

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie

Studijní obor:
Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Karel Tejkal

Úloha glukokortikoidů v cirkadiánním systému

The role of glucocorticoids in circadian system

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze dne

Podpis:

Děkuji své školitelce, PharmDr. Aleně Sumové, DSc., za odborné vedení diplomové práce a konzultace. Dále děkuji Mgr. Martinu Sládkovi, PhD. a všem členům oddělení Neurohumorálních regulací FgÚ AV ČR za přijetí do kolektivu, ochotu a pomoc při práci.

ABSTRAKT

Glukokortikoidy jsou savčí hormony steroidní povahy sekretované z nadledvin. Jejich hladina v organismu se vyznačuje denním rytmem s maximem na počátku aktivní periody organismu a minimem na jejím konci. Glukokortikoidy ovlivňují množství pochodů organismu a jejich sekrece je přesně regulována. Tato regulace je závislá mimo jiné na cirkadiánním systému, který dále pomocí glukokortikoidů seřizuje periferní tkáně organismu indukováním rytmické genové exprese. Mechanismus účinku glukokortikoidů na hodinový systém savců však doposud nebyl přesně definován, především co se týká rozdílného vlivu glukokortikoidů na genovou expresi v jednotlivých tkáních a dynamiky obsazení glukokortikoidních receptorů (GR). Tato práce se zabývá vlivem absence glukokortikoidní signalizace vyvolané pomocí adrenalectomie na expresi hodinových genů v centrálních hodinách suprachiasmatických jader a v periferních hodinách v hipokampu a distálním kolonu. Efekt adrenalectomie na genovou expresi vybraných genů v hipokampu je dále porovnán s efektem omezení doby příjmu potravy, který taktéž ovlivňuje hladinu kortikoidů v těle. Další experimenty byly zaměřeny na zjištění vlivu změn aktivity GR na expresi vybraných genů pomocí syntetického antagonisty GR *in vitro*. Výsledky získané těmito experimenty potvrzují existenci periferních hodin v hipokampální oblasti, včetně jednotlivých částí hipokampu, a ukazují existenci tkáňové specifičnosti účinku glukokortikoidů na savčí organismus.

Klíčová slova: glukokortikoidy, hipokampus, cirkadiánní rytmy, hodinové geny, glukokortikoidní receptor

ABSTRACT

Glucocorticoids are mammalian steroid hormones secreted from the adrenal gland. The basal levels of glucocorticoids show a pronounced diurnal rhythm with maximum at the beginning of the active period and minimum at its end. Glucocorticoids have an influence over a variety of metabolic functions and their secretion is tightly regulated. This regulation also depends on the circadian system, which utilizes glucocorticoids to entrain the peripheral tissues by inducing rhythmic gene expression. The mechanisms by which glucocorticoids influence mammalian circadian system has not yet been precisely defined, especially concerning the influence of glucocorticoid signalling on gene expression in different tissues and the dynamics of glucocorticoid receptor (GR) occupancy. This thesis studies the influence of ablation of glucocorticoid signalization induced by adrenalectomy on the clock gene expression of in the central clock in the suprachiasmatic nucleus and peripheral clocks in the hippocampus and distal colon. The effect of adrenalectomy on gene expression is compared with the effect of restricting the feeding time, which has also been shown to affect glucocorticoid levels in the body. Other experiments were aimed at elucidating impact of changing the activity of GR on gene expression using synthetic GR antagonist *in vitro*. The results obtained by these experiments confirm the existence of peripheral clocks in the hippocampus including its individual parts and show the existence of tissue specificity of glucocorticoids on mammals.

Keywords: glucocorticoids, hippocampus, circadian rhythms, clock genes, glucocorticoid receptor

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Přehled literatury.....	10
2.1 Biologické rytmy.....	10
2.1.1 Cirkadiální hodiny.....	10
2.1.2 Lokalizace a hierarchie savčího cirkadiálního systému.....	11
2.1.3 Centrální hodiny.....	11
2.1.4 Molekulární složení cirkadiálních hodin.....	13
2.1.5 Seřizování centrálních hodin.....	17
2.1.6 Periferní hodiny.....	18
2.1.7 Seřizování periferních hodin.....	18
2.2 Glukokortikoidy.....	19
2.2.1 Syntéza glukokortikoidů.....	19
2.2.2 Regulace sekrece glukokortikoidů.....	20
2.2.3 Mechanismus účinku glukokortikoidů.....	24
2.2.4 Vliv glukokortikoidů na biologické hodiny.....	25
2.3 Hipokampus.....	26
3. Cíle diplomové práce.....	28
4. Materiál a metody.....	29
4.1 Chov pokusných zvířat.....	29
4.2 Uspořádání jednotlivých pokusů.....	29
4.2.1 Detekce denních profilů exprese hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu.....	29
4.2.2 Vliv ADX na rytmickou expresi hodinových genů v SCN, hipokampu a distálním kolonu dospělých potkanů kmene Wistar.....	30
4.2.3 Vliv režimu RF na rytmickou expresi hodinových genů v SCN a hipokampu dospělých potkanů kmene Wistar.....	31
4.2.4 Ověření přítomnosti GR v SW620/NIH3T3.....	31
4.2.5 Vliv aktivity GR na cirkadiální rytmicitu u SW620 a NIH3T3.....	32
4.2.6 Vliv aktivity GR na expresi hodinových genů u SW620.....	33
4.3 Postup stanovení hladin mRNA hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erba a Bmal1 pomocí metody hybridizace in situ.....	35
4.3.1 Adrenalektomie pokusných zvířat.....	35
4.3.2 Příprava tkáňových řezů.....	36
4.3.3 Stanovení exprese hodinových genů pomocí hybridizace in situ.....	36
4.4 Sledování real-time Bmal1/Per2-luc reportérového systému v luminometru.....	47
4.4.1 Kultivace a pasážování buněčných kultur.....	47
4.5 Postup stanovení hladin mRNA hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erba a Bmal1 a hodinami kontrolovaných genů HLF a TEF pomocí metody RT-qPCR.....	50
4.5.1 Izolace celkové RNA z buněčné kultury.....	52
4.5.2 Syntéza cDNA.....	54
4.5.3 PCR.....	55
4.6 Statistická analýza.....	56
5. Výsledky.....	57

5.1 Denní profily exprese hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α a Bmal1 v oblastech CA1, CA3 a DG hipokampu kontrolních zvířat.....	57
5.1.1 Per1 mRNA.....	57
5.1.2 Per2 mRNA.....	57
5.1.3 Rev-Erb α mRNA.....	58
5.1.4 Bmal1 mRNA.....	58
5.2 Denní profily exprese hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α a Bmal1 v SCN a hipokampu ADX a SHAM potkanů.....	60
5.2.1 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v SCN.....	60
5.2.2 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v CA1, CA3 a DG hipokampu.....	62
5.3 Denní profily exprese hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α a Bmal1 v distálním kolonu ADX a SHAM potkanů.....	71
5.3.1 Per1 mRNA.....	71
5.3.2 Per2 mRNA.....	71
5.3.3 Rev-Erb α mRNA.....	71
5.3.4 Bmal1 mRNA.....	72
5.4 Denní profily exprese hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α a Bmal1 v SCN a hipokampu potkanů vystavených režimu RF.....	74
5.4.1 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v SCN.....	74
5.4.2 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v CA1, CA3 a DG hipokampu.....	75
5.5 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy u SW620 sledovaný pomocí snímání luminiscence reportéru Bmal1-luc.....	80
5.6 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy u NIH3T3 sledovaný pomocí snímání luminiscence reportéru Per2-luc.....	82
5.7 Profily in vitro exprese genů Per1, Per2, Rev-Erb α , Bmal1, TEF a HLF v buněčné linii SW620.....	85
5.7.1 Per1 mRNA.....	85
5.7.2 Per2 mRNA.....	86
5.7.3 Rev-Erb α mRNA.....	86
5.7.4 Bmal1 mRNA.....	87
5.7.5 TEF mRNA.....	88
5.7.6 HLF mRNA.....	89
6. Diskuze.....	91
6.1 Přítomnost rytmu v expresi hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu.....	91
6.2 Vliv ADX a vystavení režimu RF na expresi hodinových genů v SCN a hipokampu.....	91
6.3 Vliv ADX na expresi hodinových genů v distálním kolonu.....	94
6.4 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy buněčných linií SW620 a NIH3T3.....	95
7. Souhrn.....	100
8. Seznam použité literatury.....	101

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ACTHR	receptor pro adrenokortikotropní hormon
ADX	adrenalektomie
AL	<i>ad libitum</i> , dle libosti
AMPK	adenosin-monofosfát aktivovaná protein kináza
AVP	arginin vasopresin
BAC	bacterial artificial chromosome – umělý bakteriální chromozom
<i>Bmal1</i> , BMAL1	brain and muscle Arnt-like protein 1
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix-PAS rodina transkripčních faktorů
BSA	bovine serum albumine, hovězí sérový albumin
CA1-4	cornu ammonis 1-4
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CK1D, E	kasein kináza 1D, E
<i>Clock</i> , CLOCK	circadian locomotor output cycle kaput
CREB	Ca ²⁺ /cAMP response element binding protein
CRH	corticotropin-releasing hormone – hormon uvolňující kortikotropin
<i>Cry1/2</i> , CRY1/2	Cryptochrome
CS	Cushingův syndrom
CT	circadian time, cirkadiánní čas
DBP	D-site binding protein
DEPC	diethylpyrokarbonát
DEX, D (skupina)	dexamethason
DG	gyrus dentatus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamtetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
FAA	food anticipatory activity
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
FEO	food entrainable oscillator
FgÚ AV ČR	Fyziologický ústav Akademie věd České Republiky
FXBL3	F-box/LRR-repeat protein 3
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GBS	glucocorticoid binding site, vazebné místo pro glukokortikoidní receptor
GR	glukokortikoidní receptor
GHT	genikulohypothalamický trakt
GRP	gastrin releasing peptide – peptid uvolňující gastrin
HAT	histonacetyltransferáza
HP	hybridizační pufr
HPA	hythalamo-hypofýzo-nadledvinová (osa)
HSF1	heat shock faktor 1 – faktor teplotního šoku 1
Hsp90	heat shock protein 90 – protein teplotního šoku 90
IC	isoamylalkohol
IGL	intergenikulární list
IML	intramediolaterální oblouk
ipRGC	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
LC	locus coeruleus
LD	light-dark – světlo-tma (režim)
<i>Luc</i>	luciferáza
LTP	long term potentiation – dlouhodobá potenciace

MR	mineralokortikoidní receptor
MRTF	myocardin-related transcription factor-B – transkripční faktor B příbuzný myokardinu
NaPPi	pyrofosforečnan sodný
OD	optická denzita
P450scc	cholesterol side chain cleavage enzyme – enzym štěpící řetězce cholesterolu
PACAP	pituitary adenylase cyclase-activating polypeptide – polypeptid hypofýzy aktivující adenylcyklázu
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
<i>Per1/2,3</i> , PER1/2/3	period
PKA	protein kináza A
PP1/5	protein fosfatáza 1/5
PIC	fenolchloroform isoamylalkohol
PVN	paraventriculární hypothalamus
R	inhibitor (Ru486)
RF	restricted feeding, omezení doby příjmu potravy
RHT	retinohypothalamický trakt
RORE	retinoic orphan nuclear receptor element
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RU486	mifepriston
SCN	suprachiasmatické jádro
SDS	sodium dodecyl sulphate, dodecylsírán sodný
SRF	serum-response factor
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
tau	vnitřní perioda
TCA	trichloroctová kyselina
TEA	triethanolamin
TRIS	tri(hydroxymethyl)aminoetan
TSS	transcription start site – místo počátku transkripce
V	vehikulum
<i>Vip</i> , VIP	vasoaktivní intestinální peptid
<i>Vipr2</i>	gen kódující receptor pro VIP
VPAC2	receptor kódovaný genem <i>Vipr2</i>
ZF	zona fasciculata
ZG	zona glomerulosa
ZR	zona reticularis

1. Úvod

Biologické hodiny jsou mechanismus, který organismům na této planetě umožňuje přizpůsobit se periodicky se opakujícím dějům. Cirkadiánními hodinami nazýváme takové hodiny, které se adaptovaly na 24 hodinovou periodu střídání dne a noci. Jsou založeny na sebeudržujících oscilacích genové exprese takzvaných hodinových genů a jsou dodatečně seřizovány světelnými podmínkami okolí a dalšími podněty. U savců jsou tyto hodiny hierarchicky organizovány na centrální hodiny, lokalizované v suprachiasmatických jádrech hypothalamu, a periferní hodiny, obsažené ve tkáních a orgánech.

Centrální a periferní hodiny savců účinkují jako systém, který organismu umožňuje předvídat a adaptovat se na cyklus střídání dne a noci. Centrální hodiny komunikují s periferními za použití jak neuronálních, tak humorálních signálů. Jeden z důležitých signálů endokrinní povahy, zajišťující koordinaci aktivity a metabolismu podle cirkadiánní periody, je sekrece glukokortikoidů.

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony nadledvin vyznačující se velkým množstvím účinků na organismus v oblasti metabolismu, funkce imunitního systému a dalších oblastí. Jejich přirozená sekrece je regulována několika mechanismy souvisejícími jak s denní dobou, tak se stresem. Hladina glukokortikoidů v organismu vykazuje cirkadiánní rytmus detekovatelný v průběhu dne. Nadprodukce či nedostatečná produkce glukokortikoidů se u člověka pojí s řadou chorob a syndromů, mezi něž patří např. Cushingův syndrom či syndrom chronické únavy.

