revmatoidní artritida (Harkness et al., 1982) či chřipka (Smith et al., 1988). Protože hladina kortizolu, který inhibuje sekreci Th1 a stimuluje sekreci Th2 cytokinů (viz. kapitola 7.1) je nejnižší v noci, a protože hladina melatoninu, který stimuluje sekreci Th1 a inhibuje sekreci Th2 cytokinů (viz. kapitola 7.3), je naopak v noci nejvyšší. Příčinou noční akrofáze IFN- γ /IL-10 je pravděpodobně rytmické působení těchto imunomodulátorů.

4.2.4 Rytmus Th1/Th2 polarizace je u nočních i denních živočichů stejný

V souvislosti s předchozí kapitolou jsou velmi zajímavé výsledky jedné studie, která se zabývala tím, jaký vliv má načasování infekce střevní hlísticí na její průběh (Hopwood et al., 2018). Probandem byla myš a parazitem cysty *Trichuris muris*. Infekce byla provedena buď na začátku světlé fáze, v ZT0 nebo na začátku tmavé fáze, v ZT12. V prvním případě byly myši v eliminaci parazita úspěšnější. Protože pro boj s extracelulárním parazitem je zapotřebí polarizace směrem k Th2 imunitě (shrnuto v Romagnani, 1997), znamená to, že po infekci v ZT0 se proband nacházel ve stavu Th2 polarizace. Dokonce se zjistilo, že za řízením Th1/Th2 rovnováhy zde stojí hodiny dendritických buněk, konkrétně jejich BMAL1. Myši s jeho delecí (*Bmal1*^{-/-}) v dendritických buňkách totiž reagovaly na parazita stejně po infekci v ZT0 i v ZT12 a to stejným způsobem, jako wild type (WT) myši infikované v ZT0 (Hopwood et al., 2018). Příčinou toho je, že BMAL1 pozitivně ovlivňuje expresi IL-12 a IL-27 (Hopwood et al., 2018). Tyto cytokiny se vážou na povrchové receptory T lymfocytů a indukují v nich transkripci genu pro IFN- γ , čímž také dochází k Th1 polarizaci (Jacobson et al., 1995; Owaki et al., 2005). Pokud je tedy *Bmal1* vyřazený z funkce, nebo pokud je hladina BMAL1 v buňce nízká, kontakt s antigenem nemůže vyústit v Th1 polarizaci (Hopwood et al., 2018). Na základě výše uvedeného bychom mohli usuzovat, že u myši (živočicha s noční aktivitou), stejně jako u člověka (živočicha s denní aktivitou) (viz. kapitola 4.2.4) je tendence k buněčné odpovědi vyšší během tmavé fáze a tendence k humorální odpovědi vyšší během světlé fáze. Pro tuto hypotézu nacházíme podpůrná data v kapitolách 4.3 až 4.6.

4.2.5 Sekrece IFN- γ CD4⁺ lymfocyty je rytmická a nezávislá na imunomodulátorech

Nejpodrobněji se cirkadiánní sekrecí cytokinů zabývala studie, která ji měřila na čerstvě izolovaných, purifikovaných a aktivovaných CD4⁺ T lymfocytech (Bollinger et al., 2011). Pro sekreci IL-2, IL-4 a IFN- γ sice prokázala cirkadiánní rytmus, protože ale tato metoda

neeliminuje vliv kortizolu a jiných imunomodulátorů, s kterými mohly CD4⁺ T lymfocyty před izolací přicházet do kontaktu, nemůžeme zjištěné rytmy dávat do přímé souvislosti s vnitřními hodinami lymfocytů. Poměry subpopulací CD4⁺ lymfocytů v krvi se navíc v průběhu 24 hodin mění, čímž mohou být rytmy dosti zkreslené. Oba zmíněné nežádoucí vlivy lze vyloučit, pokud jsou lymfocyty čerstvě izolovány a následně kultivovány po určité době v bezsérovém médiu. U IFN- γ byla takto zjištěna výrazná rytmicita (Bollinger et al., 2011) a lze tedy předpokládat, že je způsobena činností vnitřních hodin samotných leukocytů.

4.3 Syntéza a sekrece imunoglobulinů

Výsledky několika studií svědčí o tom, že celková úroveň sekrece imunoglobulinů se v průběhu dne mění. O tom, zda se na generování tohoto rytmu podílí hodinové geny plazmatických buněk nebo jestli závisí čistě na vnějších signálech, nemáme informace. Rytmičká sekrece byla zjištěna u IgA (Wada et al., 2017) a IgE (Gaultier et al., 1987). Plazmatické buňky sídlící v lymfatických uzlinách přiléhajících k podčelistním slinným žlázám produkují IgA. Ty nejdříve asociují za vzniku dimerů, v této formě se vážou na polymerní imunoglobulinové receptory (pIgR) na bazolaterální straně epitelálních buněk slinných žláz, poté jsou transcyózou převedeny na apikální stranu a zde spolu se slinami secernovány do ústní dutiny. Tam se vážou na povrch bakterií a zabraňují jim tak v přístupu k povrchu epitelu (shrnutí v Johansen et al., 2011). Na myším modelu bylo zjištěno, že množství i koncentrace IgA ve slinách se mění v závislosti na denní době, přičemž nejvyšší je v ZT6 (Wada et al., 2017). Ve všech měřených časech ji lze navíc zvýšit podáním norepinefrinu (NE). Dále víme, že slinné žlázy jsou inervovány SNS, který zde svou rytmickou signalizací upravuje expresi *Per1* a *Per2* a synchronizuje je tak s centrálním oscilátorem (Vujović et al., 2008). Z toho lze soudit, že rytmus sekrece IgA by mohl být závislý na rytmu vyplavování NE ve slinných žlázách. Možných způsobů, jakými je rytmická sekrece IgA dosahována je více. Předmětem rytmické regulace nemusí být syntéza IgA, ale jeho transcyóza do lumen žláz. Exprese pIgR totiž vykazuje cirkadiánní rytmicitu, přičemž hladiny jeho mRNA jsou nejvyšší v ZT1 (Wada et al., 2017). Dále by to mohla být regulace samotné sekrece IgA. Skutečnost, že NE stimuluje u myších splenických B buněk také produkci IgE (Pongratz et al., 2006), svědčí o tom, že se jeho působení zde neomezuje pouze na buňky slinných žláz, ale že působí i na samotné plazmatické buňky v mízních uzlinách. Co se týče IgE, bylo zjištěno, že jeho hladina v krvi výrazně osciluje u dětských pacientů s alergickým astmatem, přičemž ve dne je vyšší než v noci (Gaultier et al., 1987). V obou

případech, v prvním u myši a ve druhém u člověka, je tedy sekrece protilátek nejvyšší ve světlé fázi.

4.4 Syntéza a sekrece perforinu a granzymu B

Mezi cytolyticky aktivní buňky patří NK buňky a cytotoxické T lymfocyty. Cytotoxicita těchto buněk spočívá v indukované exocytóze sekrečních granulí obsahujících molekuly perforinu a granzymu B. Perforin narušuje integritu plazmatické membrány, vytváří v ní pór, kterým následně prochází granzym B, aby v cílové buňce indukoval apoptózu (shrnuto v Henkart, 1985). U NK buněk izolovaných ze sleziny laboratorního potkana byly zjištěny oscilace v hladinách mRNA obou proteinů, přičemž nejvyšší hladina mRNA granzymu B byla zjištěna v ZT7, nejvyšší hladina mRNA perforinu pak v ZT3 až ZT7 (Arjona & Sarkar, 2005). K jejich vrcholné expresi tedy dochází ve světlé fázi. Naopak hladiny proteinů vykazovaly maximum až v tmavé fázi, konkrétně v ZT19 (granzym B) a v ZT19 až ZT23 (perforin) (Arjona & Sarkar, 2005). To poukazuje na možnou existenci negativní zpětnovazebné smyčky mezi transkripčními a translačními cykly těchto proteinů. V jiné, starší studii byla na buňkách lymfomu testována cytolytická aktivita NK buněk (Arjona et al., 2004). NK buňky byly i zde získány izolací ze sleziny laboratorního potkana. Maximální cytolytická aktivita byla zjištěna v ZT19, tedy přesně v době vrcholné hladiny těchto proteinů v cytoplasmě NK buněk (Arjona & Sarkar, 2005). Cirkadiální rytmicita cytotoxické aktivity NK buněk tedy spočívá v rytmické syntéze cytotoxických molekul a dosahuje maxima za tmy, tedy v době aktivity. Co je velmi zajímavé, je skutečnost, že v ZT19 obsahují NK buňky také nejvyšší hladiny PER2, a že ve slezině dochází v ZT19 k nadiru v SNS signalizaci (Logan et al., 2011). Více o této problematice v kapitole 6.2.

4.5 Fagocytóza

Zda je efektivita fagocytózy závislá na denní době bylo zkoumáno na neutrofilech a makrofázích hlodavců. Fagocytická aktivita se vyjadřuje fagocytickým indexem (PI) nebo fagocytickým procentem (PP). Fagocytický index udává počet bakterií pohlcených stovkou fagocytů. Fagocytické procento udává podíl fagocytů, které pohltili alespoň jednu bakterii. Mikroskopickou analýzou krve odebrané myšimu probandu v různých částech dne a následně smíchanou a inkubovanou s *E. coli* bylo zjištěno, že obě tyto veličiny vykazují u neutrofilů cirkadiální rytmicitu. Akrofáze hodnot PI vyšla přibližně ve 3:00, nadir v 15:00 (Hriscu,

2005). Rytmus hodnot PP byl stejný, jen s o něco dřívější akrofází. Vrchol fagocytické aktivity zde tedy nastává v průběhu aktivní fáze. Velmi podobné výsledky byly získány zkoumáním neutrofilů laboratorních potkanů. Zde byla akrofáze PI zjištěna ve 4:00 a nadir v 10:00 (Hriscu, 2005). Ve shodě s tím jsou výsledky jiné studie, která pozorovala fagocytickou aktivitu myších makrofágů. Ta zjistila akrofázi PI mezi 2:00 a 3:30 (Barriga et al., 2001). Ve všech případech je tedy fagocytická aktivita nejvyšší v temné/aktivní fázi.