Úloha glukokortikoidů v cirkadiánním systému organismu je stále zkoumána a vzhledem k důležitosti těchto hormonů pro zdraví i život organismu mohou nové znalosti v tomto směru přinést cenné poznatky pro další výzkum i medicínské využití.

2. Přehled literatury

2.1 Biologické rytmy

Vzhledem k existenci mnoha cyklických jevů na planetě Zemi (např. střídání dne a noci, přílivu a odlivu apod.) se napříč všemi druhy organismů vyvinul mechanismus, které jim umožnil předvídat a přizpůsobit se těmto cyklům na genové i behaviorální úrovni. Takto integrované mechanismy jim umožnily získat evoluční výhodu oproti konkurenci a postupně ji naprosto eliminovat. Tyto mechanismy nazýváme souhrnně „biologické hodiny“ a rytmy, které tyto hodiny kontrolují, můžeme dále rozdělit do tří odlišných skupin (Vitaterna et al. 2001).

První skupinou jsou rytmy ultradiánní, tedy rytmy s periodou podstatně kratší než 24 hodin. V organismu je můžeme pozorovat například při sledování srdeční tepové frekvence. Druhou skupinou pak rytmy cirkadiánní, jejichž perioda má délku přibližně 24 hodin. Příkladem cirkadiánních rytmů je cyklus bdění a spánku či rytmus sekrece některých hormonů. Poslední skupinou jsou rytmy infradiánní s periodou výrazně přesahující 24 hodin, kam patří například estrální cyklus (Vitaterna et al. 2001).

2.1.1 Cirkadiánní hodiny

Cirkadiánní hodiny umožňují organismům přizpůsobit svou aktivitu a metabolismus měnícím se podmínkám během 24 hodinového cyklu dne. Cirkadiánní hodiny se vyskytují téměř u všech organismů na planetě s možnou výjimkou zvířat žijících v polárních oblastech (Lu et al. 2010) a organismů adaptovaných na život ve stálé tmě (Friedrich, 2013). Nejjednodušší cirkadiánní hodiny byly zatím objeveny v cyanobakteriích a přestože jsou složeny z pouhých tří proteinů, jsou schopny oscilovat s periodou blízkou se 24 hodinám (Nakajima et al. 2005).

Cirkadiánní rytmy poháněné cirkadiánními hodinami nejsou závislé na střídání světla a tmy a v konstantních podmínkách stále běží s endogenní periodou τ (tau).

Tato perioda se blíží 24 hodinám a je pro každý druh poměrně specifická, i když podléhá jisté vnitrodruhové variabilitě. Tato variabilita u člověka souvisí s časným a pozdním chronotypem (Roenneberg 2003).

2.1.2 Lokalizace a hierarchie savčího cirkadiálního systému

Ústřední oscilátor („master clock“) savčího cirkadiálního systému je lokalizovaný v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu nad optickým chiasmatem po obou stranách třetí komory mozkové (Ralph et al. 1990) (Obr. 1).

Centrální hodiny v SCN jsou jako jediné synchronizovány světlem prostřednictvím sítnice (Berson 2003) a tím udržují v podmínkách střídání dne a noci periodu o délce 24 hodin. Tento rytmický signál dále synchronizuje metabolickou a behaviorální aktivitu organismu (Stephan a Zucker 1972, Moore a Eichler 1972) prostřednictvím dalších oscilátorů v periferních tkáních (Yagita et al. 2001), které jsou podle centrálních hodin seřizovány s denní dobou (Yamazaki et al. 2000).

O pozici SCN jako centrálních hodin organismu svědčí fakt, že transplantace SCN křečka příjemci s lézí těchto jader obnovila cirkadiální rytmus jeho pohybové aktivity (Lehman et al. 1987). Po transplantaci SCN závisí délka periody τ na periodě dárce, a příjemce tuto periodu převezme (Ralph et al. 1990). Předávání informací z SCN do dalších tkání je kromě nervových drah zajišťováno i humorálně. Transplantace SCN částečně obnovila rytmicitu příjemce s lézí SCN, patrně díky obnovení parakrinní signalizace z nově transplantovaného SCN (Meyer-Bernstein et al. 1999).

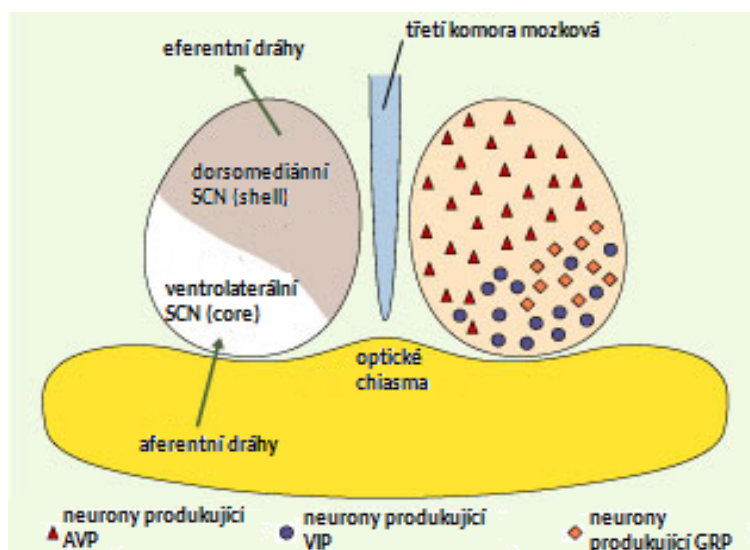
2.1.3 Centrální hodiny

Suprachiasmatická jádra se skládají ze dvou hlavních podoblastí, a to ventrolaterálního jádra (core) a dorsomediálního obalu (shell) (Moore 1983). Core SCN díky umístění blízko optickému chiasmatu přijímá signály ze sítnice a dále je předává do oblasti shell. Každá jednotlivá buňka v SCN je schopná generovat a udržet vlastní cirkadiální rytmus a tedy fungovat jako oscilátor (Welsh et al. 1995) Buňky v SCN jsou spolu propojeny pomocí synaptických spojů a akčních potenciálů

(Yamaguchi et al. 2003). Po oddělení core a shell SCN vykazují oscilace v shell oblasti kratší periodu než oscilace celého SCN či samotné core oblasti. Vzhledem k tomuto faktu a převažujícímu propojení vedoucímu z core do shell oblasti (zatímco projekcí z shell do core oblasti je podstatně méně) se předpokládá, že oscilátory v shell SCN jsou synchronizované spoji z core (Leak 1999).

Oblasti v SCN vzájemně komunikují pomocí neurotransmiterů. Neurony core oblasti produkují především vazoaktivní intestinální peptid (VIP) a polypeptid uvolňující gastrin (GRP), neurony shell oblasti pak produkují arginin vasopresin (AVP) (Obr. 1). Pro obě oblasti je společná produkce kyseliny gama-aminomáselné (GABA) (Abrahamson a Moore, 2001).

Právě signalizace pomocí VIP má zřejmě značnou roli v zachování synchronní rytmicity neuronů SCN. Myši mutantní v genech *Vip* či *Vipr2* (kódující VIP receptor VPAC2) ztratily rytmicitu exprese v některých hodinových genech a AVP a měly narušenou pohybovou aktivitu (Colwell et al. 2003, Harmar et al. 2002).



Obrázek 1.: Strukturní rozložení SCN a jeho lokalizace vzhledem k optickému chiasma a třetí komoře mozkové. Neurony shell SCN produkují AVP, zatímco neurony core produkují VIP a GRP. (převzato a upraveno podle Dardente a Cermakian 2005)

2.1.4 Molekulární složení cirkadiálních hodin

Mechanismus savčích cirkadiálních hodin je založen na transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách složených z několika hodinových genů a jejich proteinových produktů. Základní mechanismus je pro všechny buňky organismu v podstatě stejný. Zmíněné smyčky své oscilace samy udržují díky zpětnému působení proteinových produktů regulujících expresi jednotlivých hodinových genů během 24 hodinového cyklu (Darlington et al. 1998, Shearman et al. 2000).

Geny, tvořící součást základní smyčky savčích molekulárních hodin nesou označení *Clock* (circadian locomotor output genes kaput), *Bmal1* (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like), *Per1/Per2/Per3* (Period) a *Cry1/2* (Cryptochrome).

Aktivní část smyčky tvoří proteiny CLOCK a BMAL1, které patří do rodiny bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PAS) transkripčních faktorů. Tyto dva proteiny společně tvoří heterodimery za reciprokých interakcí N-terminální bHLH domény a tandemových PAS-A a PAS-B domén (Huang et al. 2012). V případě mutací genů kódujících tyto proteiny může dojít ke změnám cirkadiální periody organismů. Experimenty *in vivo* ukázaly, že u myši s mutací genu *Clock* dochází při sledování aktivity k prodloužení endogenní periody, která je po přidání BAC (umělý bakteriální chromozom) exprimujícího wild-type *Clock* obnovena. Přidání BAC do wild-type myši vedoucí k nadměrné expresi genu *periodu* naopak zkrátila (Antoch et al. 1997). CLOCK protein vykazuje histonacetyltransferázovou (HAT) aktivitu, která je typická pro transkripční faktory podílející se na remodelaci chromatinu a aktivaci genové exprese (Doi et al. 2006). CLOCK protein také acetyluje protein BMAL1, což umožňuje interakci proteinu CRY1 s CLOCK/BMAL1 heterodimerem a následnou represí genové exprese (Hirayama et al. 2007). V SCN nebyla na transkripční ani translační úrovni exprese genu *Clock* identifikována jako cirkadiální (Lee et al. 2001), ovšem jaderná lokalizace proteinu CLOCK je závislá na rytmicky exprimovaném proteinu BMAL1 (Kondratov et al. 2003).

V jádře se heterodimery CLOCK/BMAL1 váží pomocí svých bHLH domén na E-box elementy v promotorech cílových genů, mezi které patří geny *Per1/2/3* a *Cry1/2*, a aktivují jejich transkripci (Gekakis et al. 1998, Kume et al. 1999). V cytoplasmě spolu tvoří proteiny PER a CRY heterodimery a translokují do jádra, kde díky interakci s dimery CLOCK/BMAL1 inhibují vlastní transkripci (Shearman et al. 2000). Hlavní roli v této inhibici hraje protein CRY, který je sám schopen přerušit CLOCK/BMAL1 zprostředkovanou transkripci na E-boxech (Kume et al. 1999 Chaves et al. 2006), Dimery proteinů PER/CRY postupně zanikají po ubiquitinaci a degradaci CRY proteinů (Busino et al. 2007), čímž je uvolněna represe genů *Clock* a *Bmal1* a začíná další cyklus. (Obr. 2)

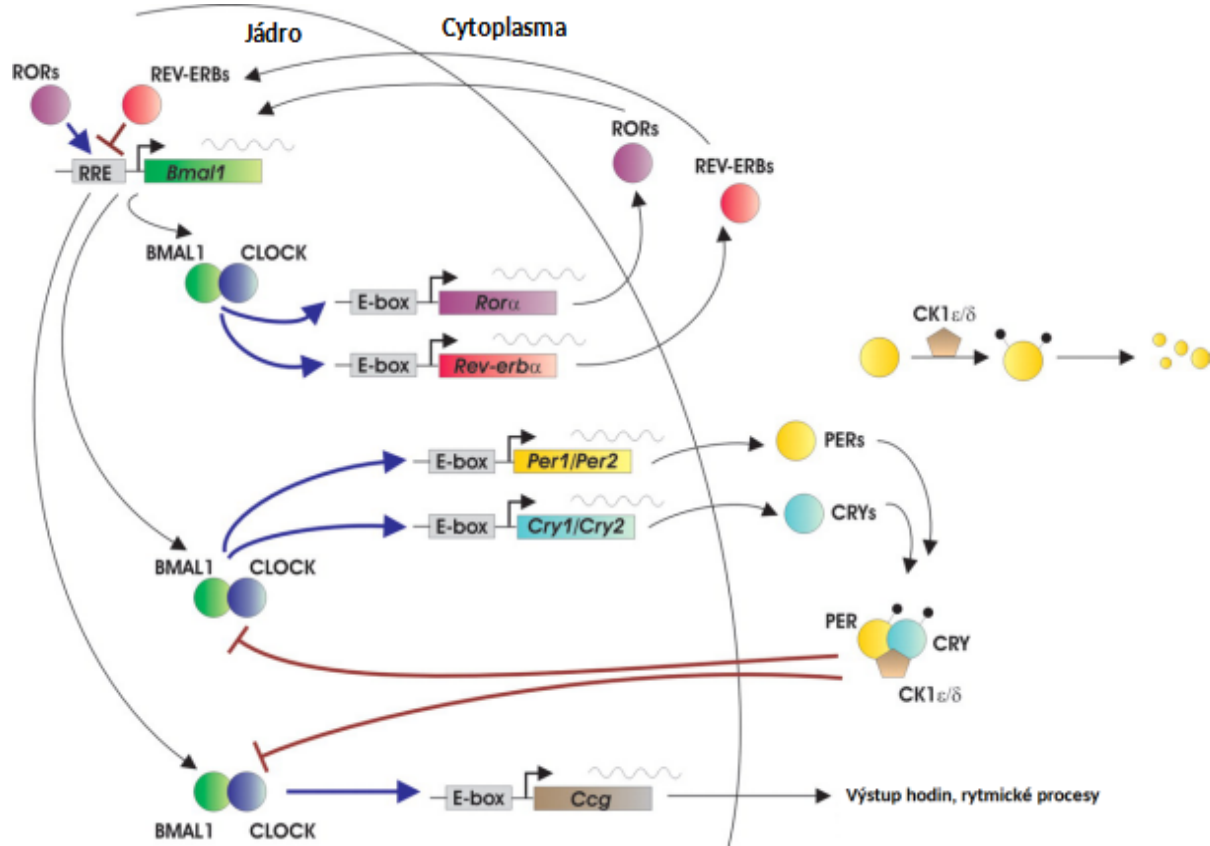
Další smyčka je schopna regulovat transkripci *Bmal1* a tak dále kontrolovat přítomnost CLOCK/BMAL1 dimeru v buňce díky genům *Rev-Erba* a *RORA*, jejichž promotory obsahují E-box a tyto proteiny spolu dále kompetují o vazbu na RORE (retinoic orphan nuclear receptor element), který se nachází v promotoru genu *Bmal1*. Protein REV-ERB α vázaný na RORE elementu reprimuje transkripci *Bmal1*, RORA ji aktivuje (Guillaumaund et al. 2005).

Perioda oscilací smyčky je dále regulována pomocí posttranslačních modifikací. Dobře známá je v tomto ohledu role proteinů casein kinase 1 ϵ /1 δ (CKI ϵ /CKI δ), protein fosfatáz 1/5 (PP1/PP5), F-box/LRR-repeat protein 3 (FBXL3) a adenosin-monofosfát aktivované protein kinázy (AMPK). CKI1 ϵ fosforyluje proteiny BMAL1, PER a CRY a mutace v jejím genu se vyznačuje zkrácenou periodou organismu (Lowrey et al. 2000). Fosforylace proteinu PER pomocí CKI ϵ kináz blokuje jeho translokaci do jádra maskováním jaderného lokalizačního signálu a tím zabraňuje tvorbě dimerů PER/CRY v jádře (Vielhaber et al. 2000) či podporuje jejich ubiquitinaci (Knippschild et al. 2005). Transport proteinu PER do jádra je také regulován pomocí protein fosfatáz, které buď v případě PP1 působí antagonisticky k CKI proteinům a defosforylují PER (Lee et al. 2011), či jako PP5 defosforylují CKI ϵ a tím prodlužují dobu její aktivity (Partch et al. 2006). FBXL3 je protein, který je součástí E3 ubiquitin ligázového proteinu, který degraduje protein CRY1 a jeho mutace vede k prodloužení periody u cirkadiálních mutantů známých jako Overtime/Afterhours na

přibližně 26 hodin, jelikož stabilizovaný protein CRY je schopen déle udržovat represi aktivační části hodin (Siepka et al. 2007, Godinho et al. 2007).

Periferní hodiny organismu jsou seřizovány pomocí dostupnosti potravy, v čemž může hrát roli AMPK, která je citlivá na stav živin v organismu (Hardie 2007). Stimulace AMPK destabilizuje CRY fosforylací serinů S71 a S280. Aktivita a jaderná lokalizace AMPK v játrech myši inverzně koreluje s množstvím jaderného CRY1 (Lamia et al. 2009), což ukazuje roli CRY proteinů jako prostředníků v regulaci periferních hodin pomocí změny stavu metabolismu. Sumoylace proteinu BMAL1 indukovaná proteinem CLOCK také hraje roli v rytmicitě hodin (Cardone et al. 2005).

Mimo rytmické oscilace vlastní genové exprese jsou hodinové geny schopné indukovat a regulovat rytmickou expresi dalších genů organismu. Tyto geny nejsou součástí zpětnovazebných smyček hodin, ale dále regulují množství procesů v buňce (Mazzoccoli et al. 2012). Tyto geny nesou označení „hodinami kontrolované geny“ a ve svých funkcích jsou vysoce polymorfní (Akhtar et al. 2002). Hodinové geny indukují expresi cílových genů díky aktivaci elementů v jejich promotorech. Tyto elementy jsou např. E-box motivy pro dimery CLOCK/BMAL1, RORE sekvence interagující s ROR a Rev-Er α (Ueda et al. 2005) a D-elementy vážící D-site binding protein (DBP) (Kumaki et al. 2008).



Obrázek 2.: Schématický model molekulárního mechanismu zpětnovazebných smyček savčích cirkadiálních hodin. Aktivační komplex tvořený dimery BMAL1/CLOCK se váže na E-boxy promotorů cílových genů, mezi které patří geny Per, Cry, Rora a Rev-Erba a další hodinami kontrolované geny (Ccg). Heterodimery proteinů PER/CRY zpětně reprimují transkripci svých genů pomocí interakce s CLOCK/BMAL1 heterodimery. Elementy RORA a Rev-Erba dále regulují expresi genu Bmal1. (upraveno dle Ko a Takahashi 2006)

Centrální hodiny v SCN hrají důležitou roli pro cirkadiální rytmus genové exprese hodinami kontrolovaných genů na periferiích. Narušení rytmicity centrálních hodin vede k oslabení či vymizení rytmické exprese ve tkáních organismu (Sakamoto et al. 1998). Profil rytmické genové exprese napříč buněčnými typy se může výrazně lišit, což ukazuje, že hodinami kontrolované geny nemusí podléhat jen cirkadiální kontrole genové exprese z centrálních hodin, ale také tkáňově specifické kontrole pro každý orgán (Panda et al. 2002).

2.1.5 Seřizování centrálních hodin

Aby centrální hodiny byly schopné seřizovat svou endogenní periodu τ podle 24 hodinového cyklu dne a noci, je potřeba jejich genovou expresi průběžně synchronizovat pomocí takzvaných „zeitgeberů“ (synchronizátorů).

Nejdůležitější zeitgeber pro centrální hodiny savčích hodin je světlo, které za běžných podmínek sleduje průběh střídání světlé a tmavé části dne. Dopad světla z prostředí na sítnici je předáván dále do SCN prostřednictvím ipRGCs (intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells) buněk, které jsou díky přítomnosti pigmentu melanopsinu schopny vyhodnocovat intenzitu externího světla (Berson 2003). Tyto buňky jsou monosynapticky spojeny s core oblastí SCN a tvoří takzvaný retinohypothalamický trakt (RHT). Za hlavní neurotransmiter zprostředkující předávání informací o světle do SCN je považován glutamát (Ebling 1996), jehož účinek je dále regulovaný neuromodulátorem PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Michel et al. 2006). Světlo s pomocí této signalizace aktivuje v buňkách SCN kaskádu vedoucí k fosforylaci proteinu CREB (Ca^{2+} /cAMP response element binding protein), který je schopen indukovat transkripci genu *Per1* (Tischkau et al. 2003).

Mimo RHT je informace o světle zprostředkována SCN nepřímo přes intergenikulární list (IGL) thalamu. IGL přijímá informace ze sítnice a dále je předává do SCN přes genikulohypothalamický trakt (GHT) za použití neuropeptidu Y (Freeman et al. 2004). GHT má patrně i funkci při seřizování hodin organismu a předávání dalších podnětů mimo světelných (Maywood et al. 1997).

Na synchronizaci SCN se také podílí raphe jádra středního mozku produkující serotonin, které modulují aktivitu akčních potenciálů v SCN (Rea et al. 1994, Hay-Schmidt et al. 2003).

2.1.6 Periferní hodiny

V savčím organismu jsou kromě SCN přítomny cirkadiánní hodiny jak v jiných částech mozku (Valnegri et al. 2011, Harbour et al. 2014), tak i v dalších tkáních, které nejsou neuronálního původu (Sládek et al. 2007, Tong a Yin 2013). Tyto periferní hodiny jsou schopny sebeudržujících smyček cirkadiánních oscilací (Yoo et al. 2004). Jako mechanismus synchronizace buněčných hodin v těchto tkáních je navrhována parakrinní signalizace (Nagoshi et al. 2004), ale pro udržení synchronizace hodin celého organismu napříč tkáněmi je nutné zachování integrity a funkce SCN (Guo et al. 2006).

2.1.7 Seřizování periferních hodin

Periferní hodiny jsou seřizovány signály z centrálních cirkadiánních hodin (Dibner et al. 2010). SCN předává informace periferním hodinám prostřednictvím různých drah, mezi které patří autonomní nervový systém, denní rytmus tělesné teploty a signály endokrinní povahy (Terazono et al. 2003, Brown et al. 2002, Le Minh et al. 2001). Signalizace pomocí faktorů v krvi, jejichž koncentrace se mění v průběhu dne, probíhá pomocí rytmické regulace aktinové polymerizace. Vyšší polymerizace aktinu má za následek translokaci koaktivátoru MRTF (myocardin-related transcription factor-B) do jádra, kde účinkuje společně s transkripčním faktorem SRF (serum-response factor) a indukuje tím rytmickou genovou expresi cílových genů, mezi které patří i hodinový gen *Per2* (Gerber et al. 2013).

Nezávisle na signálech z SCN může být fáze periferních hodin nastavena podle času dostupnosti potravy. Při omezení doby příjmu potravy pokusným zvířatům na dobu, kdy potravu obvykle nepřijímají, dojde ke zvýšení jejich aktivity v očekávání podání potravy (Damiola et al. 2000). Tato aktivita je zvaná „food anticipatory activity“ (FAA) a předpokládá se, že je řízená díky tzv. „food entrainable oscillator“ (FEO), který však ještě nebyl v organismu lokalizován (Davidson 2006, Carneiro a Araujo 2009).

V případě omezení doby dostupnosti potravy pokusným zvířatům pouze na určitou část během dne, hovoříme o režimu „restricted feeding“ (RF). RF vede ke změně fáze rytmické exprese hodinových genů beze změny fáze exprese v SCN (Damiola et al. 2000). Důležitost příjmu potravy pro seřizování hodin organismu podporují výsledky experimentů u nočních živočichů, kde podávání potravy pouze během dne zapříčinilo změnu některých fyziologických pochodů včetně aktivity před očekávanou dobou dostupnosti potravy (Mistlberger 1994).

Za přirozených podmínek u volně žijícího organismu patrně výše uvedené signály fungují synergicky díky koordinaci z SCN regulující přirozenou dobu krmení a sekreci hormonů.

2.2 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou hormony steroidní povahy, které jsou syntetizovány z cholesterolového prekurzoru v nadledvinách (Payne 2004). Hlavní endogenní glukokortikoidy savců jsou kortisol a kortikosteron, jejichž poměr hladiny v organismu se mezidruhově i vnitrodruhově liší (Koren et al. 2012). V organismu se glukokortikoidy vyznačují širokým spektrem účinků na intermediární metabolismus, imunitní systém a psychiku jedince. Díky těmto účinkům se glukokortikoidy již několik desetiletí používají v medicíně pro své protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Coutinho a Chapman 2011) a při léčbě revmatoidní artrózy (Hoes et al. 2010).

Glukokortikoidy ovlivňují genovou expresi a metabolismus ve velkém množství buněk. Jsou nezbytné pro život organismu a ovlivňují expresi přibližně 10% lidského genomu (Buckingham 2006). Glukokortikoidní receptory (GR) jsou přítomny téměř ve všech tkáních savců (Sedwick 2014), důležitou výjimku pak tvoří SCN hypothalamu (Rosenfeld et al. 1988).

2.2.1 Syntéza glukokortikoidů

Nadledviny jsou párový orgán složený ze dvou tkání odlišných funkcí i původem. Kůra nadledvin tvoří většinu objemu nadledvin a její hlavní funkcí je produkce steroidních hormonů, a to glukokortikoidů a mineralokortikoidů. Kůra se dělí

na tři oblasti, a to vnější zona glomerulosa (ZG), prostřední zona fasciculata (ZF) a vnitřní zona reticularis (ZR). Glukokortikoidy jsou společně s malým množstvím androgenů produkovány v ZF (Simpson a Waterman 1988). ZG produkuje mineralokortikoidy zodpovědné za homeostázu solí a vody v organismu, zatímco ZR produkuje androgeny (Rege et al. 2014).

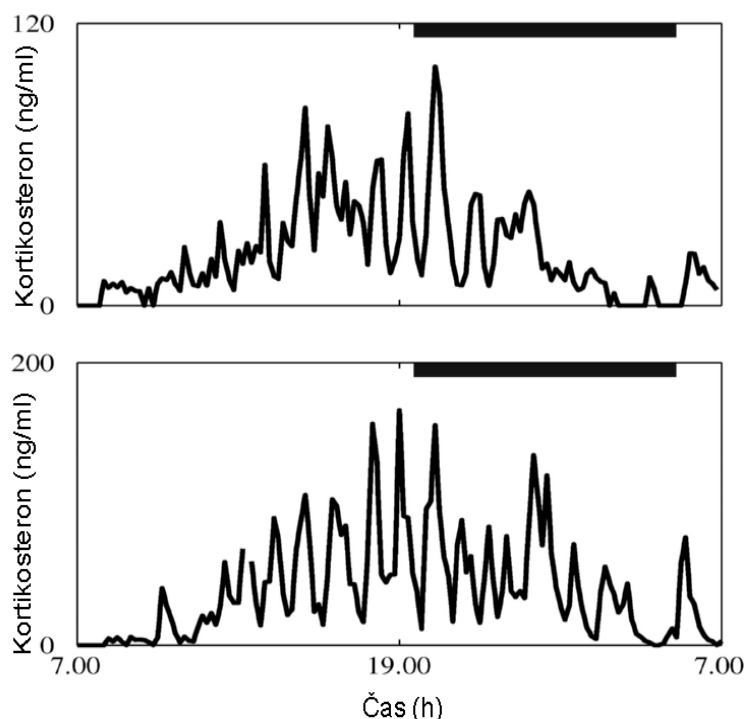
Biosyntéza glukokortikoidů v ZF nadledvin začíná transportem cholesterolu do mitochondrií, který je regulovaný proteinem akutně regulujícím steroidogenezi (steroidogenic acute regulatory protein - StAR) (Clark et al. 1994). V mitochondriích je cholesterol konvertován na pregnenolon enzymem P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage enzyme). Tento krok určuje rychlost syntézy glukokortikoidů a je silně regulován (Miller 1998). Další kroky syntézy glukokortikoidů závisí na tom, zda bude finálním produktem biosyntézy kortisol nebo kortikosteron. V ZG je kortikosteron dále modifikován při tvorbě aldosteronu.