4.6 Exprese receptorů

Leukocyty na svých membránách i uvnitř v cytosolu exprimují širokou škálu rozličných receptorů. Rytmicita různých imunologických dějů, včetně těch popsaných výše, by mohla souviset právě s rytmickou expresí leukocytárních receptorů. Dosavadní výzkum se nejvíce zabýval Toll-like receptory (TLRs), skupinou membránových pattern recognition receptorů (PRRs) běžně exprimovanou makrofágy a dendritickými buňkami, ale také B lymfocyty (shrnutí v Kumar et al., 2009). U myších makrofágů byla zjištěna cirkadiánní exprese *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr6* a *Tlr9* (Silver et al., 2018) a u myších B lymfocytů cirkadiánní exprese *Tlr9* (Silver et al., 2012). K akrofázi hladin *Tlr2* mRNA a *Tlr6* mRNA dochází v makrofázích ve stejnou dobu, a sice v ZT19. Akrofáze *Tlr4* mRNA nastává o čtyři hodiny dříve, v ZT15 a akrofáze *Tlr9* mRNA již v ZT11. V B buňkách pozorujeme akrofázi *Tlr9* mRNA v ZT15. S výjimkou exprese *Tlr9* v makrofázích, nastává ve všech případech vrchol exprese v tmavé fázi, kdy je myš aktivní. Zvláštní význam má pro budoucí výzkum rytmická exprese *Tlr4*. TLR4 je totiž receptor, ve výzkumu hojně využívaného, LPS (shrnutí v Kumar et al., 2009). Bylo by zajímavé zjistit, zda se míra aktivace makrofágů pomocí LPS mění v závislosti na době jeho podání a zda tento rytmus koreluje s rytmem exprese *Tlr4* v makrofázích. Cirkadiánní exprese TLR9 je detailněji popsána v kapitole 5.3. Druhým typem receptorů, o jejichž rytmické expresi existují důkazy, jsou receptory pro imunoglobuliny. Konkrétně se jedná o jeden z receptorů pro IgE, FCεRI. Tento receptor se skládá ze tří typů podjednotek, FCεRIα, FCεRIβ a FCεRIγ a nacházíme jej na povrchu bazofilů a mastocytů (shrnutí v Kinet, 1999). Na myších mastocytech bylo prokázáno, že podjednotky FCεRIα a FCεRIγ jsou exprimovány kontinuálně, avšak exprese FCεRIβ je diurnálně variabilní, přičemž hladiny její mRNA dosahují maxima v ZT2, minima pak v ZT14 (Nakamura et al., 2014). Více o FCεRI v kapitole 5.2.

5. Cirkadiánní hodiny leukocytů a mechanismus jejich působení

Funkční cirkadiánní hodiny byly zjištěny u monocytů (Nguyen et al., 2013), makrofágů (Keller et al., 2009), dendritických buněk a B buněk (Silver, et al., 2012), T lymfocytů (Bollinger et al., 2011), NK buněk (Arjona & Sarkar, 2005), eozinofilů a mastocytů (Baumann et al., 2013). U bazofilů a neutrofilů dosud nebyly prokázány (shrnutí v Ella et al., 2018). Leukocyty (s výjimkou bazofilů a neutrofilů) tedy fungují jako periferní oscilátory, které mohou časově regulovat expresi celé řady svých funkčních genů. Denní profil exprese hodinových genů v leukocytech se různí nejen mezi denními a nočními živočichy, ale také mezi jednotlivými buněčnými typy. Nejkonzistentnější výsledky získáváme při měření *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* mRNA. U myších peritoneálních makrofágů pozorujeme vrchol exprese *Per1* v ZT10 a *Per2* v ZT14 (Hayashi, 2007). Téměř stejné profily byly zjištěny v jiné studii u myších makrofágů izolovaných ze sleziny. Vrchol exprese *Per1* zde byl naměřen v ZT11, u *Per2* v ZT15 (Silver et al., 2012). Dále byla zjištěna maximální hladina *Per1* mRNA v ZT11 u dendritických buněk a v ZT15 u B buněk, v obou případech opět získaných z myší sleziny (Silver, et al., 2012). Co se týče *Per2* mRNA, v obou případech nastává maximum v ZT19 (Silver et al., 2012). Hladiny *Per1* se u myších leukocytů tedy pohybují mezi ZT10 – ZT15 a hladiny *Per2* mezi ZT14 – ZT19. U lidských PBMCs jsou hladiny *Per1* i *Per2* mRNA nejvyšší na počátku světlé fáze a stejně je tomu i v případě *Cry1* a *Cry2* mRNA (Cermakian, 2009; Kusanagi et al., 2008). Exprese *Cry1* je v myších PBMCs nejvyšší v ZT11 (Xia et al., 2015). Hladiny *Rev-erba* mRNA vykazují u makrofágů, dendritických buněk i B buněk myší sleziny nápadný rytmus s vrcholem v ZT15 (Silver et al., 2012). Jiná studie zjistila u peritoneálních makrofágů rovněž velmi zřetelný rytmus, ale s vrcholem v ZT10 (Hayashi, 2007). V obou případech byl zjištěn nadir mezi ZT22 až ZT3. Pokud budeme extrapolovat, můžeme konstatovat, že u myších leukocytů je exprese *Rev-erba* nejvyšší na rozhraní světlé a tmavé fáze a nejnižší naopak na pomezí tmavé a světlé fáze. U člověka je denní rytmus exprese *Rev-erba* znám u CD4+ T lymfocytů, kde je v akrofázi ve 3:00 a v nadiru ve 12:00 (Bollinger et al., 2011). Největší variabilitu pozorujeme v hladinách *Bmal1* mRNA. U lidských PBMCs byla zjištěna (na rozdíl od *Per* a *Cry*) nekonzistentnost rytmů exprese *Bmal1* napříč testovanými jedinci (Kusanagi et al., 2008), u myší pak proměnlivost napříč buněčnými typy. U myších monocytů byl vrchol exprese *Bmal1* naměřen v ZT0 (Nguyen et al., 2013), u peritoneálních makrofágů mezi ZT22 až ZT2 (Hayashi, 2007), u splenických makrofágů však v ZT11, splenických dendritických buněk v ZT3 a splenických B buněk v ZT15 (Silver et al., 2012). U všech výše zmíněných splenocytů má navíc rytmus exprese

Bmal1 nízkou amplitudu (Silver et al., 2012). Nejednotný profil exprese *Bmal1* v periferních oscilátorech by mohl souviset s odlišnými denními profily *Ror* (aktivátor přepisu *Bmal1*) v různých periferních orgánech (Guillaumond et al., 2005). Výrazný a jednotný rytmus *Rev-erba* mRNA v splenických leukocytech nás naopak přivádí na myšlenku možné existence synchronizátoru, který by přímo reguloval přepis *Rev-erba*.

Proteinové produkty hodinových genů se do určité míry podílejí na regulaci pravděpodobně všech výše uvedených cirkadiálních dějů. Zda je děj regulován určitým hodinovým genem je typicky zkoumáno srovnáváním WT a knockout (KO) probandů, u kterých je daný gen vyřazen. Tímto způsobem bylo získáno mnoho kusých informací. Například, že PER2 pozitivně reguluje produkci perforinu, granzymu B a IFN- γ v NK buňkách laboratorních potkanů (Arjona & Sarkar, 2006) nebo že REV-ERB α inhibuje u lidských i myších makrofágů expresi *Il-6*, *Il-12*, *Ccl2* a *Ccl5* (Gibbs et al., 2012). Jakou cestou je této regulace dosaženo však nevíme. Případů, kdy známe konkrétní mechanismus působení proteinů cirkadiálních hodin nebo kdy máme informace, na základě kterých můžeme postulovat hypotézu o mechanismu jejich účinku, je o poznání méně. Několik takovýchto případů bude uvedeno v této kapitole.

5.1 BMAL1 stimuluje a REV-ERB α inhibuje diferenciaci Th17 lymfocytů

Th17 lymfocyty jsou charakteristické expresí IL-17A a IL-17F. Aktivuje ji transkripční faktor ROR γ t, který má proto klíčovou roli v diferenciaci Th17 subpopulace (Ivanov et al., 2006). K ROR γ t vede regulační dráha, na jejímž počátku stojí BMAL1/CLOCK heterodimer (Yu et al., 2014). Jak bylo pospáno v kapitole 2, BMAL1/CLOCK aktivuje expresi REV-ERB α . Ten se následně váže na konzervovanou sekvenci v *Nfil3* a tím inhibuje jeho transkripci. Absence NFIL3 pak umožňuje transkripci *Ror γ t*. Protože hladina BMAL1/CLOCK osciluje, oscilují i hladiny následných členů dráhy. Exprese *Nfil3* je v CD4⁺ T lymfocytech v akrofázi v noci (což souhlasí s nízkou hladinou *Rev-erba* mRNA zjištěnou v tuto dobu u jiných typů myších leukocytů). Protože NFIL3 znemožňuje svou vazbou na promotor transkripci *Ror γ t*, je v tuto dobu ROR γ t v nadiru. Opačná situace nastává ve dne. Výsledkem je, že naivní CD4⁺ T lymfocyty izolované ve dne a kultivované v Th17 polarizačních podmínkách dají vzniknout relativně většímu počtu Th17 buněk než lymfocyty izolované v noci (Yu et al., 2014). Naivní *Nfil3*^{-/-} dají v obou případech vzniknout přibližně stejnému množství Th17 lymfocytů, jelikož vyřazení genu *Nfil3* vede k odpřažení exprese ROR γ t od hodinových genů (Yu et al., 2014). U

Rev-erba-/- a *Clock Δ 19/ Δ 19* myši pak pozorujeme celkově nižší míru diferenciace (Yu et al., 2014).

5.2 BMAL1 stimuluje reaktivitu na DNA patogenu

TLR9 je transmembránový receptor antigen prezentujících buněk (APCs) rozpoznávající CpG sekvence virové a bakteriální DNA (Bauer et al., 2001). Na myším modelu bylo zjištěno, že promotor genu *Tlr9* obsahuje dvě E-box sekvence, na něž se váže komplex BMAL1/CLOCK (Silver, et al., 2012). Ve shodě s tím byla u splenických B lymfocytů zjištěna rytmická exprese tohoto genu. Nejvyšší hladina *Tlr9* mRNA u nich byla naměřena v ZT15, nejnižší pak v ZT3. Tomu odpovídá skutečnost, že ve splenických B buňkách dochází v ZT15 dle výsledků jiné studie i k maximální expresi *Bmall* (Silver et al., 2012). Dále byla v B buňkách měřena hladina proteinu TLR9, a to v časech ZT7 (čtyři hodiny po minimální hladině mRNA) a ZT19 (čtyři hodiny po maximální hladině mRNA). Dle předpokladu byla v ZT19 vyšší než v ZT7 (Silver, et al., 2012). Rytmická exprese *Tlr9* byla zjištěna rovněž u splenických makrofágů, v tomto případě s minimem (stejně jako u B buněk) v ZT3, maximem však již v ZT11 (Silver, et al., 2012), tedy v době, kdy v nich dochází k maximální expresi *Bmall* (Silver, et al., 2012). Dále byla zjišťována hladina TLR9 ve slezině, opět však pouze v časech ZT7 a ZT19, přičemž v ZT19 byla výrazně vyšší (Silver, et al., 2012). Víme, že TLR9 signalizace, kterou můžeme navodit podáním CpG oligodeoxynukleotidů (ODN), způsobuje aktivaci buňky a vede k produkci prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α (Campbell et al., 2009). Rovněž víme, že aktivované APCs zvyšují na svém povrchu expresi CD80 a CD86 (Fleischer et al., 1996), molekul důležitých pro aktivaci T lymfocytů (Tan et al., 1993). Proto lze předpokládat, že hladiny mRNA těchto tří proteinů ve slezině budou vyšší po podání CpG ODN v ZT19 než v ZT7. Skutečně, měření hladin jejich mRNA ve slezině dvě hodiny po podání CpG ODN potvrdilo jejich zvýšenou expresi v ZT19 (Silver, et al., 2012). Na základě tohoto zjištění vyvstala otázka, zda pokud použijeme CpG ODN jako adjuvans, povede vakcinace v ZT19 k silnější adaptivní imunitní odpovědi než vakcinace v ZT7. Myši proto byly intraperitoneálně inokulovány antigenem ovalbuminem (OVA) spolu s CpG ODN buď v ZT19 nebo v ZT7 a po čtyřech týdnech byl změřen celkový počet buněk v jejich lymfatických uzlinách. Ve shodě s předpokladem byla po inokulaci v ZT19 zjištěna vyšší OVA-indukovaná proliferace než v ZT7 (Silver, et al., 2012). Dle studií je CpG ODN jako adjuvans potenciálně využitelný v klinické praxi (shrnuté v Bode et al.,

2011). Pokud zjistíme rytmus exprese TLR9 u lidských leukocytů, mohli bychom v takovém případě optimalizovat čas provádění vakcinací.

5.3 PER2 inhibuje reaktivitu žírných buněk

Žírné buňky nesou na svém povrchu molekuly FC ϵ RI. Jsou to receptory pro IgE, kterými se mastocyty obalují. Propojení dvou molekul IgE vazbou antigenu vyvolává aktivaci mastocytu a exocytózu granulí obsahujících zánět amplifikující látky (shrnuto v Wedemeyer et al., 2000). Na myším modelu bylo zjištěno, že žírné buňky izolované z kostní dřeně vykazují časovou závislost exprese FC ϵ RI, která je regulována proteinem PER2 (Nakamura et al., 2014). Experimentální zvýšení exprese PER2 u nich totiž vedlo k snížení exprese FC ϵ RI, naopak mutace genu *Per2* vyústila ve zvýšení exprese FC ϵ RI (Nakamura et al., 2016). Dále víme, že CLOCK zvyšuje expresi proteinu FC ϵ RI β (Kraft et al., 2004), jedné z podjednotek receptoru. Děje se tak jeho vazbou na E-box-like element na promotoru genu pro FC ϵ RI β (Nakamura et al., 2014). Možným vysvětlením, jak PER2 inhibuje expresi FC ϵ RI, je proto jeho negativní působení na aktivitu CLOCK. Protože glukokortikoidy aktivují transkripci *Per2* (viz. kapitola 6.1.), není překvapivé, že jejich podání snižuje expresi FC ϵ RI (Yamaguchi et al., 2001). Navíc bylo zjištěno, že doba nejnižší hladiny *Fc ϵ ri β* mRNA je konkrétně ZT14 (Yamaguchi et al., 2001). Protože exprese *Per2* je v jiných typech myších leukocytů touto dobou naopak vysoká (Hayashi, 2007), (Silver, et al., 2012), podporuje toto zjištění správnost dosavadních výsledků a předpokladů.

5.4 CRY inhibuje přepis prozánětlivých cytokinů

CRY inhibuje u myši stimulovaných LPS sekreci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α (Narasimamurthy et al., 2012). Potvrzením, že se tato regulace týká leukocytů je skutečnost, že myši, jimž byla transplantována kostní dřeň *Cry1*^{-/-}, *Cry2*^{-/-} jedinců měli po podání LPS vyšší hladiny IL-6 a TNF- α v séru než WT myši (Narasimamurthy et al., 2012). Nabízelo by se vysvětlení, že CRY (v heterodimeru s PER) inhibuje vazbu BMAL1/CLOCK na E-box v promotoru genů *Il-6* a *Tnf- α* . Ve skutečnosti je mechanismus ale jiný. CRY inhibuje nukleární faktor kappa B (NF- κ B) (Narasimamurthy et al., 2012), což je transkripční faktor obou těchto genů (Ajuwon & Spurlock, 2005). NF- κ B se nachází v cytoplazmě v komplexu s inhibítorem nukleárního faktoru kappa B (I κ B α) a proto, aby mohl působit v jádře jako transkripční faktor, musí nejdříve dojít k fosforylaci indukované disociaci I κ B α , který mu v translokaci do jádra brání (shrnuto v Hayden & Ghosh, 2008). Konkrétní způsob, kterým

CRY inhibuje NF- κ B je ten, že inhibuje aktivitu I κ B α kinázy 2 (IKK2) (Narasimamurthy et al., 2012), která fosforyluje I κ B α a umožňuje tak translokaci NF- κ B do jádra (shrnutí v Hayden & Ghosh, 2008). Protože NF- κ B stimuluje transkripci celé řady dalších prozánětlivých cytokinů a chemokinů (shrnutí v Blackwell & Christman, 1997), znamená to tedy, že působení CRY je obecně protizánětlivé.

5.5 BMAL1 stimuluje a REV-ERB α inhibuje přepis *Ccl2* Jaderné buňky secernují v reakci na prozánětlivé cytokiny, chemokin CCL2, kterým rekrutují (nejen) monocyty do místa zánětu (shrnutí v Shi & Pamer, 2011). Bylo zjištěno, že gen pro CCL2 je pod přímou kontrolou rovnou dvou rytmických hodinových genů. Jednak je to BMAL1 v komplexu BMAL1/CLOCK (Nguyen et al., 2013) a potom také REV-ERB α (Sato et al., 2014). Promotor genu *Ccl2* tedy obsahuje jak E-box, tak RORE sekvence. U myších makrofágů bylo zjištěno, že REV-ERB α svou vazbou přepis *Ccl2* inhibuje (Sato et al., 2014). Hladiny *Rev-erba* mRNA jsou v makrofázích výrazně vyšší v ZT10 než v ZT22 (Silver et al., 2012). Dle očekávání dochází v ZT22 také k zvýšené migraci monocytů do zánětlivých tkání (Sato et al., 2014). Co se týče BMAL1/CLOCK, přestože studie, která jeho vazbu na E-box promotoru *Ccl2* zjistila, spekuluje o jeho inhibičním působení na přepis tohoto genu (Nguyen et al., 2013), pravděpodobně zde BMAL1/CLOCK, tak jak tomu zpravidla je, transkripci aktivuje. V ZT24, kdy se v myších monocytech BMAL1/CLOCK v nejmenší míře váže na promotor *Ccl2*, totiž zjišťujeme i nejnižší expresi tohoto genu, a naopak v ZT8, kdy je vazba BMAL1/CLOCK na E-box promotoru *Ccl2* vysoká dochází i ke zvýšené expresi tohoto genu (Nguyen et al., 2013). Důvodem, proč tato studie usuzovala na inhibiční působení BMAL1/CLOCK na přepis *Ccl2* je ten, že myší monocyty s delecí genu *Bmal1* vykazovaly jeho zvýšenou expresi (Nguyen et al., 2013). V souvislosti s předchozí studií, která se zabývala vlivem REV-ERB α na tento gen je ale pravděpodobné, že důvodem, proč tomu tak je, je skutečnost, že pokud je *Bmal1* vyřazen, nemůže BMAL1/CLOCK aktivovat transkripci genu *Rev-erba* (viz. kapitola 2) a REV-ERB α tím pádem nemůže inhibovat expresi *Ccl2*.

6. Mechanismy seřizování cirkadiálních hodin leukocytů

Procesem seřizování (angl. entrainment) se rozumí přizpůsobování periody a fáze oscilátoru podle vnějších rytmických synchronizačních signálů. Rozlišujeme primární seřizování centrálních hodin k vnějším cyklům prostřednictvím světla a sekundární seřizování

periferních oscilátorů s centrálními hodinami prostřednictvím neuronálních a humorálních signálů. Seřizování spočívá v zásahu synchronizátoru do chodu transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček cílové buňky. Periferní oscilátory vyžadují synchronizační signály nejen k přizpůsobení své endogenní periody vnější čtyřadvacetihodinové periodě, tak jako pacemaker, ale navíc také k udržení vzájemné fázové koherence (shrnutí v Stratmann & Schibler, 2006). V této kapitole budou uvedeny ty signály, u kterých existují doklady o jejich synchronizačním působení na leukocyty.