2.2.2 Regulace sekrece glukokortikoidů

Důležitou vlastností glukokortikoidní sekrece je její rytmická povaha, která vykazuje jak cirkadiánní, tak ultradiánní charakter pulzující s frekvencí přibližně jedné hodiny (Qian et al. 2012). Nejvyšší hladina glukokortikoidů v krvi je detekovatelná na počátku aktivní fáze organismu, tedy ráno pro denní živočichy a večer pro noční. Naopak, nejnižších hodnot dosahují glukokortikoidy na počátku klidové periody (Obr. 3). Hladina glukokortikoidů v těle se zvyšuje při odpovědi na fyzické trauma či stres (Munck et al. 1984). Dostupnost aktivních glukokortikoidů cílovým tkáním a receptorům je dále regulována pomocí mechanismů prereceptorového metabolismu, kdy enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza katalyzuje přeměnu aktivní formy glukokortikoidů (kortisol, kortikosteron) na formu neaktivní (kortison, 11-dehydrokortikosteron) či naopak (Rabbitt et al. 2002) a tím buďto reguluje odpověď na glukokortikoidní signalizaci na úrovni tkání či dále upravuje zpětnovazebnou regulaci skrze hypothalamo-hypofýzo-nadledvinovou osu (Kotelevtsev et al. 1997).

Vzhledem k důležitosti glukokortikoidů pro život organismu a rytmické povaze jeho sekrece je evidentní, že pro zachování homeostázy kortisolu a kortikosteronu je

nutná efektivní regulace jejich sekrece. Mechanismy této regulace lze rozčlenit na ty, které podléhají přímým vlivům centrálních hodin v SCN a na další, které jsou pod kontrolou periferních hodin nadledvin (viz. níže).



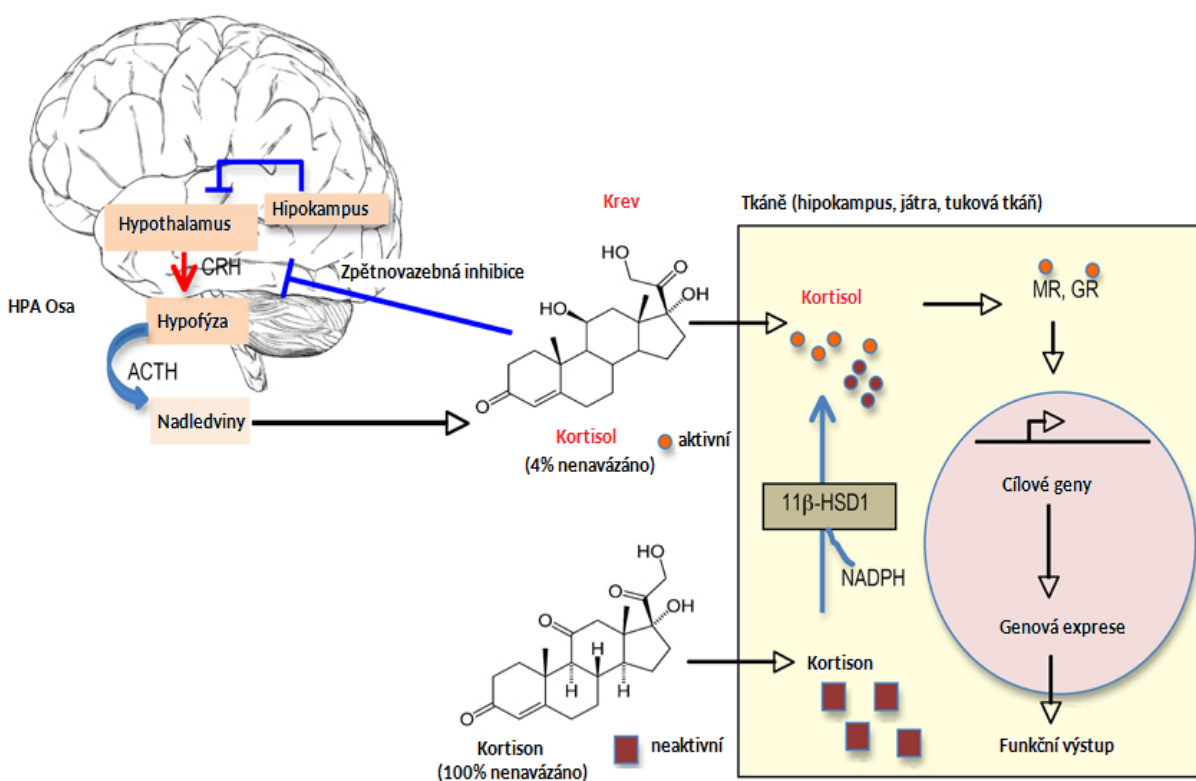
Obrázek 3.: 24-hodinový profil kortikosteronu v krvi měřený každých 10 minut dvěma samečkům potkana kmene Sprague-Dawley demonstrující cirkadiánní a ultradiánní rytmicitu sekrece glukokortikoidů. (upraveno dle Walker et al. 2010)

2.2.2.1 HPA Osa

Hypothalamo-hypofýzo-nadledvinová (HPA) osa, je systém řídící jak cirkadiánní, tak stresem vyvolanou sekreci glukokortikoidů. Cirkadiánní regulace této osy je řízena z centrálních hodin v SCN a destrukce těchto jader má u potkanů za následek vymizení cirkadiánní rytmicity hladiny glukokortikoidů v krvi (Abe et al. 1979).

Prvním krokem sekrece glukokortikoidů řízené HPA osou je uvolnění AVP a hormonu uvolňujícího kortikotropin (corticotropin-releasing hormone, CRH) z paraventriculárního hypothalamu (PVN), které dále putují do adenohipofýzy, kde společně ovlivňují sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) (Watts et al. 2004) (Obr. 4).

ACTH je následně transportován do nadledvin, kde se váže na svůj receptor (ACTHR) v ZF, což způsobuje aktivaci heterotrimerních G proteinů stimulujících adenylyl cyklázu a skrze cAMP protein kinázu A (PKA) (Côté et al. 2001). Transkripční faktory aktivované PKA (např. protein CREB) regulují expresi genů sloužících k biosyntéze glukokortikoidů (Mayr a Montminy 2001). Zvýšení hladiny glukokortikoidů má zpětnovazebný charakter, kdy po dosažení prahové hladiny v krvi inhibují aktivitu HPA osy (Evanson et al. 2010). Tato zpětná vazba je patrně zprostředkována více než jedním způsobem. Je známo, že se na ní podílí hipokampus, ale jeho odstranění zpětnou vazbu glukokortikoidů pouze oslabí (Jacobson a Sapolsky 1991).



Obrázek 4.: Schéma funkce hypothalamo-hypofýzo nadledvinové osy a tkáňové dostupnosti kortisolu regulované 11β-hydroxysteroid dehydrogenázou. Pro zkratky viz. text. (upraveno dle Yau a Seckl 2012)

2.2.2.2 Autonomní nervový systém

Ve studii využívající transneuronální retrogradní virus pro označení neuronální dráhy z nadledvin bylo zjištěno, že nadledviny jsou inervovány intramediolaterálním obloukem (IML) páteřní míchy, která získává podněty z neuronů autonomní části PVN

hypothalamu (Buijs et al. 1999). Tyto neurony dostávají signály z SCN pomocí AVP či VIP.

Tato dráha umožňuje regulaci sekrece glukokortikoidů, které jsou uvolňovány do krve rytmicky v závislosti na denní době. Díky této dráze ovlivní vystavení světlu genovou expresi a následně indukuje sekreci glukokortikoidů v nadledvinách, aniž by došlo ke změně sekrece ACTH (Ishida et al. 2005). U zvířat, kterým byla provedena léze SCN, nedochází v oblasti nadledvin ke zvýšení nervové aktivity po stimulaci světlem (Nijima et al. 1993).

Autonomní nervový systém může ovlivnit senzitivitu nadledvin vůči ACTH v závislosti na denní době. Citlivost nadledvin dosahuje maxima souběžně s maximem ACTH v oběhu (Dallman et al. 1978) a závisí na přítomnosti neporušeného SCN (Sage et al. 2002).

2.2.2.3 Periferní hodiny nadledvin

Nadledviny obsahují, podobně jako jiné tkáně a orgány v těle, vlastní cirkadiánní hodiny (Lemos et al. 2006) a i v nepřítomnosti signálů z SCN jsou schopny vykazovat rytmy v sekreci glukokortikoidů a metabolické aktivitě (Andrews a Folk 1964)

V cirkadiánním transkriptomu myši se nachází několik genů, jejichž produkty se účastní signalizace ACTH či transportu a biosyntézy cholesterolu. Periferní hodiny nadledvin tedy mohou regulovat rytmus biosyntézy a sekrece glukokortikoidů díky změnám v expresi hodinami kontrolovaných genů v závislosti na denní době (Oster et al. 2006).

Mezi tyto geny patří i již zmíněný StAR protein, který se účastní limitujícího kroku biosyntézy glukokortikoidů při transportu cholesterolu do mitochondrií. StAR protein je rytmicky exprimován díky tomu, že jeho promotor obsahuje E-box, na který nasedá dimer CLOCK/BMAL1. Hladina proteinu StAR pozitivně koreluje s hladinou glukokortikoidů v organismu (Son et al. 2008).

Tyto poznatky ukazují, že vlastní cirkadiánní systém v nadledvinách může regulovat hladinu glukokortikoidů dvojím způsobem, a to regulací citlivosti nadledvin na signalizaci ACTH a ovlivněním rychlosti vlastní syntézy glukokortikoidů pomocí regulace exprese StAR proteinu.

2.2.3 Mechanismus účinku glukokortikoidů

Glukokortikoidy se váží na dva typy receptorů. Mineralokortikoidní receptory (MR) mají vysokou vazebnou afinitu ke glukokortikoidům, a glukokortikoidní receptory (GR) s nižší vazebnou afinitou (Nishi a Kawata 2007). V nepřítomnosti glukokortikoidů se tyto receptory nachází v cytoplasmě buňky. GR se v cytoplasmě vyskytují v komplexech s Hsp90 (heat shock protein) chaperone proteinem (Pratt et al. 2006) a po vazbě hormonu je tento komplex transportován do jádra. V jádře dojde k disociaci Hsp90 a dimerizaci receptoru, který se poté váže na DNA (Echeverría et al. 2009) či jako monomer interaguje s dalšími transkripčními faktory (Reichardt et al. 1998, Heck et al. 1994).

Je důležité zmínit, že jedním z cirkadiánních transkripčních faktorů, který reguluje genovou expresi Hsp proteinů je také heat shock faktor 1 (HSF1) (Reinke et al. 2008). I mRNA glukokortikoidních a mineralokortikoidních receptorů byla detekována v mozku jako rytmicky exprimovaná (Herman et al. 1993). Je tedy možné, že mechanismus regulace exprese Hsps a steroidních receptorů může být důležitým prvkem odlišné regulace signalizace glukokortikoidů v jednotlivých tkáních (Furay et al. 2006).

Výsledky Experimentů také poukazují na možnost, že kontinuální obsazení GR je nutné pro nastolení a udržení cirkadiánních oscilací genové exprese v periferních hodinách. Kmenové buňky rostoucí v médiu se syntetickým agonistou glukokortikoidních receptorů dexamethasonem (DEX), vykazaly po podání antagonisty GR mifepristonu (RU486) utlumení amplitudy a fázový posun v expresi genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Npas2* (So et al. 2009).

2.2.4 Vliv glukokortikoidů na biologické hodiny

Jak bylo popsáno v předcházejícím textu, sekrece glukokortikoidů je pod komplexní kontrolou cirkadiánního systému a navíc glukokortoidy samotné působí na některé komponenty biologických hodin, a tak se zřejmě podílí na seřizování periferních hodin organismu.

Po přidání DEX do kultury myších fibroblastů došlo k akutní indukci exprese hodinového genu *Per1* již hodinu po podání a DEX byl schopen indukovat cirkadiánní rytmus exprese hodinových genů *Per*, *Cry* a *Rev-Erba* v měřeném intervalu 44 hodin (Balsalobre et al. 2000). Po podání DEX *in vivo* došlo k fázovému posunu cirkadiánní exprese v játrech, ledvinách a srdci. Naproti tomu v mutantních myších bez glukokortikoidního receptoru po podání DEX k fázovému posunu nedošlo (Balsalobre et al. 2000). Adrenalektomie (ADX) způsobila v myších játrech ztrátu rytmické exprese 100 genů z celkového počtu 169 rytmických genů (Oishi et al. 2005). ADX také narušila rytmus exprese genu *Per2* ve stria terminalis amygdaly (Amir et al. 2004). Rytmus exprese genu *Per2* byl znovu nastolen po navození rytmických hladin kortikosteronu v organismu příjmem v pitné vodě, zatímco příjem kortikosteronu v kapslích, které jej konstantně uvolňovaly, tento účinek neměl (Segall et al. 2006).

Předpokládá se, že glukokortikoidy by mohly hrát roli při seřizování periferních hodin během RF režimu, kdy je organismu omezena doba příjmu potravy. Omezení doby krmení ovlivňuje cirkadiánní hodiny i chování organismu a tyto změny jsou spojeny se změnou sekrece glukokortikoidů z nadledvin (Stokkan et al. 2001, Bogdan et al. 2001). U zvířat po ADX či vlivem mutace genu pro GR byl fázový posun periferních hodin vůči centrálním za režimu RF zrychlen (Le Minh et al. 2001).