6.1 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou rytmicky secernované hormony kůry nadledvin, zapojené do mechanismu seřizování valné většiny buněčných typů, včetně buněk imunitního systému (Pezük et al., 2012). Mechanismus jejich působení je dobře prostudován. U člověka je hlavním glukokortikoidem kortizol a u laboratorních hlodavců kortikosteron. Glukokortikoid, ať už kortizol nebo kortikosteron, jakožto lipofilní steroidní hormon, difunduje do cytosolu cílové buňky, zde se váže na svůj receptor (GR) a v komplexu s ním je translokován do jádra. Komplex zde dimerizuje a v této podobě se váže na oblast GRE promotoru genů *Per1* a *Per2*, čímž stimuluje jejich transkripci. (Yamamoto et al., 2005; So et al., 2009) Regulace ovšem není pouze jednostranná. BMAL1/CLOCK totiž acetyluje několik lysinových zbytků GR a tím ho zbavuje schopnosti vázat se na GRE (Nader et al., 2009). Tato oboustranná regulace posiluje rytmický charakter synchronizujícího působení glukokortikoidů. Protože GRE element lze nalézt i na promotorech jiných, nehodinových genů, je možný rytmický přepis i bez přítomnosti E-boxu na promotoru genu. Jedním z takových genů je např. gen pro TGF- β 1 (Parrelli et al., 1998). TGF- β 1 mimo jiné secernuje i většina leukocytů (Letterio & Roberts, 1998). V takovém případě už se ovšem nejedná o synchronizační působení v pravém slova smyslu. Bylo potvrzeno, že k synchronizaci cirkadiálních hodin vazbou kortizolu na GRE oblast promotoru genu *Per1* dochází u lidských lymfocytů a monocytů (Yamamoto et al., 2005). Rytmická exprese *Per1* byla zjištěna také u granulocytů (Kusanagi et al., 2004). Přítomnost GRE a jeho aktivita byla dále zjištěna na promotoru *Per2* myších mesenchymálních kmenových buněk (So et al., 2009). Protože víme, že lidské PBMCs *Per2* rovněž exprimují (Teboul et al., 2005), lze se domnívat, že i zde bude docházet k regulaci transkripce kortizolem. Jak již bylo zmíněno, hladiny glukokortikoidů nabývají u denních živočichů maxima na začátku dne a u nočních živočichů na začátku noci. Důkazem jejich synchronizačního působení na leukocyty je skutečnost, že u obou typů živočichů nastává

v leukocytech vrchol transkripce *Per1* a *Per2* (viz. kapitola 5) přibližně ve stejnou dobu jako vrchol v krevních hladinách glukokortikoidů.

Narušení cirkadiálního rytmu kortizolu vede k poruchám imunitního charakteru. Lze to pozorovat u pacientů s nedostatečností nadledvinek (AI) (Bancos et al., 2017, Smans et al., 2013). Léčba těchto pacientů je standardně prováděna podáváním kortizolu, a to několikrát za den. Jeho hladiny v krvi pacienta tím pádem nemohou odpovídat normálnímu rytmu kortizolu. Co se týče PBMCs, vede u nich tato léčba, v porovnání se zdravými jedinci, ke zploštění transkripčních rytmů hodinových genů a celkovému zvýšení (*Per3*) nebo snížení (*Bmal1*, *Clock*) jejich exprese (Venneri et al., 2018). Tento efekt se pak promítá i na ostatních hodinami řízených genech. Snížená exprese byla zjištěna například u proteinu WEE1 (Venneri et al., 2018), transkripčního faktoru inhibujícího přechod buňky z G2 fáze do mitózy (Russell & Nurse, 1987), jehož promotor obsahuje E-box (Matsuo et al., 2003). To by mohlo být možnou příčinou zvýšené hladiny monocytů u těchto pacientů (Venneri et al., 2018). Dále byla zjištěna nedostatečná syntéza transkripčního faktoru CREB (Venneri et al., 2018), který stimuluje produkci IL-10 a diferenciaci Treg, inhibuje aktivitu NF- κ B a podporuje aktivaci a proliferaci T a B lymfocytů (Wen et al., 2010). Toto zjištění se slučuje se skutečností, že pacienti s AI trpí častými infekcemi (Smans et al., 2013). V neposlední řadě je zasažena funkce NK buněk, u kterých dochází k poklesu produkce perforinu a exprese povrchových receptorů rozpoznávajících ligandy na cílových virem infikovaných buňkách (Venneri et al., 2018), což může být jedním z faktorů stojícím za častější incidencí a závažností virových infekcí u pacientů s AI (Bancos et al., 2017).

6.2 Sympatický nervový systém

SCN jsou prostřednictvím SNS propojena s celou řadou orgánů, mezi něž patří srdce (Warren et al., 1994), slinné žlázy (Vujović et al., 2008), ledviny (Sly et al., 1999) nebo slezina (Demas et al., 2002). Typickým neurotransmiterem postgangliových vláken SNS je NE. Lze se proto domnívat, že by SCN mohly tyto tkáně seřizovat prostřednictvím rytmického výlevu NE. Opravdu, úloha NE v seřizování periferních oscilátorů byla u prokázána u jater a slinných žláz (Vujović et al., 2008), nicméně přesný mechanismus jeho působení je dosud neznámý. Rovněž ani s jistotou nevíme, zda takto působí na leukocyty. Výsledky studií prováděných na splenických NK buňkách laboratorních potkanů tuto hypotézu nicméně podporují (Logan et al., 2011; Arjona & Sarkar, 2006).

U laboratorních potkanů dochází ve slezině k rytmickému výlevu NE, maxima nabývá v ZT3 a minima v ZT19 (Logan et al., 2011). Hladiny PER2, granzymu B, perforinu a IFN- γ v splenických NK buňkách dosahují v ZT19 naopak svého maxima (Logan et al., 2011; Arjona & Sarkar, 2005). Skutečnost, že lokální sympatektomie způsobila narušení normálního rytmu v cytoplazmatických hladinách těchto molekul (Logan et al., 2011) a také fakt, že vyřazení genu *Per2* způsobilo v NK buňkách snížení hladin perforinu a granzymu B (Arjona & Sarkar, 2006), naznačuje, že by NE mohl negativní modulací hladin PER2 působit jako synchronizátor a inhibovat tímto způsobem expresi cytokinů a cytolytických faktorů. Mechanismus, kterým by NE reguloval expresi *Per2* není ovšem zatím znám. Tato hypotéza není v rozporu s dosavadními informacemi a předpoklady a dobře zapadá do našeho obrazu o synchronizaci leukocytů. Je tedy možné, že zatímco kortikosteron večer stimuluje transkripci *Per2*, NE ji naopak ráno inhibuje. O synchronizačním vlivu NE na leukocyty živočichů s denní aktivitou bohužel neexistují žádné informace.

6.3 Režim v příjmu potravy

Důležitým synchronizátorem periferních oscilátorů je mimo jiné také cyklus krmení a půstu (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001). Za normálních podmínek je řízen centrálním oscilátorem. V případě, že navodíme jeho inverzi tak, aby doba krmení připadala přibližně na dobu odpočinku, způsobíme tím jeho desynchronizaci s centrálním oscilátorem. Oddělí se dvě skupiny protichůdných synchronizačních signálů a ty pak kompetují o kontrolu nad fází genové exprese v periferních oscilátorech (Damiola et al., 2000). To, která skupina signálů převáží, se liší tkáň od tkáně. Například v případě jater souboj vždy vyhrávají metabolické signály (Vujović et al., 2008). U jiných tkání nemusí převážit ani jeden typ a namísto toho působí v součinnosti (Vujović et al., 2008). Zda metabolické signály stojí i za synchronizací cirkadiálních hodin bílých krvinek, není zatím ověřeno. Výsledky některých studií dokonce svědčí o opaku. V jedné takové studii byl například myším modelům umožněn příjem potravy jen ve dne, kdy je cyklus za normálních okolností ve fázi půstu. Zatímco v buňkách jater tím došlo k posunutí fáze exprese hodinových genů o dvanáct hodin, u peritoneálních makrofágů zůstala beze změny (Nguyen et al., 2013). Na druhou stranu ale existují data, která možnost synchronizačního působení metabolických signálů na cirkadiální hodiny bílých krvinek podporují.

- a) U jater myší, které mají přístup k potravě pouze během dne, je fáze exprese hodinových genů včetně *Rev-erba* převrácená. (Damiola et al., 2000)

- b) Myši peritoneální makrofágy reagují na podání LPS expresí IL-6 a dalších cytokinů. Tato reakce je diurnálně variabilní. Nejvyšší míru exprese a rovněž nejvyšší hladiny v séru pozorujeme po podání LPS v ZT12, nejnižší v ZT0. (Gibbs et al., 2012)
- c) U myši krmených ve dne pozorujeme po podání LPS v ZT12 výrazně sníženou expresi IL-6 ve slezině, oproti myším krmených v noci či ad libitum. Exprese v ZT0 je u všech stejná. Profil hladiny IL-6 v séru je inverzní, s menší amplitudou. (Cissé et al., 2018)
- d) REV-ERB α inhibuje v myších i lidských makrofázích expresi IL-6. Hladina IL-6 v séru *Rev-erba*^{-/-} myši je v ZT0 stejná jako v ZT12, ale oproti normálu je snižena. (Gibbs et al., 2012)

Syntézou těchto dílčích informací docházíme k závěru, že důvodem, proč převrácený režim krmení vede (v ZT12) ke snížení exprese IL-6, by hypoteticky mohlo být, že v makrofázích dochází vlivem metabolických signálů ke změně rytmu exprese REV-ERB α .

7. Rytmické imunomodulátory a jejich vliv na leukocyty

Kapitola 6 byla věnována tématu synchronizace cirkadiálních hodin leukocytů. Z velké části pojednávala o glukokortikoidech, NE a o tom, zda a jakým způsobem plní tyto látky roli synchronizátorů. Nicméně existuje řada studií popisujících výsledné projevy působení těchto látek na buňky imunitního systému, přičemž mechanismus tohoto působení zůstává neznámý. Zda je či není v takovém případě výsledný efekt zprostředkován zásahem do chodu cirkadiálního aparátu buňky nevíme. Jelikož jde ale o látky rytmické, existuje nebo alespoň můžeme předpokládat existenci rytmicity jejich účinků, a to i v případě, pokud by jí bylo dosaženo způsobem nezávislým na vnitřních hodinách leukocytů. V některých případech je mechanismus působení znám.

7.1 Glukokortikoidy

Kortizol reguluje u člověka expresi chemokinového receptoru CXCR4. Kortizol vyvolává v naivní CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech, centrálních paměťových CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech a efektorových paměťových CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech zvýšení exprese CXCR4 (Besedovsky et al., 2014). To je doprovázeno poklesem hladin těchto subpopulací v krvi (Besedovsky et al., 2014). T lymfocyty nesoucí CXCR4 jsou totiž chemotakticky přitahovány

do kostní dřeně, kde CXCR4 interaguje se svým ligandem, chemokinem CXCL12 (Bleul et al., 1996). Kortizol tedy stimuluje migraci T lymfocytů do kostní dřeně. Vzhledem k dennímu rytmu kortizolu můžeme očekávat, že za normálních fyziologických podmínek bude k migraci T lymfocytů do kostní dřeně docházet v ranních hodinách. Toto očekávání je v souladu se skutečností, že nejnižší hladiny těchto subpopulací T lymfocytů v krvi pozorujeme právě v ranních hodinách (Halvaksz, 2016). Tento proces se výrazně podílí na terapeutických účincích kortizolu v léčbě roztroušené sklerózy, kdy pod jeho vlivem dochází k přesměrování T lymfocytů z mozkového parenchymu do kostní dřeně. (Schweingruber et al., 2014) Je patrně i příčinou toho, proč u stresovaných zvířat (u kterých jsou hladiny glukokortikoidů zvýšené) pozorujeme oslabení adaptivní imunitní odpovědi (Fukui et al., 1997). Bylo by přínosné provést obdobný výzkum také na zvířecím modelu s noční aktivitou. Na základě dosavadních znalostí však můžeme předpokládat, že bychom stejný vliv na expresi CXCR4 zjistili i u kortikosteronu.

Jak již bylo popsáno v kapitole 4.2.2, kortizol inhibuje sekreci cytokinů IL-1, IL-12, TNF- α a IFN- γ . Expresi cytokinů IL-4, IL-10 a IL-13 glukokortikoidy u člověka naopak zvyšují (Ramírez et al., 1996) Dále poté bylo zjištěno, že glukokortikoidy v CD4⁺ T lymfocytech člověka inhibují IL-12 a IFN- γ signalizaci, čímž snižují jejich potenciál diferencovat v Th1 subpopulaci (Franchimont et al., 2000; Hu et al., 2003). Glukokortikoidy tak těmito způsoby potlačují ve dne u člověka tendenci k Th1 polarizaci. Stejný vliv na Th1/Th2 rovnováhu mají glukokortikoidy i u myši (Iwakabe et al., 1998). V neposlední řadě glukokortikoidy v lidských CD4⁺ T lymfocytech stimuluji expresi transkripčního faktoru FOXP3 a stimuluji tak jejich diferenciaci v imunosupresivní Treg buňky (Karagiannidis et al., 2004). Zda tato regulace způsobuje denní proměnlivost ve schopnosti T lymfocytů diferencovat na Treg buňky by bylo nutné ověřit v budoucím výzkumu. Účinky glukokortikoidů na buňky imunitního systému jsou ale mnohem rozsáhlejší a pestřejší. Protože by jejich popis značně přesahoval rámec této práce, nebudeme se zde jimi zabývat. Obecně však můžeme říci, že jsou jejich účinky imunosupresivní a protizánětlivé.

7.2 Norepinefrin

V kapitole 4.1.2 byla diskutována rytmická exprese chemokinu CXCL12 v kostní dřeni myši a její důsledek na oscilující hladiny HSCs v krvi. Protože v podmínkách konstantního osvětlení ztratila exprese CXCL12, a ve shodě s tím i hladiny HSCs v krvi, rytmicitu (Méndez-Ferrer et al., 2008) a protože stromální buňky, které CXCL12 produkují, jsou citlivé

na SNS signalizaci v kostní dřeni, jelikož exprimují $\beta 3$ adrenergní receptory (Méndez-Ferrer et al., 2008), vyvstala hypotéza, že exprese CXCL12 je v nich regulována pomocí NE a že jeho rytmický výlev zodpovídá za rytmus hladiny CXCL12 v kostní dřeni. Výsledky řady experimentů naznačují, že je mechanismus této regulace následující. V noci, kdy je výlev NE ze SNS v kostní dřeni myši nejvyšší (Maestroni et al., 1998), dochází ve zvýšené míře k vazbě NE na $\beta 3$ adrenergní receptory stromálních buněk. To v nich vyvolává pokles intracelulárních hladin cAMP (Soeder et al., 1999) a tím pádem oslabení aktivace PKA. Protože PKA fosforylací aktivuje transkripční faktor Sp1, který stimuluje transkripci *Cxcl12*, vede nedostatek aktivovaného PKA k oslabení transkripce *Cxcl12* (Méndez-Ferrer et al., 2008). Protože ale nejnížší hladinu CXCL12 můžeme v kostní dřeni naměřit až v ZT9 (Méndez-Ferrer et al., 2008), kdy je výlev NE v kostní dřeni nízký (Maestroni et al., 1998), je tato hypotéza na první pohled konfliktní a chybná. Vysvětlením by mohla být prodleva mezi transkripcí a translací *Cxcl12*. Hladina *Cxcl12* mRNA je totiž na svém minimu již v ZT1 (Méndez-Ferrer et al., 2008). Tento mechanismus, tak jak byl výše popsán, je nezávislý na cirkadiánních hodinách stromálních buněk, nicméně budoucí výzkum může ukázat, že i ony se ho nepřímým způsobem účastní, například regulací exprese $\beta 3$ adrenergního receptoru. Tento mechanismus se s největší pravděpodobností podílí i na řízení migrace zralých leukocytů.

NE nepůsobí na leukocyty pouze zprostředkovaně, tak jak tomu bylo v předchozím případě, ale je schopný regulovat jejich aktivitu i přímou vazbou na β -adrenergní receptory na jejich membránách. Jsou jimi vybaveny například NK buňky (Whalen & Bankhurst, 1990), T lymfocyty a B lymfocyty (shrnuto v Sanders, 2012), makrofágy (Abrass et al., 1985), dendritické buňky (Goyarts et al., 2008) nebo neutrofilů (Nicholls et al., 2018). Na všechny tyto buněčné typy, s výjimkou B lymfocytů, působí NE imunosupresivně. V kapitole 6.2 již bylo zmíněno, že NE inhibuje u laboratorních potkanů produkci granzymu B a perforinu NK buňkami, čímž také inhibuje jejich cytotoxickou aktivitu. Dále potom NE u makrofágů, CD4+ a CD8+ T lymfocytů myší sleziny stimulované nádorovými buňkami výrazně snižuje expresi transmembránové formy TNF- α (Yu et al., 2010). U myších makrofágů stimulovaných LPS NE inhibuje produkci solubilního TNF- α (Hu et al., 1991). Dále potom NE působí na neutrofilů. V přítomnosti NE vykazují neutrofilů izolované z kostní dřene myši sníženou schopnost chemotaxe k bakteriemi vylučovanému chemoatraktantu fMLP (Nicholls et al., 2018). Dále u nich pozorujeme narušenou schopnost fagocytózy a pokles exprese řady prozánětlivých genů a genů účastnících se remodelace cytoskeletu, a tím pádem důležitých

pro migraci (Nicholls et al., 2018). Ve shodě s charakterem těchto účinků je fakt, že intenzivní nebo dlouhá námaha spojená s aktivací sympatiku vede u člověka k narušení schopnosti oxidativního vzplanutí neutrofilů (Robson et al., 1999). Fagocytickou aktivitu NE inhibuje také u makrofágů (Gosain et al., 2007). Buněčným typem, jehož aktivitu NE naopak stimuluje, jsou B lymfocyty, respektive plazmatické buňky (Pongratz et al., 2006). B lymfocyty izolované z myši sleziny a stimulované antigenem vykazují v přítomnosti NE zvýšenou míru sekrece IgE. Rovněž i koncentrace IgA ve slinách se zvyšuje působením NE (Wada et al., 2017). Protože hladina NE je ve slezině myši, jak už bylo uváděno, nejvyšší v ZT3, je možné, že i všechny jeho výše uvedené účinky zde touto dobou vrcholí. Pokud opomeneme regulační působení ostatních imunomodulátorů, znamenalo by to, že by ve světlé/neaktivní fázi docházelo u myši k imunosupresi a poklesu buněčné imunity, a naopak zvýšené aktivitě humorální imunity. Protizánětlivý a Th1 inhibující charakter působení NE můžeme pozorovat i u lidí, kde NE například snižuje celkovou sekreci IL-12 (Elenkov et al., 1996) nebo sekreci TNF- α a IL-6 dendritickými buňkami (Goyarts et al., 2008) (v obou případech v reakci na LPS).