Účinky zeitgeberů na různé orgány mohou také podléhat tkáňové specifitě, která byla prokázána pro působení glukokortikoidů a příjmu potravy. Ve studii, kde ADX potkani dostávali průběžně v antifázi injekce glukokortikoidů a potravu v režimu RF, došlo k fenoménu, kdy některé orgány (ledviny, plíce) seřídily svou fázi podle příjmu glukokortikoidů a jiné (játra) podle příjmu potravy (Sujino et al. 2012).

2.3 Hipokampus

Hipokampus je párová formace limbického systému hrající důležitou roli ve schopnosti jedince udržovat krátkodobou i dlouhodobou paměť (Riedel a Micheau 2001). Anatomicky se rozlišuje na několik podoblastí, nejčastěji označovaných jako *cornu ammonis 1 - 4* (CA1 – CA4) a *gyrus dentatus* (DG). Jako další oblasti v mozku se i hipokampus vyznačuje cirkadiálními rytmy mnoha genů, mezi které patří i hodinové geny *Bmal1*, *Per1*, *Per2* a *Per3* či *Rev-Erba* (Li et al. 2013).

Signalizace z SCN do hipokampu je patrně nepřímá skrze dráhu vedoucí přes dorsomediální hypothalamus do locus coeruleus (LC) mozkového kmene a odtud do hipokampu (Aston-Jones et al. 2001, Berridge a Foote 1991). Důležitý mechanismus kontrolující rytmickou aktivitu hipokampu je signalizace pomocí glukokortikoidů. Buňky hipokampu exprimují glukokortikoidní i mineralokortikoidní receptory (Alexis et al. 1983, Liberzon et al. 1999) a tato exprese se dynamicky mění v závislosti na dostupnosti glukokortikoidů. Po adrenalectomii byla exprese GR zvýšena jak v CA1, tak v DG hipokampu (Herman a Spencer 1998).

Jak bylo již zmíněno, hipokampus také hraje roli v regulaci HPA osy, kde inhibuje sekreci ACTH při zprostředkování zpětné vazby glukokortikoidů na tento systém. Destrukce hipokampu vede ke zvýšení hladiny glukokortikoidů v organismu (Jacobson a Sapolsky 1991).

Základní mechanismus učení a paměti spočívá ve schopnosti neuronů vytvářet dlouhotrvající pozitivní změny v efektivitě jejich synaptického přenosu. Tento fenomén se nazývá dlouhodobá potenciace (LTP – long term potentiation). Důležitou vlastností LTP a vytváření paměti je změna jejich účinnosti v čase (Chaudhury et al. 2005, Eckel-Mahan 2012). Myši s deletovaným hodinovým genem *Bmal1* vykazovaly zhoršenou LTP a s tím spojené zhoršené učení (Wardlaw et al. 2014). Cirkadiální změny v LTP jsou také regulovány glukokortikoidy. Ve studii srovnávající LTP hipokampu *in vivo* během dne u potkanů po ADX vyšlo najevo, že ADX zvířata vykazují ve svém LTP opačnou fázi proti kontrolním. Zatímco zvířata s intaktními nadledvinami vykazují vyšší LTP v tmavé části dne, kdy jsou aktivní, ADX mají

naopak vyšší LTP za světla (Dana a Martinez 1984).

Neurony hipokampu jsou citlivé vůči dlouhodobému stresu a tím indukované vyšší hladině glukokortikoidů (Conrad 2008). Kumulativní vliv zvýšené sekrece glukokortikoidů na hipokampus může mít za následek oslabení zpětnovazebného mechanismu regulace HPA osy pomocí hipokampu a tím postupné gradování účinku glukokortikoidů na hipokampus vedoucí v kaskádě až k neurodegradaci (Sapolsky et al. 1986).

Účinky glukokortikoidů na hipokampus jsou dobře charakterizovány u Cushingova syndromu (CS), známé patologie asociované s chronickou hypersekrecí glukokortikoidů v nadledvinách. Počet neuronů hipokampální formace u pacientů s CS negativně koreluje s hladinou kortisolu v krevní plasmě (Starkman et al. 1992). Cushingův syndrom se projevuje zvýšenou hmotností, vysokým krevním tlakem, změnami v glycidovém metabolismu a vymizením cirkadiálního rytmu exprese glukokortikoidů. Tito pacienti jsou léčeni oboustrannou ADX. Nejen zvýšené, ale i snížené hladiny glukokortikoidů mají vliv na morfologii hipokampu. Studie testující účinky ADX na hipokampus ukázaly degeneraci buněk v DG hipokampu a tomu odpovídající zhoršení učení a paměti (Spanswick et al. 2007). Z výše uvedených poznatků je patrné, že zachování fyziologického rytmu sekrece glukokortikoidů je důležité pro funkci a morfologii hipokampální oblasti.

3. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo přispět k poznání úlohy glukokortikoidů v savčím cirkadiánním systému a objasnit účinek obsazení glukokortikoidních receptorů na udržování rytmické exprese hodinových genů ve vybraných buněčných liniích.

Mezi dílčí cíle práce patřilo:

- 1) Detekovat přítomnost cirkadiánních hodin v jednotlivých podoblastech hipokampu.
- 2) Zjistit, jak odstranění nadledvin či vystavení režimu RF ovlivní expresi hodinových genů v těchto cirkadiánních hodinách
- 3) Zjistit, jak odstranění nadledvin ovlivní expresi hodinových genů v cirkadiánních hodinách distálního kolonu
- 4) Objasnit vliv obsazení glukokortikoidních receptorů na zachování cirkadiánní rytmicity v buněčných liniích SW620 a NIH3T3

4. Materiál a metody

4.1 Chov pokusných zvířat

V experimentech byli použiti dospělí samci laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (Chov FgÚ AV ČR). Všechna zvířata byla krmena standardní laboratorní krmnou směsí a napájena vodou v režimu *ad libitum* s výjimkou experimentu, kde byl přístup k potravě omezen (viz. níže). Teplota ve zvířinci byla udržována konstantně na 23°C, denní osvětlení bylo zajištěno zářivkami Tesla 40 W. Intenzita osvětlení na úrovni chovných klecí byla 150-250 luxů. Definovaný světelný režim LD 12:12 byl nastaven a řízen automatickým hodinovým spínačem.

4.2 Uspořádání jednotlivých pokusů

4.2.1 Detekce denních profilů exprese hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu

V experimentu byla pomocí hybridizace *in situ* zkoumána genová exprese vybraných hodinových genů v hipokampu dospělců potkana kmene Wistar.

Dospělí samci potkanů kmene Wistar byli chováni za standardních světelných podmínek LD 12:12 (světlo od 6:00 do 18:00). Všechna zvířata měla přístup k potravě i pitné vodě *ad libitum*. Aby se zamezilo přímému účinku světla na genovou expresi, byla zvířata v den odběru převedena do režimu stálé tmy, kdy se v 6:00 nerozsvítilo a zvířata byla ponechána ve tmě až do skončení pokusu.

V pokusu byli použiti potkani SHAM skupiny, kteří byli operovaní postupem popsaným níže v oddělení 4.3.1 „Adrenalektomie pokusných zvířat“, ovšem nadledviny byly ponechány *in situ*. Tato skupina současně sloužila jako kontrolní skupina v dalším pokusu (viz. 4.2.2, 4.2.3). Skupina SHAM obsahovala celkem 35 zvířat. Zvířata byla odebírána dva týdny po operaci každé čtyři hodiny během 24 hodin v počtu pěti jedinců na jeden časový bod. Zvířata byla nejprve uvedena do celkové narkózy peritoneální injekcí thiopentalu a následně jim byly odebrány mozky

a vzorky distálního kolonu. Odebrané mozky a vzorky distálního kolonu byly dále zpracovány dle postupu popsaného níže, viz. Kapitola 4.3.2 „Příprava tkáňových řezů“ a kapitola 4.5.1.1 „Izolace celkové RNA z distálního kolonu“

4.2.2 Vliv ADX na rytmickou expresi hodinových genů v SCN, hipokampu a distálním kolonu dospělých potkanů kmene Wistar

V tomto experimentu byl zkoumán vliv ADX, tj. absence glukokortikoidní signalizace na expresi vybraných hodinových genů v SCN a hipokampu dospělců potkana kmene Wistar.

Dospělí samci potkanů Wistar byli chováni za standardních světelných podmínek LD 12:12 (světlo od 6:00 do 18:00). Všechna zvířata měla přístup k potravě i pitné vodě *ad libitum*. Celkem bylo použito 70 zvířat, která byla rozdělena do dvou skupin po 35 zvířatech. Jedna skupina zvířat byla adrenalektomována (označení ADX), tzn. byly chirurgicky odstraněny nadledviny dle postupu „Adrenalektomie pokusných zvířat (viz. 4.3.1)“ a druhá skupina prodělala sham operaci (viz. 4.2.1).

Postup odběrů skupiny ADX byl identický jako skupiny SHAM, viz. 4.2.1. Odebrané mozky a vzorky distálního kolonu byly dále zpracovány dle postupu popsaného níže, viz. oddělení 4.3.2 „Příprava tkáňových řezů“ a 4.5.1.1 „Izolace celkové RNA z distálního kolonu“. Vzorky kolonu byly uchovávány až do zpracování v -80°C ve stabilizačním RNAlater roztoku (Qiagen). Izolovaná RNA ze vzorků byla přepsána na cDNA a následně byla pomocí metody RT-qPCR zjištěna hladina mRNA vybraných genů ve vzorku (*Per*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1*) vůči referenčním genům (*GAPDH*, *TBP*). Seznam použitých primerů viz. tabulka 1.

GEN	PRIMER	SEKVENCE (5'- ... -3')
<i>rPer1</i> (Eurogentec, AB002108)	F	CGCACTTCGGGAGCTCAAACCTTC
	R	GTCCATGGCACAGGGCTCACC
<i>rPer2</i> (Eurogentec, NM_031678)	F	CACGCAACGGGGAGTACATCACAC
	R	CAAGGGGAGGCTGCGAACACAT
<i>rRev-Erba</i> (Eurogentec, NM_145775)	F	GCTGTGCGGGAGGTGGTAGAAT
	R	TGTAGGTTGTGCGGCTCAGGAA
<i>rBmal1</i> (Eurogentec, NM_145775)	F	CAATGCGATGTCCCCGGAAGTTAGA
	R	TCCCTCGGTCACATCCCTGAGAAT
<i>rGAPDH</i> (Sigma-Aldrich, NM_017008.4)	F	TGATTCTACCCACGGCAAGTT
	R	TGATGGGTTTCCCATTTGATGA
<i>rTBP</i> (Sigma-Aldrich, NM_001004198.1)	F	AGAACAATCCAGACTAGCA
	R	GGGAACTTCACATCACAGCTC

Tabulka 1.: Přehled primerů použitých pro amplifikaci cDNA kolonu potkana Wistar.

4.2.3 Vliv režimu RF na rytmickou expresi hodinových genů v SCN a hipokampu dospělých potkanů kmene Wistar

V tomto experimentu byl zkoumán vliv změny omezení doby příjmu potravy na profil genové exprese vybraných hodinových genů v hipokampu potkanů kmene Wistar. Zvířata byla chována v režimu LD 12:12 (světlo od 5:00 do 17:00). Potrava byla potkanům poskytnuta na dobu šesti hodin od 9 hodin dopoledne do 13 hodin, kdy jim byla zbylá potrava odebrána.

Režim RF byl udržován po dobu 10 dní, jedenáctý den se v 5:00 nerozsvítilo a zvířata byla ponechána ve tmě do ukončení experimentu. Odebrané tkáně byly dále zpracovány dle postupu popsáno níže, viz. Oddělení 4.3.2 „Příprava tkáňových řezů“.

4.2.4 Ověření přítomnosti GR v SW620/NIH3T3

Přítomnost GR byla ověřena pomocí RT-qPCR zjištěním relativní kvantity *hGR* (SW620) a *mGR* (NIH3T3) mRNA vůči referenčním vzorkům za použití kontrolního genu GAPDH (SW620) a B2M (NIH3T3). Jako zdroj RNA pro izolaci a následné přepsání na cDNA, která byla použita v PCR reakci u buněk SW620, byly použity tři směsné vzorky z několika časových bodů, pro reakci u NIH3T3 kombinace tří vzorků

odebraných v 9:00 a tři odebraných ve 20:00 kvůli zjištění rytmicity exprese GR. Seznam použitých primerů viz. tab. 2.

GEN	PRIMER	SEKVENCE (5' ... -3')
<i>hGR</i> (Sigma-Aldrich, NM_000176.2)	F	ACTGCTTCTCTCTTCAGTTC
	R	GATTTTCAACCACTTCATGC
<i>hGAPDH</i> (Sigma-Aldrich, NM_001256799.2)	F	AATGAAGGGGTCATTGATGG
	R	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
<i>mGR</i> (Sigma- Aldrich, NM_008173.3)	F	CTTCTCTCCTCAGTTCCTAAG
	R	CCAATTCTGACTGGAGTTTC
<i>mB2M</i> (Sigma-Aldrich, NM_009735.3)	F	TCTCACTGACCGGCCTGTATGCTATC
	R	AATGTGAGGCGGGTGGAACTGTG

Tabulka 2.: Přehled primerů použitých pro amplifikaci cDNA GR buněčných linií SW620 a NIH3T3.

4.2.5 Vliv aktivity GR na cirkadiánní rytmicitu u SW620 a NIH3T3

V tomto pilotním experimentu byl zkoumán vliv aktivovaného GR na molekulární cirkadiánní rytmy v lidských a myších buněčných liniích, přičemž cílem bylo porovnání buněčné linie odvozené z myších fibroblastů NIH3T3 a lidské adenokarcinomální linie SW620. Ke sledování cirkadiánních rytmů pomocí bioluminiscence byly obě linie stabilně transfekovány luciferázovými (Luc) reportéry pod kontrolou regulačních sekvencí odvozených od hodinových promotorů (Per2 v případě NIH3T3, Bmal1 v případě SW620). Ke sledování luminiscence posloužil specializovaný luminometr (Lumicycle, Actimetrics, detaily metody viz. oddělení 4.4). Buňky byly do luminometru umístěny v petriho miskách se 2 ml AIR (vzduchem pufrovaného a luciferin obsahujícího) média se 100 nM koncentrací DEX a sledovány po dobu jednoho týdne. Výměna média a aktivace GR pomocí DEX v čase T = 0 posloužily k indukci cirkadiánního rytmu o vysoké amplitudě a totožné fázi ve všech buňkách experimentu a jeho následné analýze pomocí sledování luminiscence.

V prvním experimentu bylo do luminometru umístěno celkem 12 misek s buněčnou linií SW620. Po 23 (T = 23) hodinách v luminometru bylo do 4 misek přidáno 2 µl 5% ethanolu (EtOH) (vehikulum – označení skupiny V), do 4 pak 2µl

1mM RU486 (inhibitor mifepriston – označení skupiny R) a do posledních 4 misek 8 μ l 100 μ M DEX (označení skupiny D). RU486 je kompetitivní antagonist glukokortikoidních a progesteronových receptorů a DEX syntetický agonista těchto receptorů.

Experiment za použití buněčné linie měl rozsah 9 misek buněčné linie NIH3T3. Označení skupin bylo opět V/R/D. V čase $T = 0$ byly misky vloženy do luminometru v AIR médiu se 100 nM DEX a v čase $T = 23$ byly dle skupin do média přidány 2 μ l 5% EtOH (skupina V, $n = 3$), 2 μ l 1mM RU486 (skupina R, $n = 4$) a 8 μ l 100 μ M DEX (skupina D, $n = 2$).

Experimenty s oběma buněčnými liniemi byly dodatečně opakovány.

4.2.6 Vliv aktivity GR na expresi hodinových genů u SW620

V experimentu byla použita buněčná linie SW620 odvozená z lidského kolorektálního adenokarcinomu. Buňky byly stabilně transfekovány lentivirálním vektorem LV6-Bmal1-Luc sloužícím ke stanovení cirkadiánní rytmicity pomocí analýzy bioluminiscence (viz. 4.4).

Po třech pasážích byly buňky vysety na sterilní šestijamkové destičky s 2 ml DMEM média. V experimentu byly buňky odebírány pro izolaci celkové RNA po třech jamkách na jeden časový bod v časech $T = 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16$ a 20h, kde času $T = 0$ odpovídá doba výměny média v jamkách destičky za 2 ml DMEM média o 100 nM koncentraci agonisty GR DEX. Takto izolovaná RNA byla přepsána na cDNA a pomocí metody RT-qPCR zjištěna hladina mRNA vybraných hodinových genů (*Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1*, *TEF*, *HLF*) vůči referenčním genům (*B2M*, *GAPDH*) za použití následujících primerů (tab. 3). Výměna média a aktivace GR pomocí DEX v čase $T=0$ posloužily k indukci cirkadiánního rytmu o vysoké amplitudě a totožné fázi ve všech buňkách experimentu a jeho následnou analýzu pomocí detekce exprese hodinových genů.

V další části experimentu byly použity buňky SW620 rostoucí ve stejném médiu, ale odběry buněk začaly až v čase T = 21, přičemž v čase T = 20 byly buňky rozděleny na tři skupiny.

První skupině označené V byl přidán do média 1 μ l 5% EtOH jako vehikulum. Druhá skupina nesla označení R. Do média této skupiny byl přidán 1 μ l 1mM RU486 Třetí skupině označené D byla zvýšena koncentrace DEX v médiu na pětinasobek původní hodnoty přidáním 4 μ l 100 μ M DEX.

V experimentu byly buňky pro izolaci RNA odebírány v časech T = 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 a 45 po tripletech na každou skupinu. Takto izolovaná RNA byla přepsána na cDNA a pomocí metody RT-qPCR zjištěna hladina mRNA vybraných genů (*Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1*, *TEF*, *HLF*) vůči referenčním genům (*B2M*, *GAPDH*) za použití následujících primerů (tab. 3). V každé PCR reakci byl ke vzorkům cDNA T21 - T45 navíc přidán vzorek z předešlého experimentu (tedy T1 - T20) pro možnost pozdější normalizace a znázornění ve společném grafu.

GEN	PRIMER	SEKVENCE (5'- ... -3')
<i>hHLF</i> (Sigma-Aldrich, NM_002126.4)	F	CCACGAAGACGCATTTAG
	R	GAAGGGTTTTGTCCCATAAG
<i>hTEF</i> (Sigma-Aldrich, NM_001145398.2)	F	AGATAAGGAAAAGGGGAAGG
	R	GGATGAAAAGTACTGGACAAG
<i>hPer2</i> (Sigma-Aldrich, XM_005246111.3)	F	GCCAATGAAGAGTATTACCAG
	R	ATTCTTCACAATGTGCTCAG
<i>hPer1</i> (Sigma-Aldrich, NM_002616.2)	F	ATTCCGCCTAACCCCGTATGTGACC
	R	GTGTGCCGCGTAGTGAAAATCCTCTTGT
<i>hBmal1</i> (Sigma-Aldrich, NM_001030272.2)	F	AGATGAATTGGCTTCTTTGG
	R	TGGCACCTCTTAATGTTTTTC
<i>hRev-ErbA</i> (Sigma-Aldrich, NM_021724.4)	F	TCCCCCAGCAAGAGCACCAGCAACAT
	R	CCCGAGGCAACGTCCCCACAC
<i>hB2M</i> (Sigma-Aldrich, NM_004048.2)	F	GTACTACACTGAATTCACCCCCACTG
	R	TGCGGCATCTTCAAACCTCCAT
<i>hGAPDH</i> (Sigma-Aldrich, NM_001256799.2)	F	AATGAAGGGTCATTGATGG
	R	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA

Tabulka 3.: Přehled primerů použitých pro amplifikaci cDNA buněčné linie SW620

4.3 Postup stanovení hladin mRNA hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* pomocí metody hybridizace in situ

4.3.1 Adrenalektomie pokusných zvířat

Materiál a vybavení:

Pomůcky:

Chirurgické nástroje – skalpel, nůžky, pinzety, jehly a stehy

Gelaspon (Chauvin ankerpharm GmbH)

Koloidum

Chemikálie:

Izofluran

Penicilin

Postup:

- Zvíře šetrně přendat do nádoby s gázou napuštěnou izofluranem
- Po nástupu celkové narkózy provést řez kůží nad hřbetní oblastí dlouhý cca. 4 cm v přibližné oblasti nadledviny
- Odhalenou svalovinu pod řezem na levé i pravé straně jemně roztrhnout bez poškození cév pomocí pinzety
- Vzniklou dírou ve svalovině po obou stranách pinzetou vyjmout nadledvinu
- Použít gelaspon na zastavení krvácení vzniklé rány
- Sval sešít tenkou jehlou se vstřebatelným vláknem, stehy zasypat penicilinem
- Sešít kůži a rány zasypat penicilinem
- Na povrch kolem rány natřít koloidum pro zabránění znovuotevření rány vlastním přičiněním potkana

U SHAM skupiny byl proveden stejný postup až na vyjmutí nadledvin.

4.3.2 Příprava tkáňových řezů

Dospělá zvířata byla uvedena do hluboké narkózy thiopentalem (50 mg/kg i.p.) a usmrčena rychlou dekapitací (při slabém červeném světle, jehož intenzita nepřesahovala 1 lux). Vyjmuté mozky byly neprodleně zamrazeny v suchém ledu a skladovány v -80°C .

Příprava 12 μm koronálních řezů paralelně v oblastech SCN a hipokampu byla provedena na mrazícím mikrotomu Cryocut při -23°C . Řezy byly následně přeneseny na podložní skla SuperFrost Plus, které byly po zachnutí skladovány v -80°C

4.3.3 Stanovení exprese hodinových genů pomocí hybridizace in situ

In situ hybridizace je metoda molekulární biologie umožňující sledování genové exprese vybraných genů v morfologickém kontextu sledované tkáně díky navázání značené RNA sondy. V experimentech pro tuto diplomovou práci byla použita sonda značená izotopem ^{35}S .

Protokol in situ hybridizace se skládá ze čtyř hlavních kroků, a to:

- Prehybridizace
- Vlastní hybridizace
- Odmytí nenavázané próby
- Detekce hybridizačního signálu

Pro in situ hybridizaci je nutné si předem připravit tkáňové řezy z pokusných zvířat, zlinearizovat plazmidy, ze kterých RNA polymeráza následně nasyntetizuje próbu a značenou ribopróbu purifikovat.

Materiál a vybavení:

Přístroje:

Cryocut Leica CM1850

Scintilační detektor Beckman Coulter LS 6500

pH metr Denver Instruments BASIC

Termoblok Biometra TB1

Vodní lázně Julaba, Memmert

Horizontální elektroforéza Sigma
Stereomikroskop Olympus SZX9
Vyvolávací přístroj Optimax x-ray procesor

Chemikálie:

³⁵S-UTP (1250 mCi/mmol; 10 mCi/ml) (Lacomed)
Diethylpyrokarbonát (DEPC) (Sigma)
Acetát amonný (NH₄-acetát) (Sigma)
Kyselina trichloroctová (TCA) (P-lab)
Trietanolamin (TEA) (Sigma)
Fenol (Fluka)
Chloroform (Lachema)
Izoamylalkohol (Sigma)
Chlorid sodný (Sigma)
Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄)(Sigma)
Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄) (Sigma)
Paraformaldehyd (Fluka)
Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta)
Acetanhydrid (Sigma)
96% EtOH (Tamda)
Kvasinková tRNA (Sigma)
Agaróza (Seakem)
Ethidiumbromid (Sigma)
Formamid (Sigma)
Mixe-bed resine (Bio-rad)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma)
Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
Ficoll-400 (Sigma)
PVP-360 (Sigma)
Sodium dodeylsulfát (SDS) (Sigma)

Pyrofosforečnan sodný (NaPPi) (Sigma)
Dithiotreitol (DTT) (Sigma)
Denhardtův roztok (Sigma)
Dextran sulfát (Sigma)
Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (Sigma)
Citrát sodný (Sigma)
Trizma base (Sigma)
Vývojka Adefomix (Formax)
Ustalovač Adefofix (Formax)
Tri(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS) (Sigma)
RNáza A (Sigma)
Octan amonný (Sigma)
Cresyl violet (Sigma)
Histologický balzám DPX (Fluka)
Scintilační roztok Rotiszint eco plus (P-lab)
Xylen (Sigma)

Kity:

MaxiScript in vitro transkripční kit SP6, T7 nebo T3 (Ambion)

- RNA polymeráza SP6, T7 a T3
- 10x transkripční pufr
- ATP, GTP, CTP, UTP (10 mM)
- DNáza I (bez RNáz)
- Nanášecí pufr II pro elektroforézu
- H₂O (bez RNáz)
- Myší pTRI-aktin (0,5 mg/ml)

4.3.3.1 Příprava značené cRNA próby

Pracovní roztoky:

Chloroform/izoamylalkohol (IC): chloroform a izoamylalkohol v poměru 49:1

Fenol/chloroform/izoamylalkohol (PIC): smíchat chloroform a IC v poměru 1:1

75% EtOH: 37,5 ml 96% EtOH + DEPC H₂O

7,5M NH₄-acetát: 57,81 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr

5M NH₄-acetát: 38,54 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr

10% TCA: 20% TCA a DEPC H₂O v poměru 1:1

Metoda:

Pro detekci *Per1* RNA, *Per2* RNA, *Bmal1* RNA a *Rev-erba* RNA v SCN byly použity radioaktivně značené antisense cRNA sondy syntetizované z připravených plazmidů. Jako radioaktivní značka byl v těchto ribopróbách použit ³⁵S-UTP (1250 mCi/mmol, 10 mCi/ml). Délka antisense cRNA prób a jejich hybridizační teploty jsou uvedeny v tabulce 4.