7.3 Melatonin

Melatonin je klíčovou složkou cirkadiálního systému. K seřizování periferních oscilátorů přispívá tím, že se účastní řízení cyklu spánku a bdění (Tzischinsky et al., 1993), na základě kterého se za fyziologických podmínek ustanovuje i rytmus v příjmu potravy, známý synchronizátor periferních oscilátorů (Damiola et al., 2000). Struktury, v kterých byl zjištěn přímý synchronizační vliv melatoninu jsou SCN a pars tubularis (shrnuto v Stehle et al., 2003). O tom, zda melatonin zasahuje do cirkadiálních hodin leukocytů neexistují doklady, proto také o melatoninu nebylo pojednáváno v předchozí kapitole, víme ovšem o jeho mnohých účincích na tyto buňky. V této kapitole budou diskutovány především ty účinky melatoninu na leukocyty, které by potenciálně mohly souviset s rytmy, které tyto buňky vykazují. V kapitole 4.5 bylo uvedeno, že u neutrofilů laboratorních potkanů je schopnost fagocytózy ovlivněna denní dobou. Výzkum, který s tímto zjištěním přišel se zabýval také potenciálním vlivem melatoninu na rytmus fagocytózy. Potlačení tvorby melatoninu vlivem stálého osvětlení způsobilo celkové snížení schopnosti fagocytózy, nicméně její rytmus byl zachován (Hriscu, 2005). Skutečnost, že je míra fagocytózy nejvyšší v noci, kdy dochází k nárůstu hladiny melatoninu a také že při konstantním osvětlení dochází k poklesu fagocytózy naznačuje, že se melatonin účastní její regulace. Zda má melatonin vliv na

fagocytickou aktivitu lidských neutrofilů nevíme. Melatonin také reguluje produkci cytokinů. U lidských PBMCs zvyšuje melatonin produkci IL-6, IL-2 a IFN- γ . Produkci IL-6 přitom zvyšuje pouze u monocytů nikoliv Th lymfocytů. (Garcia-Mauriño et al., 1997). Melatonin rovněž stimuluje monocyty k sekreci IL-12 (García-Mauriño et al., 1999). Na produkci IL-4 vliv nemá (Garcia-Mauriño et al., 1997) a produkci IL-10 inhibuje (Kühlwein & Irwin, 2001) (v obou případech se jedná o výzkum na lidských PBMCs). Melatonin tedy u člověka vytváří tendenci k Th1 imunitě a je proto pravděpodobné, že se spolu s kortizolem podílí na utváření jejího denního rytmu. Stejný účinek má melatonin i u myši. Bylo zjištěno, že melatonin u myších splenocytů stimuluje sekreci IFN- γ (Colombo et al., 1992). Proto nejspíš také splenocyty izolované v noci produkují větší množství IFN- γ než splenocyty izolované ve dne (Colombo et al., 1992). Pokud tyto izolované splenocyty navíc vystavíme melatoninu, zjistíme, že na produkci IFN- γ buňkami izolovanými v noci má melatonin dvakrát vyšší stimulační efekt, než na produkci IFN- γ buňkami izolovanými ve dne (Colombo et al., 1992). Za tímto jevem by mohla stát například rytmická exprese melatoninového receptoru těmito buňkami.

Závěr

Cirkadiální hodiny řídí rytmickou migraci leukocytů. Migrace leukocytů do tkání je u denních i nočních živočichů nejvyšší na začátku aktivní fáze cyklu. U denních živočichů je to ráno, u nočních živočichů večer. Rytmus migrace do kostní dřeně je u člověka spjat s rytmem sekrece kortizolu. U myši je rytmus migrace do kostní dřeně kontrolován rytmickým tonem sympatiku v kostní dřeni. Rytmus migrace leukocytů do tkání vytváří rytmickou tendenci k prozánětlivému stavu. Cirkadiální hodiny regulují rovnováhu mezi buněčnou a humorální imunitní odpovědí. Ve dne přispívají k humorální odpovědi, v noci k buněčné odpovědi, a to jak u denních, tak nočních živočichů. U člověka (denní živočich) tento závěr vyvozujeme na základě denní rytmicity v poměru IFN- γ /IL10 v krvi. Tento rytmus u něj koreluje s rytmy melatoninu a kortizolu v krvi. Melatonin přispívá v noci k Th1 polarizaci. Kortizol přispívá ve dne k Th2 polarizaci. U myši (noční živočich) o této regulaci svědčí rytmus fagocytózy, cytotoxicity a exprese TLRs s vrcholem v noci a rytmus sekrece IgA a exprese FC ϵ RI s vrcholem ve dne. Na rytmu v poměru buněčné a humorální odpovědi se u myši podílí melatonin a NE. Melatonin přispívá v noci k Th1 polarizaci a stimuluje fagocytózu. NE ve dne inhibuje fagocytózu a cytotoxicitu a stimuluje sekreci IgA. Proteinové produkty hodinových genů mohou mít prozánětlivé nebo protizánětlivé účinky. BMAL1 má prozánětlivé účinky. Podporuje diferenciaci Th17 lymfocytů a expresi IL-12, CCL2 a TLR9.

REV-ERB α má protizánětlivé účinky. Inhibuje diferenciaci Th17 lymfocytů, expresi IL-6, IL-12, CCL2 a CCL5. PER2 má protizánětlivé i prozánětlivé účinky. Inhibuje expresi FC ϵ RI a stimuluje expresi IFN- γ , perforinu a granzymu B. CRY inhibuje sekreci IL-6 a TNF- α . Znalosti cirkadiálních rytmů leukocytů se dá potenciálně využít pro optimální načasování vakcinace a dárcovském odběru kmenových buněk z krve.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abrahamson, E. E. (2001). *Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections*. 916, 172–191.
- Abrass, C. K., O'Connor, S. W., Scarpace, P. J., & Abrass, I. B. (1985). Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.2307/1548990>
- Ajuwon, K. M., & Spurlock, M. E. (2005). Palmitate activates the NF- κ B transcription factor and induces IL-6 and TNF α expression in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/135.8.1841>
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1693-1703.2002>
- Albrecht, U. (2012). Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. In *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.006>
- Annunziato, F., Romagnani, C., & Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001>
- Arjona, A., Boyadjieva, N., & Sarkar, D. K. (2004). Circadian Rhythms of Granzyme B, Perforin, IFN- γ , and NK Cell Cytolytic Activity in the Spleen: Effects of Chronic Ethanol. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2811–2817. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2811>
- Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2005). Circadian Oscillations of Clock Genes, Cytolytic Factors, and Cytokines in Rat NK Cells. *The Journal of Immunology*, 174(12), 7618–7624. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7618>
- Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2006). Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20(5), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.10.002>
- Armstrong, S. M. (1989). Melatonin and circadian control in mammals. In *Experientia*. <https://doi.org/10.1007/BF01953050>
- Atger, F., Gobeta, C., Marquis, J., Martin, E., Wang, J., Weger, B., Lefebvre, G., Descombes, P., Naef, F., & Gachon, F. (2015). Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic mRNA transcription and translation in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), E6579–E6588. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515308112>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289(5488), 2344–2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>

- Bancos, I., Hazeldine, J., Chortis, V., Hampson, P., Taylor, A. E., Lord, J. M., & Arlt, W. (2017). Primary adrenal insufficiency is associated with impaired natural killer cell function: A potential link to increased mortality. *European Journal of Endocrinology*, *176*(4), 471–480. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0969>
- Barriga, C., Martín, M. I., Tabla, R., Ortega, E., & Rodríguez, A. B. (2001). Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: Effect of stress. *Journal of Pineal Research*, *30*(3), 180–187. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.300307.x>
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.161293498>
- Baumann, A., Gönnenwein, 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. <https://doi.org/10.1111/imm.12157>
- Baver, S. B., Pickard, G. E., Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06149.x>
- Besedovsky, L., Linz, B., Dimitrov, S., Groch, S., Born, J., & Lange, T. (2014). Cortisol increases CXCR4 expression but does not affect CD62L and CCR7 levels on specific T cell subsets in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *306*(11), 1322–1329. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00678.2013>
- Blackwell, T. S., & Christman, J. W. (1997). The Role of Nuclear Factor- κ B in Cytokine Gene Regulation. In *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.1.f132>
- Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., & Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.1101>
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., & Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. In *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>
- Bollinger, T., Leutz, A., Leliavski, A., Skrum, L., Kovac, J., Bonacina, L., Benedict, C., Lange, T., Westermann, J., Oster, H., & Solbach, W. (2011). Circadian clocks in mouse and human CD4⁺ T cells. *PLoS ONE*, *6*(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029801>
- Borjigin, J., Li, X., & Snyder, S. H. (1999). The pineal gland and melatonin: Molecular and pharmacologic regulation. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.53>
- Buijs, R. M., Hou, Y. -X, Shinn, S., & Renaud, L. P. (1994). Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.903400308>

- Campbell, J. D., Cho, Y., Foster, M. L., Kanzler, H., Kachura, M. A., Lum, J. A., Ratcliffe, M. J., Sathe, A., Leishman, A. J., Bahl, A., McHale, M., Coffman, R. L., & Hessel, E. M. (2009). CpG-containing immunostimulatory DNA sequences elicit TNF- α -dependent toxicity in rodents but not in humans. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI38294>
- Campbell, J. J., & Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Current Opinion in Immunology*, 12(3), 336–341. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00096-0)
- Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2009). *The regulation of central and peripheral circadian*. 10, 25–36.
- Chan, S., & Debono, M. (2010). *Replication of cortisol circadian rhythm : new advances in hydrocortisone replacement therapy*. 129–138. <https://doi.org/10.1177/2042018810380214>
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., & Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R. T., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L. W., Ditacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S., & Evans, R. M. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11048>
- Cissé, Y. M., Borniger, J. C., Lemanski, E., Walker, W. H., & Nelson, R. J. (2018). Time-Restricted Feeding Alters the Innate Immune Response to Bacterial Endotoxin. *The Journal of Immunology*, 200(2), 681–687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701136>
- Colombo, L. L., Chen, G. J., Lopez, M. C., & Watson, R. R. (1992). Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunology Letters*. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(92\)90035-M](https://doi.org/10.1016/0165-2478(92)90035-M)
- Corthésy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>
- Cyster, J. C. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2098>
- Cyster, J. G., & Schwab, S. R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. In *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075011>
- Czeisler, C. A., Duffy, J. F., Shanahan, T. L., Brown, E. N., Mitchell, J. F., Rimmer, D. W., Ronda, J. M., Silva, E. J., Allan, J. S., Emens, J. S., Dijk, D. J., & Kronauer, R. E. (1999). Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2177>
- Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>