Gen	Insert (bp)	Linearizační enzym	RNA pol	Hybridizační teplota (°C)	Expozice filmu (dny)
<i>rPer2</i>	1512	Sall	T7	61	10
<i>Rrev-ErbA</i>	1109	SacII	SP6	60	10
<i>rBmal1</i>	841	XhoI	T3	58	10
<i>rPer1</i>	980	Sall	T7	60	10

Tabulka 4.: Délka a parametry cRNA prób užitých pro detekci mRNA

Postup:

1. Linearizace plazmidu (bulk linearizace) pro přípravu antisense cRNA sondy:

Do reakce napipetovat:

- Plazmid 30 µg
- Restrikční pufr 25 µl
- Restrikční endonukleáza 25 µl
- Celou reakci doplnit ddH₂O do výsledného objemu 250 µl
- Inkubovat 4 hodiny při 37°C v termobloku

2. Analýza na 1% agarózovém gelu

3. Purifikace linearizovaných plasmidů:

- k 250 μ l reakci přidat 250 μ l IC, promíchat, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 250 μ l PIC, promíchat, centrifugovat 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 250 μ l IC, promíchat, centrifugovat 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 75 μ l 10M NH₄-acetátu a 650 μ l 96% EtOH (-20°C), promíchat
- precipitace 40 minut v -80°C, centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C), odebrat supernatant
- promýt peletu 700 μ l 75% etanolu (-20°C), centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C), zcela odebrat supernatant
- vysušit peletu 15 minut při pokojové teplotě a rozpustit ve 30 μ l DEPC H₂O
- kontrola purifikovaného plasmidu elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a spektrofotometricky

4. Radioaktivní značení ribopróby pomocí *in vitro* transkripce:

Do sterilní zkumavky napipetovat:

- DEPC H₂O 5,5 μ l
- linearizovaný plazmid 1,5 μ l (upravit dle koncentrace plasmidu, 1 μ g do reakce)
- 10x transkripční pufr 2 μ l
- 10mM ATP 1 μ l
- 10mM CTP 1 μ l
- 10mM GTP 1 μ l
- neznačené UTP (200 μ M) 1 μ l
- ³⁵S-UTP (1250mCi/mmol) 5 μ l
- RNA polymeráza (SP6/T7/T3) 2 μ l

Promíchat pipetou, inkubovat 60 minut při 37°C v termobloku
Přidat 1 µl DNázy I, inkubovat 20 minut při 37°C v termobloku
Zastavit reakci přidáním 1 µl sterilní 0,5M EDTA (pH 8,0)
Purifikace radioaktivně značenépróby pomocí kolonek Clontech (Chromaspin),
centrifugace (5 min, 700 RCF)
Uložit do dalšího použití v -80°C

5. Stanovení inkorporace ³⁵S-UTP:

- k 1 µl značené ribopróby přidat 19 µl DEPC H₂O
- připravit Whatman GF/A filtry (Sigma) různého tvaru, 4 ks pro každou ribopróbu
- na každý filtr napipetovat 2 µl ředěné próby, po zaschnutí 2 filtry vložit do scintilační zkumavky s 10 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus (= total)
- zbývající filtry – odmytí volných NTPs: promytí 20 ml 10% TCA (4°C), 3x 5 minut
- promytí 20 ml 96% EtOH (4°C), 5 minut
- vysušení filtrů, vložení do 10 ml Rotiszint eco plus scintilačního roztoku (= wash)
- analýza vzorků pomocí scintilačního detektoru, poměr wash cpm / total cpm udává procenta inkorporace ³⁵S-UTP do cRNA sondy

4.3.3.2 Prehybridizace

Pracovní roztoky:

DEPC H₂O – 1 ml diethylpyrokarbonátu na 1 litr dH₂O

DEPC-PBS: 8,77 g NaCl + 0,36 g Na₂HPO₄ v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 7,4

4% PFA: 20 g paraformaldehydu v 500 ml DEPC H₂O, rozpuštěno zahřátím na 65°C, pH upraveno na 7,4; vždy čerstvý roztok

0,2M HCl: 16,67 ml HCl (12N, 36,97%) v 1 litru DEPC H₂O

0,1M TEA: 18,57 g trietanolaminu v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 8,0; vždy čerstvý roztok

pro acetylaci použít 1 ml acet anhydridu na 400 ml TEA

70% EtOH: 350 ml 96% EtOH + 130 ml DEPC H₂O

Metoda:

Skla s mozkovými řezy nejprve vyjmuta z -80°C , sušena 20 minut při pokojové teplotě a naskládána do sterilních stojanů. Celý postup probíhá při pokojové teplotě,

stojany se skly přemísťovány do kyvet se 400 ml příslušného roztoku.

Postup:

- fixace: 4% PFA v DEPC-PBS, 40 minut
- 2x promytí v DEPC-PBS po 5 minutách
- deproteinace: 0,2N HCl, 5 minut
- promytí v DEPC-PBS, 5 minut
- inkubace v 0,1M TEA, 2 minuty, třepat
- acetylace: 0,25% acet anhydrid v TEA, 10 minut, třepat
- promytí v DEPC-PBS, 5 minut
- dehydratace: 70% EtOH, 5 minut; 96% EtOH, 5 minut
- skla se nechají oschnout při pokojové teplotě a jsou připravena k následné hybridizaci

4.3.3.3 Hybridizace

Pracovní roztoky:

- deionizovaný deionizovaný formamid: 50 ml formamidu + 2,5 g mixed bed resine (Bio-Rad), 30 minut míchat, filtrace přes 0,22 μm filtr, uchovávat v -20°C
- 20x SSPE: 40 ml DEPC H_2O + 12,62 g NaCl + 1,66 g NaH_2PO_4 + 2,4 ml EDTA (0,5M, pH 8,0), promíchat, doplnit DEPC H_2O na 60 ml
- 100x Denhardt's: 200 mg BSA + 200 mg Ficoll-400 + 200 mg PVP-360 + 10 ml DEPC H_2O
- kvasinková tRNA: 25 mg tRNA + 1 ml DEPC H_2O
- 10% SDS: 10 g SDS + 100 ml DEPC H_2O , rozpustit zahřátím na 50°C
- 5% NaPPi: 2,5 g pyrofosforečnanu sodného + 50 ml DEPC H_2O , filtrace přes 0,22 μm filtr

- 0,5M DTT: 0,1542 g DTT + 2 ml DEPC H₂O
Hybridizační pufr (HP):
- 25 ml deionizovaný formamid (výsledná koncentrace 10%)
- 5 g dextran sulfát (v.k. 10%)
- 12,5 ml 20x SSPE (v.k. 0,9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA)
- 1 ml 100x Denhardt's (v.k. 0,4% BSA, 0,4% Ficoll, 0,4% PVP)
- 1 ml kvasinkové tRNA (25 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
- 2,5 ml Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
- 0,5 ml 10% SDS (v.k. 0,1%)
- 1 ml 5% NaPPi (v.k. 0,1%)
- doplnit DEPC H₂O do objemu 50 ml

Postup:

- k 1 ml HP přidat 100 µl 0,5M DTT, promíchat
- přidat značenou sondu (množství sondy tak, aby výsledná aktivita byla $2,75 \cdot 10^6$ cpm na 1 ml HP)
- denaturace 5 minut při 85°C
- předehtát HP na hybridizační teplotu 60°C
- 70 µl HP se sondou nanést na krycí sklíčko, přiložit podložní sklo s řezy
- hybridizace v hybridizačním boxu (vlhčený dvěma uzávěry scintilačních lahvíček naplněnými DEPC-H₂O) zabaleném do alobalu 20-24 hodin při 60°C

4.3.3.4 Post-hybridizační odmytí nenavázané próby

Pracovní roztoky:

- 20x SSC: 175,3 g NaCl + 88,2 g citrát sodný v 1 litru dH₂O, pH upravit na 7,0
- 2x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 200 ml 20x SSC + 20 ml 5% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1776 ml dH₂O
- 0,1x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 10 ml 20x SSC + 20 ml 0,05% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1996 ml dH₂O
- 1M Tris-HCl: 60,55 g Trizma base + 400 ml dH₂O + 21 ml HCl, pH upravit na 8,0,

doplnit dH₂O do 500 ml

- RNázový pufr: 29,2 g NaCl + 990 ml dH₂O + 10 ml tris-HCl (pH 8,0)
- RNáza A (20 mg/ml): 20 mg lyofilizovaná RNáza + 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), povaření zbaví RNázu stopové DNázové aktivity
- 96% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 400 ml 96% EtOH
- 70% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 292 ml 96% EtOH + 108 ml dH₂O

Postup:

V tkáňových řezech došlo k hybridizaci značené ribopróby s přirozeně transkribovanou mRNA. Přebytečná próba byla odstraněna, aby bylo zabráněno její nespecifické vazbě. Ze skel byla opatrně odstraněna krycí sklíčka odmytím v 2xSSC a byla naskládána do stojanů.

Odmývání bylo prováděno v 400ml kyvetách, jednotlivé roztoky jsou uvedeny níže v posloupnosti odmývací řady:

- 2x SSC, 30 minut, RT
- RNáza A v pufru (10 µg/ml), 60 minut, 42°C, vodní lázeň
- 2x SSC, 30 minut, RT
- 0,1x SSC, 2x 30 minut, odmývací teplota dle teploty hybridizace (±60°C)
- 0,1x SSC, 2x 20 minut, RT
- 70% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT
- 96% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT

Skla se nechala oschnout a vyskládala se do autoradiografické kazety. Potmě byl na skla přiložen vysokocitlivý film Kodak BioMax MR. Film se nechal exponovat při -20 °C po dobu 10 dní. Filmy byly vyvolány na automatickém přístroji Optimax x-ray processor.

Přítomnost a poloha SCN na radiografickém filmu byla detekována pomocí porovnání obrazu na filmu s histologicky obarvenými mozkovými řezy na sklech. Řezy na sklech byly proto obarveny kresylovou violetí a byly z nich připraveny trvalé preparáty. Skla byla obarvena postupně v kyvetách s následujícími roztoky:

- xylen 5 minut
- 95% EtOH 2x 3 minuty
- 70% EtOH 3 minuty
- dH₂O 1 minuta
- 0,25% kresyl-violet' 2 minuty
- dH₂O 2x 15 sekund
- CV diferenciál 1 minuta
- 70% EtOH 30 sekund
- 95% EtOH 2x 30 sekund
- xylen 2x 30 sekund

Skla byla poté zakápnuta DPX histologickým balzámem a překryta krycím sklíčkem.

4.3.3.5 Analýza hybridizačního signálu

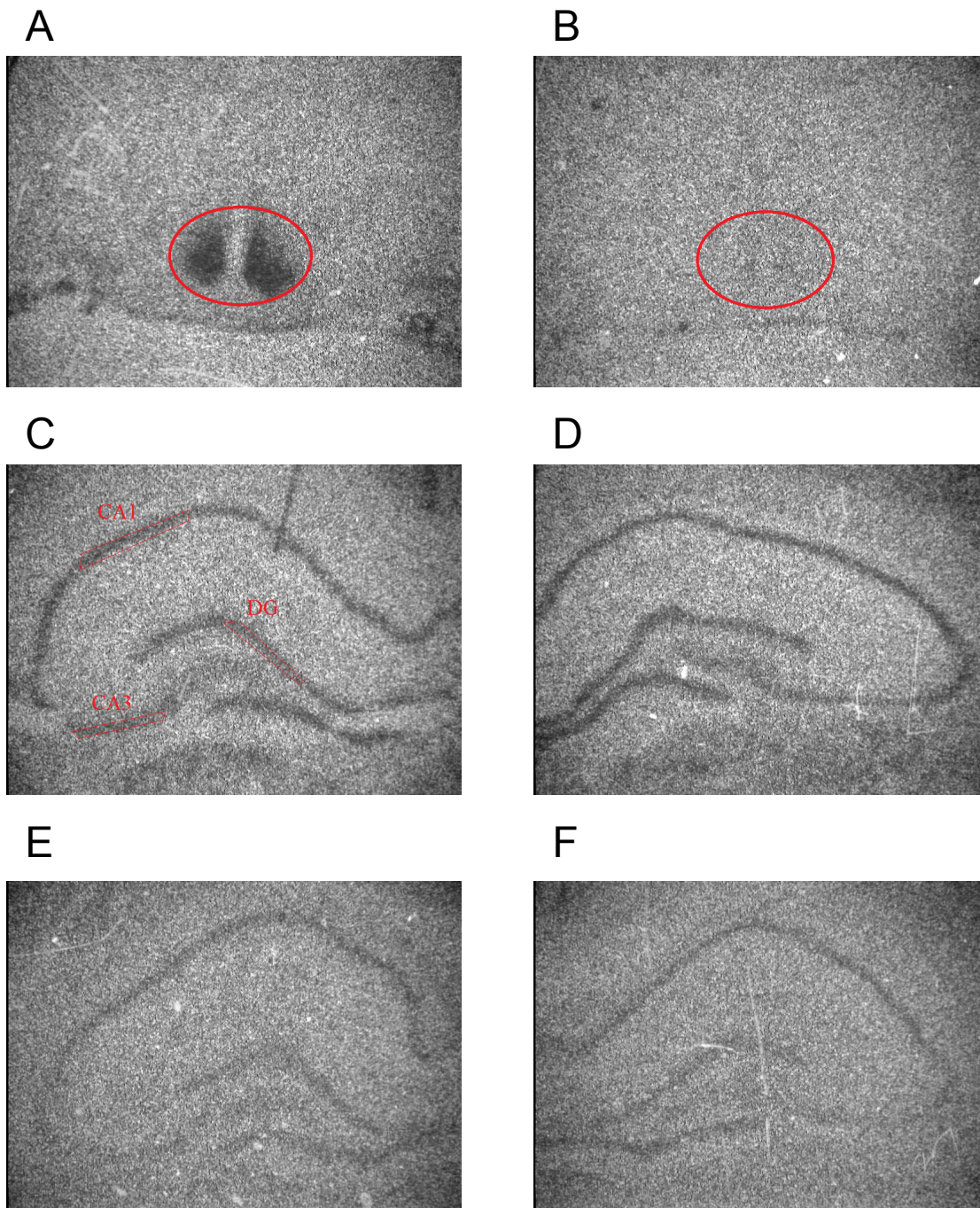
Suprachiasmatická jádra

Z každého mozku byl vybrán reprezentativní řez s nejsilnějším signálem, obsahující mediálně-kaudální část SCN (určeno ze skel podbarvených kresyl-violetí), který byl vyhodnocen pomocí digitální analýzy obrazu (program Microlmage, Olympus). Nejprve byl signál na filmu nasnímán černobílou kamerou Sony připojenou na stereomikroskop a poté byla změřena intenzita signálu jako relativní optická denzita (OD). Kromě OD SCN byla vždy změřena i OD pozadí, která pak byla od hodnot OD SCN odečtena. Výsledné hodnoty jsou průměrem OD levého a pravého SCN. Každý časový bod je pak průměrem z tří až pěti zvířat. Ukázka filmů na obr. 5.