- Dardente, H., Klosen, P., Caldelas, I., Pévet, P., & Masson-Pévet, M. (2002). Phenotype of Per1- and Per2-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent (*Arvicanthis ansorgei*): Comparison with a nocturnal species, the rat. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0609-9>
- de Vries, M. J., Cardozo, B. N., van der Want, J., de Wolf, A., & Meijer, J. H. (1993). Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91665-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91665-F)
- Demas, G. E., Drazen, D. L., Jasnow, A. M., Bartness, T. J., & Nelson, R. J. (2002). Sympathoadrenal system differentially affects photoperiodic changes in humoral immunity of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Neuroendocrinology*, *14*(1), 29–35. <https://doi.org/10.1046/j.0007-1331.2001.00736.x>
- Deurveilher, S., & Semba, K. (2005). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: Implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.030>
- Druzd, D., Matveeva, O., Ince, L., Harrison, U., He, W., Schmal, C., Herzel, H., Tsang, A. H., Kawakami, N., Leliavski, A., Uhl, O., Yao, L., Sander, L. E., Chen, C. S., Kraus, K., de Juan, A., Hergenhan, S. M., Ehlers, M., Koletzko, B., ... Scheiermann, C. (2017). Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.011>
- Eisenstein, E. M., & Williams, C. B. (2009). The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity. In *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e76c7>
- Elenkov, I. J., Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., & Chrousos, G. P. (1996). Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proceedings of the Association of American Physicians*.
- Ella, K., Mócsai, A., & Káldi, K. (2018). Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? In *European Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1111/eci.12965>
- Espinoza-Delgado, I., Bosco, M. C., Musso, T., Gusella, G. L., Longo, D. L., & Varesio, L. (1995). Interleukin-2 and human monocyte activation. In *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1002/jlb.57.1.13>
- Fleischer, J., Soeth, E., Reiling, N., Grage-Griebenow, E., Flad, H. D., & Ernst, M. (1996). Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-785.x>
- Franchimont, D., Galon, J., Gadina, M., Visconti, R., Zhou, Y.-J., Aringer, M., Frucht, D. M., Chrousos, G. P., & O'Shea, J. J. (2000). Inhibition of Th1 Immune Response by Glucocorticoids: Dexamethasone Selectively Inhibits IL-12-Induced Stat4 Phosphorylation in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.1768>
- Fukui, Y., Sudo, N., Yu, X. N., Nukina, H., Sogawa, H., & Kubo, C. (1997). The restraint

- stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. *Journal of Neuroimmunology*.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00126-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00126-4)
- García-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., & Guerrero, J. M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- García-Mauriño, S., Pozo, D., Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. (1999). Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00479-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00479-8)
- Gaultier, C., De Montis, G., Reinberg, A., & Motohashi, Y. (1987). Circadian rhythm of serum total immunoglobulin E (IgE) in asthmatic children. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>
- Gibbs, J. E., Blaikley, J., Beesley, S., Matthews, L., Simpson, K. D., Boyce, S. H., Farrow, S. N., Else, K. J., Singh, D., Ray, D. W., & Loudon, A. S. I. (2012). The nuclear receptor REV-ERBa mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 582–587.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1106750109>
- Gosain, A., Muthu, K., Gamelli, R. L., & DiPietro, L. A. (2007). Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2007.04.015>
- Gowans, J. L. (1959). The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006177>
- Goyarts, E., Matsui, M., Mammone, T., Bender, A. M., Wagner, J. A., Maes, D., & Granstein, R. D. (2008). Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. *Experimental Dermatology*, 17(3), 188–196.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00677.x>
- 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*. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>
- Gutierrez, D. A., & Rodewald, H. R. (2013). A sting in the tale of Th2 immunity. In *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.015>
- Halvaksz, J. (2016). Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Envirosociety.Org*, 113(21), 5134–5144. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-190769.The>

- Hao, H., Allen, D. L., & Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.17.7.3687>
- Harkness, J. A. L., Richter, M. B., Panayi, G. S., De Pette, K. Van, Unger, A., Pownall, R., & Geddawi, M. (1982). Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*.
<https://doi.org/10.1136/bmj.284.6315.551>
- Harriman, G. R., Kunimoto, D. Y., Elliott, J. F., Paetkau, V., & Strober, W. (1988). The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. In *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- He, W., Holtkamp, S., Hergenhan, S. M., Kraus, K., de Juan, A., Weber, J., Bradfield, P., Grenier, J. M. P., Pelletier, J., Druzd, D., Chen, C. S., Ince, L. M., Bierschenk, S., Pick, R., Sperandio, M., Aurrand-Lions, M., & Scheiermann, C. (2018). Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity*, *49*(6), 1175-1190.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.007>
- Henkart, P. A. (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. In *Annual review of immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.000335>
- Hopwood, T. W., Hall, S., Begley, N., Forman, R., Brown, S., Vonslow, R., Saer, B., Little, M. C., Murphy, E. A., Hurst, R. J., Ray, D. W., MacDonald, A. S., Brass, A., Bechtold, D. A., Gibbs, J. E., Loudon, A. S., & Else, K. J. (2018). The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22021-5>
- HRISCU, M. L. (2005). Modulatory Factors of Circadian Phagocytic Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1057*(1), 403–430.
<https://doi.org/10.1196/annals.1356.032>
- Hu, Xiaoxi, Goldmuntz, E. A., & Brosnan, C. F. (1991). The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation. *Journal of Neuroimmunology*, *31*(1), 35–42.
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90084-K](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90084-K)
- Hu, Xiaoyu, Li, W.-P., Meng, C., & Ivashkiv, L. B. (2003). Inhibition of IFN- γ Signaling by Glucocorticoids. *The Journal of Immunology*.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4833>
- Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5962>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>

- Iwakabe, K., Shimada, M., Ohta, A., Yahata, T., Ohmi, Y., Habu, S., & Nishimura, T. (1998). The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2- dominant immunity in mice. *Immunology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00021-2)
- Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E., & Murphy, K. M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.181.5.1755>
- Janssens, R., Struyf, S., & Proost, P. (2018). Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. In *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.004>
- Johansen, F. E., & Kaetzel, C. S. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: New advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. In *Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.37>
- Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Palm, I. F., Van Vliet, J. Der, Simonneaux, V., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2000). Melatonin sees the light: Blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00202.x>
- Kalsbeek, A., Verhagen, L. A. W., Schalij, I., Foppen, E., Saboureau, M., Bothorel, B., Buijs, R. M., & Pévet, P. (2008). Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06057.x>
- Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Rückert, B., Mantel, P. Y., Menz, G., Akdis, C. A., Blaser, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.014>
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., Kramer, A., & 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*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906361106>
- Kim, B., & Kim, T. H. (2018). Fundamental role of dendritic cells in inducing Th2 responses. In *Korean Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.227>
- Kinet, J. P. (1999). The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology. In *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.931>
- Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 338(6105), 349–354. <https://doi.org/10.1126/science.1226339>
- Kraft, S., Rana, S., Jouvin, M. H., & Kinet, J. P. (2004). The role of the FcεRI β-chain in allergic diseases. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135(1), 62–72. <https://doi.org/10.1159/000080231>

- Kühlwein, E., & Irwin, M. (2001). Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *Journal of Neuroimmunology*, *117*(1–2), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00325-3)
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4)
- Kusanagi, H., Hida, A., Satoh, K., Echizenya, M., Shimizu, T., Pendergast, J. S., Yamazaki, S., & Mishima, K. (2008). *Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells*. *61*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.012>
- Kusanagi, H., Mishima, K., Satoh, K., Echizenya, M., Katoh, T., & Shimizu, T. (2004). Similar profiles in human period1 gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.065>
- Lange, T., Dimitrov, S., & Born, J. (2010). Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1193*(1), 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x>
- 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*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00610-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00610-9)
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF- β . In *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.137>
- Logan, R. W., Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2011). Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.007>
- Losa García, J. E., Rodríguez, F. M., Martín De Cabo, M. R., García Salgado, M. J., Losada, J. P., Villarón, L. G., López, A. J., & Arellano, J. L. P. (1999). Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Mediators of Inflammation*, *8*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1080/09629359990711>
- Maestroni, G. J. M., Cosentino, M., Marino, F., Togni, M., Conti, A., Lecchini, S., & Frigo, G. (1998). Neural and endogenous catecholamines in the bone marrow. Circadian association of norepinephrine with hematopoiesis? *Experimental Hematology*.
- Martinez, J., Huang, X., & Yang, Y. (2008). Direct Action of Type I IFN on NK Cells Is Required for Their Activation in Response to Vaccinia Viral Infection In Vivo. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1592>
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control

- mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1086271>
- Maywood, E. S., Reddy, A. B., Wong, G. K. Y., O'Neill, J. S., O'Brien, J. A., McMahon, D. G., Harmar, A. J., Okamura, H., & Hastings, M. H. (2006). Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology*, *16*(6), 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.023>
- 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.
<https://doi.org/10.1038/nature06685>
- Meredith, A. L., Wiler, S. W., Miller, B. H., Takahashi, J. S., Fodor, A. A., Ruby, N. F., & Aldrich, R. W. (2006). BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nn1740>
- Mitsuaki HAYASHI, S. S. (2007). *Characterization of the Molecular Clock in Mouse Peritoneal*. *30*(April), 621–626.
- Moore, R. Y. (1996). Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60403-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60403-3)
- Moore, Robert Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, Robert Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.901460102>
- Moreno, S. E., Alfaya, T. M., Silva, S., Ferreira, S. H., & Liew, F. Y. (2006). Resistance to Polymicrobial Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture 1. *The Journal of Immunology*, *177*(32), 3218–3224.
- Morrison, D. C., & Ryan, J. L. (1987). Endotoxins and disease mechanisms. In *Annual review of medicine*. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.38.1.417>
- Morrison, S. J., Uchida, N., & Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000343>
- Nader, N., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2009). Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *The FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-117697>
- Nagahashi, M., Yamada, A., Aoyagi, T., Allegood, J., Wakai, T., Spiegel, S., & Takabe, K. (2016). Sphingosine-1-phosphate in the lymphatic fluid determined by novel methods. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00219>
- Nakamura, Y., Nakano, N., Ishimaru, K., Ando, N., Katoh, R., Suzuki-Inoue, K., Koyanagki, S., Ogawa, H., Okumura, K., Shibata, S., & Nakao, A. (2016). Inhibition of IgE-

- mediated allergic reactions by pharmacologically targeting the circadian clock. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 1226–1235.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.052>
- Nakamura, Y., Nakano, N., Ishimaru, K., Hara, M., Ikegami, T., Tahara, Y., Katoh, R., Ogawa, H., Okumura, K., Shibata, S., Nishiyama, C., & Nakao, A. (2014). Circadian regulation of allergic reactions by the mast cell clock in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.040>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209965109>
- Nguyen, K. D., Fentress, S. J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J. S., & Chawla, A. (2013). Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6Chi inflammatory monocytes. *Science*, 341(6153), 1483–1488. <https://doi.org/10.1126/science.1240636>
- Nicholls, A. J., Wen, S. W., Hall, P., Hickey, M. J., & Wong, C. H. Y. (2018). Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(2), 295–309. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0517-194RR>
- Onishi, H., Yamaguchi, S., Yagita, K., Ishida, Y., Dong, X., Kimura, H., Jing, Z., Ohara, H., & Okamura, H. (2002). *Rev-erb Alpha* Gene Expression in the Mouse Brain With Special Emphasis on its Circadian Profiles in the Suprachiasmatic Nucleus. 557, 551–557. <https://doi.org/10.1002/jnr.10226>
- Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J., & Yoshimoto, T. (2005). A Role for IL-27 in Early Regulation of Th1 Differentiation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2191>
- Parrelli, J. M., Meisler, N., & Cutroneo, K. R. (1998). Identification of a glucocorticoid response element in the human transforming growth factor beta 1 gene promoter. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(5), 623–627.
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00005-3)
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *European Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2003.03132.x>
- Petrovsky, N., & Harrison, L. C. (1997). Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(11), 5163–5168.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164932>
- Petrovsky, Nikolai, McNair, P., & Harrison, L. C. (1998). Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: Regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine*, 10(4), 307–312. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0289>
- Pezük, P., Mohawk, J. A., Wang, L. A., & Menaker, M. (2012). Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology*, 153(10), 4775–4783.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1486>

- Pongratz, G., McAlees, J. W., Conrad, D. H., Erbe, R. S., Haas, K. M., & Sanders, V. M. (2006). The Level of IgE Produced by a B Cell Is Regulated by Norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, *177*(5), 2926–2938. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2926>
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Ramírez, F., Fowell, D. J., Puklavec, M., Simmonds, S., & Mason, D. (1996). Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4⁺ T cells in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Redman, J., Armstrong, S., & Ng, K. T. (1983). Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.6823571>
- Rey, G., Cesbron, F., Rougemont, J., Reinke, H., Brunner, M., & Naef, F. (2011). Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000595>
- Robson, P. J., Blannin, A. K., Walsh, N. P., Castell, L. M., & Gleeson, M. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *International Journal of Sports Medicine*. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971106>
- Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*, *18*(6), 263–266. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80019-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80019-9)
- Russell, P., & Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by wee1⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90458-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90458-2)
- Sanders, V. M. (2012). The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet? *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.001>
- Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Takahashi, M., Izawa, T., Imaizumi, K., Taniguchi, N., Ohno, H., & Kizaki, T. (2014). A Circadian Clock Gene, Rev-erb α , Modulates the Inflammatory Function of Macrophages through the Negative Regulation of Ccl2 Expression. *The Journal of Immunology*, *192*(1), 407–417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301982>
- Schweingruber, N., Fischer, H. J., Fischer, L., Van Den Brandt, J., Karabinskaya, A., Labi, V., Villunger, A., Kretzschmar, B., Huppke, P., Simons, M., Tuckermann, J. P., Flügel, A., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2014). Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1248-4>
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., & Reppert, S. M. (1997). Two period homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80417-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80417-1)
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. In

Nature Reviews Immunology. <https://doi.org/10.1038/nri3070>

- Silver, A. C., Arjona, A., Hughes, M. E., Nitabach, M. N., & Fikrig, E. (2012). Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(3), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.10.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.017>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00579>
- Sly, D. J., Colvill, L., McKinley, M. J., & Oldfield, B. J. (1999). Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *Journal of the Autonomic Nervous System*. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(99\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(99)00031-4)
- Smans, L. C. C. J., Souverein, P. C., Leufkens, H. G. M., Hoepelman, A. I. M., & Zelissen, P. M. J. (2013). Increased use of antimicrobial agents and hospital admission for infections in patients with primary adrenal insufficiency: A cohort study. *European Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0879>
- Smith, A., Tyrrell, D., Coyle, K., Higgins, P., & Willman, J. (1988). Diurnal variation in the symptoms of colds and influenza. *Chronobiology International*. <https://doi.org/10.3109/07420528809067786>
- So, A. Y. L., Bernal, T. U., Pillsbury, M. L., Yamamoto, K. R., & Feldman, B. J. (2009). Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(41), 17582–17587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909733106>
- Soeder, K. J., Snedden, S. K., Cao, W., Della Rocca, G. J., Daniel, K. W., Luttrell, L. M., & Collins, S. (1999). The β 3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a G(i)-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.12017>
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
- Sothorn, R. B., Roitman-Johnson, B., Kanabrocki, E. L., Yager, J. G., Roodell, M. M., Weatherbee, J. A., Young, M. R. I., Nemchausky, B. M., & Scheving, L. E. (1995). Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *95*(5), 1029–1035. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(95\)70104-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(95)70104-4)
- Stehle, J. H., Gall, Ñ. C. Von, & Korf, H. Ñ. (2003). *Melatonin : A Clock-Output , A Clock-Input*. *15*, 383–389.
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*.

<https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>

- Stratmann, M., & Schibler, U. (2006). Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(6), 494–506. <https://doi.org/10.1177/0748730406293889>
- Takata, M., Burioka, N., Ohdo, S., Takane, H., Terazono, H., Miyata, M., Sako, T., Suyama, H., Fukuoka, Y., Tomita, K., & Shimizu, E. (2002). Daily expression of mRNAs for the mammalian clock genes *Per2* and *Clock* in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells. *Japanese Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1254/jjp.90.263>
- Tan, P., Anasetti, C., Hansen, J. A., Melrose, J., Brunvand, M., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., & Linsley, P. S. (1993). Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.177.1.165>
- Teboul, M., Barrat-Petit, M. A., Li, X. M., Claustrat, B., Formento, J. L., Delaunay, F., Lévi, F., & Milano, G. (2005). Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(9), 693–699. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0697-6>
- Torra, I. P., Tsubulsky, V., Delaunay, F., Saladin, R., Laudet, V., Fruchart, J. C., Kosykh, V., & Staels, B. (2000). Circadian and glucocorticoid regulation of *Rev-erb α* expression in liver. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7708>
- Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M. P., Safi, R., Takahashi, J. S., Delaunay, F., & Laudet, V. (2004). The orphan receptor *Rev-erb α* gene is a target of the circadian clock pacemaker. *Journal of Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01554>
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, *53*(4), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- Tzischinsky, O., Shlitner, A., & Lavie, P. (1993). The Association between the Nocturnal Sleep Gate and Nocturnal Onset of Urinary 6-Sulfatoxymelatonin. *Journal of Biological Rhythms*. <https://doi.org/10.1177/074873049300800303>
- Veneri, M. A., Hasenmajer, V., Fiore, D., Sbardella, E., Pofi, R., Graziadio, C., Gianfrilli, D., Pivonello, C., Negri, M., Naro, F., Grossman, A. B., Lenzi, A., Pivonello, R., & Isidori, A. M. (2018). Circadian rhythm of glucocorticoid administration entrains clock genes in immune cells: A DREAM trial ancillary study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*(8), 1–15. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00346>
- Vrang, N., Larsen, P. J., & Mikkelsen, J. D. (1995). Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin tract tracing. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00425-P](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00425-P)
- Vujović, N., Davidson, A. J., & Menaker, M. (2008). Sympathetic input modulates, but does

- not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2007>
- Wada, M., Orihara, K., Kamagata, M., Hama, K., Sasaki, H., Haraguchi, A., Miyakawa, H., Nakao, A., & Shibata, S. (2017). Circadian clock-dependent increase in salivary IgA secretion modulated by sympathetic receptor activation in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09438-0>
- Warren, W. S., Champney, T. H., & Cassone, V. M. (1994). The suprachiasmatic nucleus controls the circadian rhythm of heart rate via the sympathetic nervous system. *Physiology and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90392-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90392-1)
- Wedemeyer, J., Tsai, M., & Galli, S. J. (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. In *Current Opinion in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00154-0)
- Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2010). The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6413–6419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001829>
- Whalen, M. M., & Bankhurst, A. D. (1990). Effects of β -adrenergic receptor activation, cholera toxin and forskolin on human natural killer cell function. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj2720327>
- Wu, C., Xue, Y., Wang, P., Lin, L., Liu, Q., Li, N., Xu, J., & Cao, X. (2014). IFN- γ Primes Macrophage Activation by Increasing Phosphatase and Tensin Homolog via Downregulation of miR-3473b. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302379>
- Xia, T., Cui, Y., Chu, S., Ma, Z., & Gu, X. (2015). Murine clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei and peripheral blood mononuclear cells during the daily sleep-wake rhythm and after isoflurane anesthesia. *Sleep and Biological Rhythms*. <https://doi.org/10.1111/sbr.12126>
- Yamaguchi, M., Hirai, K., Komiya, A., Miyamasu, M., Furumoto, Y., Teshima, R., Ohta, K., Morita, Y., Galli, S. J., Ra, C., & Yamamoto, K. (2001). Regulation of mouse mast cell surface Fc ϵ RI expression by dexamethasone. *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.7.843>
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamine, T., & Takumi, T. (2005). Acute physical stress elevates mouse Period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42036–42043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509600200>
- Yang, Y., Xiang, Z., Ertl, H. C. J., & Wilson, J. M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon γ is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7257>

- Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., & Yoshie, O. (1998). Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.7118>
- Yu, J., Heller, G., Chewning, J., Kim, S., Yokoyama, W. M., & Hsu, K. C. (2010). Norepinephrine-Mediated Inhibition of Antitumor Cytotoxic T Lymphocyte Generation Involves a β -Adrenergic Receptor Mechanism and Decreased TNF- α Gene Expression. *The Journal of Immunology*.
- Yu, X., Rollins, D., Ruhn, K. A., Stubblefield, J. J., Green, C. B., Kashiwada, M., Rothman, P. B., Takahashi, J. S., & Hooper, L. V. (2014). *NIH Public Access*. 342(6159), 727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1243884.Th17>