Hipokampus

Z každého mozku byly vybrány dva reprezentativní řezy s nejsilnějším signálem a neporušeným hipokampem, obsahující jasně naznačené oblasti CA1, CA3 a DG hipokampu (kontrola podle řezů obarvených kresyl-violetí), které byly vyhodnoceny stejnou metodou jako řezy suprachiasmatických jader. Výsledné hodnoty jsou průměrem OD dvou levých a dvou pravých oblastí CA1, CA3 a DG hipokampu v jednom mozku. Každý časový bod je průměrem ze tří až pěti zvířat.

Ukázka filmů na obr. 5.



Obrázek 5.: Ukázka filmů SCN a hipokampu s vysokou (A) SCN, C) a D) hipokampus) či nízkou (B) SCN, E) a F) hipokampus) hladinou genové exprese. Červeně jsou vyznačeny cílové oblasti.

4.4 Sledování real-time *Bmal1/Per2-luc* reportérového systému v luminometru

Lumicycle 32 je vybavený 4 fotonásobiči (Hamamatsu) a karuselem na vzorky. Využívá luminometrii k real-time detekci fotonů, které vyzařují buňky exprimující enzym luciferázu, která produkuje oxyluciferin a světlo ze substrátu luciferinu za spotřeby ATP. Exprese luciferázy byla u buněčných linií SW620 a NIH3T3 závislá na promotorech genu *Bmal1* (SW620) či *Per2* (NIH3T3). Luminometr byl umístěn v inkubátoru udržujícím uvnitř teplotu 37°C. Živé buňky exprimující Luc rostou během analýzy ve vlhkotěsně uzavřených 35mm Petriho miskách se specializovaným vzduchem pufovaným médiem (AIR médium) obsahujícím luciferin.

Výstup z luminometru je získán v podobě semikontinuálního luminiscenčního signálu (fotony za sekundu, counts/sec), který je normalizován metodou klouzavého průměru (running average = 24h) a následně proložen tlumenou sinusoidní křivkou (damped sin fit). Díky tomu lze v definovaném intervalu (zde 48-120 h, kde T = 0 je začátek analýzy a T = 23 je okamžik přidání aktivní látky) pomocí metody nejmenších čtverců změřit délku vnitřní periody (τ) a velikost amplitudy oscilací. Všechny kalkulace byly prováděny v programu Lumicycle Analysis (Actimetrics, USA).

Před sledováním exprese luciferázy buněčných linií SW620 a NIH3T3 bylo nutné buňky rozmrazit a následně kultivovat do konfluence po několika pasážích.

4.4.1 Kultivace a pasážování buněčných kultur

4.4.1.1 Kultivace buněk

Buňky buněčných linií SW620 a NIH3T3 byly kultivovány za teploty 37°C v 75 ml kultivační nádobě (Sigma-Aldrich). Buňky rostly v DMEM médiu s 10% sérem s příměsí antibiotika (SW620 blastocidin 5 $\mu\text{g/ml}$, NIH3T3 100 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin). Při dosažení vysoké konfluence byly pasážovány trypsinizací. Během analýzy v luminometru rostly buňky v petriho miskách s AIR médiem bez příměsí antibiotika.

Materiál a vybavení:

Přístroje:

Laminární flow box (Clean Air)

Inkubátor (Sayno)

Lumicycle 32 (Actimetrics)

Optický mikroskop (Olympus)

Chemikálie:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1000 mg/L glucose) (Sigma-Aldrich)

Phosphate buffered antne (PBS) (Sigma-Aldrich)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

Glutamax (Life technologies)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich)

Antibiotika (hygromycin, blasticidin) (Sigma-Aldrich)

Hydrogenuhlčitan sodný (Sigma-Aldrich)

Glukóza (Sigma-Aldrich)

Penstrep (směs penicilinu a streptomycinu) (Sigma-Aldrich)

HEPES (Sigma-Aldrich)

Luciferin (Promega)

Dow Corning high-vacuum silicone grease (Sigma-Aldrich)

Pracovní roztoky:

AIR médium (pro kultivaci buněk s *Luc* reportérovým genem v lumicyclu)

- 4,15 g DMEM v prášku
- 0,175 g hydrogenuhlčitan sodný
- 2,25 g glukóza
- 5 µl 1M HEPES
- 500 ml redestilovaná voda

Přefiltrovat

- na 50 ml média přidat 5 ml FBS + 0,5 ml glutamax + 50 µl luciferinu

4.4.1.2 Trypsinizace

Trypsinizace je metoda pasážování konfluentních buněčných kultur, aby se zabránilo jejich nadměrnému růstu a umírání. Trypsin je enzym, který v kultuře štěpí proteiny extracelulární matrix a tím oslabí adhezi buněk k povrchu kultivační nádoby. Po působení trypsinu se dají buňky odsát společně s médiem a následně zředit na požadovaný poměr.

Postup:

- Buňky v 75 cm² kultivační nádobě vyndat z inkubátoru
- Ve flow boxu odsát médium
- Povrch kultivační nádoby propláchnout 8 ml PBS a odsát
- Napipetovat na povrch kultivační nádoby cca. 3 ml trypsinu
- Poklepem či kroužením s nádobou zajistit, aby trypsin pokryl celý povrch a nechat cca. 15 sekund působit
- Odsát trypsin, kultivační nádobu vrátit do inkubátoru
- Po 10 – 15 minutách vyndat nádobu z inkubátoru a pod optickým mikroskopem ověřit ztrátu adheze buněk v povrchu nádoby
- Pokud buňky nepřiléhají k povrchu, napipetovat do nádoby médium a odsát požadované množství k dosažení vyředění kultury
- Doplnit médium do 14 ml

4.5 Postup stanovení hladin mRNA hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erbα a Bmal1 a hodinami kontrolovaných genů HLF a TEF pomocí metody RT-qPCR

RT-qPCR je metoda umožňující detekovat pomocí specifických primerů množství cDNA v reakci. cDNA pro reakci je získaná reverzní transkripcí mRNA izolované z buněk kultivovaných a pasážovaných podle protokolu viz. Kapitola 4.4.1.1. „Kultivace buněk“ a 4.4.1.2. „Trypsinizace“.

Ke stanovení hladin mRNA vybraných genů člověka, potkana a myši byly použity primery viz. tabulka 1, 2, 3. Jako vnější standard byla použita referenční cDNA, ze které byla připravena ředící řada (300x, 100x, 30x, 10x a 3x) a kalibrační přímka pro odečet relativních hladin mRNA jednotlivých genů. Hladiny cílových genů byly normalizovány ke geometrickému průměru hladin referenčních genů.

Materiál a metody:

Přístroje:

LightCycler ViiA7 Real-Time PCR System (Life Technologies)

Mastercycler Pro Eppendorf

Flow-box BIOAIR Instruments Aura mini

Nanodrop Spektrofotometer ND-1000 (Thermo Scientific)

Centrifuga Hermile Z 300

Centrifuga Eppendorf Mini Spin plus

Termoblok Biometra TB1

Horizontální elektroforéza OminiBio

Chemikálie:

RNAlater (Qiagen)

Agaróza (Top-Bio)

70% etanol

H₂O bez Rnáz (Qiagen)

H₂O bez RNáz a Dnáz (Sigma-Aldrich)

Gel Red (Sigma-Aldrich)

β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

Kity:

RNeasy mini kit (Qiagen):

- pufr RLT
- pufr RW1
- pufr RPE
- H₂O bez RNáz

SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen):

5X VILO Reaction Mix (reakční směs):

- náhodné primery
- MgCl₂
- směs dNTPs

10X SuperScript Enzyme Mix (směs enzymů) :

- SuperScript III reverzní transkriptáza
- RNaseOUT rekombinantní inhibitor ribonukleázy
- pomocný protein

Express SYBR Green ER (Invitrogen)

On-Column Dnase I Digestion Set (Sigma-Aldrich)

- DNase I stock solution
- Dnase digest pufr

4.5.1 Izolace celkové RNA z buněčné kultury

Před začátkem izolace je třeba smíchat pufr RLT s β -merkapt ethanol (na 1 ml pufru RLT připadá 10 μ l β -merkapt ethanolu) a naředit pufr RPE 4x čistým 96-100% EtOH.

Postup:

1. Odsát vývěvou médium z misky konfluentní kultury
2. Do misky s kulturou napipetovat 350 μ l RLT pufru, důkladně seškrábnout
3. Lyzát z misky přepipetovat do sterilní zkumavky
4. Homogenizovat lyzát několikanásobným nasátím a vypuštěním injekční stříkačky s drobnou jehlou (průměr 0,9 mm)
5. K 350 μ l buněčného lyzátu přidat stejný objem 70 % EtOH, řádně promíchat pipetou a hned napipetovat do kolonky umístěné ve zkumavce
6. Centrifugovat na kolonce 15 vteřin na nejvyšší otáčky
7. Vylít roztoky ve zkumavce a zkumavku opět nasadit na kolonku
8. Do kolonky umístěné ve zkumavce napipetovat 700 μ l pufru RW1, opakovat krok 6. a 7.*
9. Do kolonky umístěné ve zkumavce napipetovat 500 μ l pufru RPE, opakovat krok 6. a 7.
10. Do kolonky umístěné ve zkumavce napipetovat 500 μ l pufru RPE, centrifugace 2 min na max. otáčkách, vylít roztok ze zkumavky a zopakovat centrifugaci 1 min na sucho na max otáčkách.
11. Vložit kolonku do nové zkumavky s ustříhlým víčkem a přidat 40 μ l vody bez RNáz.
12. Centrifugace 1 min na max otáčkách (RNA v roztoku ve zkumavce)
13. Roztok s RNA napipetovat do kolonky, nechat stát 2 min. Centrifugace 1 min na max. otáčkách.
14. Vyhodit kolonku, RNA v roztoku.
15. Koncentrace a čistota RNA stanovena na Spektrofotometru.
16. Vyizolovanou RNA skladovat v - 80°C.
17. Kvalita celkové RNA stanovena na 1% agarózovém gelu

*Při štěpení DNA pomocí DNázy se neprovádí tento krok, místo toho je třeba se řídit následujícím postupem:

- Do kolonky umístěné v zkumavce napipetovat 350 µl pufru RW1, opakovat krok 6. a 7.
- Smíchat 10µl DNase stock solution se 70 µl DNase digest pufru na jednu reakci a jemně promíchat převrácením zkumavky
- Přidat 80 µl inkubačního roztoku na membrány kolonky a za pokojové teploty inkubovat 15°C
- Do kolonky umístěné ve zkumavce napipetovat 350 µl pufru RW1, opakovat krok 6. a 7.
- Pokračovat krokem 9. v protokolu „Izolace celkové RNA z buněčné kultury“

4.5.1.1 Izolace celkové RNA ze vzorků distálního kolonu

Po uvedení zvířete do celkové narkózy a jeho dekapitaci byl odebrán distální kolon nad pánevní oblastí. Tento vzorek tkáně byl propláchnut pomocí injekční stříkačky naplněné PBS a poté podélně rozříznutý. Z rozříznutého kolonu byly jemně seškrábány epiteliální buňky mukózní membrány, které byly ponořeny do RNAlater stabilizačního roztoku a uchovávány v teplotě -80°C do další manipulace.

Postupu izolace RNA pomocí RNeasy mini kitu přecházela homogenizace tkáně pomocí ultrazvukového sonikátoru, homogenizovaná tkáň byla po centrifugaci resuspendována v 600 µl RLT pufru a znovu zcentrifugována. Do zkumavky bylo poté přidáno 600 µl 70% EtOH a po promíchání bylo 700 µl roztoku přepipetováno do kolonky umístěné ve zkumavce.

Dále se pokračovalo od kroku 6. postupu „Izolace celkové RNA z buněčné kultury“. Ve tkáňových vzorcích kolonu potkana nebylo provedeno štěpení DNA pomocí DNázy.

4.5.2 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA z izolované RNA je získaná RNA naředěna na koncentraci 200 ng/μl

Reakční směs pro reverzní transkripci (10 μl):

- 5X VILO Reaction Mix 2 μl
- 10X SuperScript Enzyme Mix 1 μl
- RNA 2 μl
- H₂O bez Rnáz a DNáz 5 μl

1. 5X VILO reakční směs smíchat s 10X SuperScript směsí enzymů a ddH₂O bez Rnáz a DNáz v odpovídajícím reakčním poměru.
2. Rozpipetovat do jednotlivých zkumavek.
3. Do jednotlivých zkumavek přidat 4 μl RNA odpovídajícího vzorku.
4. Inkubace 10 min při pokojové teplotě (25°C).
5. Inkubace 60 min v termobloku při 42°C.
6. Inkubace 5 min v termobloku při 85°C.
7. 5 min zchladit na ledu a 5 s centrifugace.
8. cDNA naředit v poměru 1:9 ddH₂O bez Rnáz a Dnáz, uskladňovat v -20°C

4.5.3 PCR

Do 96-jamkové destičky je třeba napipetovat reakční směs pro RT-qPCR reakci (14 μ l):

- SYBR GreenER Express 7 μ l
- H₂O bez Rnáz a DNáz 4,65 μ l
- Forward + reverse primery (ředění 10 μ M) 0,35 μ l
- Templát – cDNA 2 μ l

1. Dle počtu reakcí smíchat SYBR Green, H₂O bez Rnáz a DNáz a primery v odpovídajícím reakčním poměru a pipetovat po 12 μ l do jednotlivých jamek.

2. Do jamek přidat 2 μ l cDNA odpovídajícího vzorku.

3. Přelepiti destičku fólií.

4. Vložit destičku do Light Cycleru Vii7 a spustit reakci podle cyklického programu:

a) Počáteční denaturace: 95°C 15min

b) Amplifikace – 50 cyklů:

Denaturace 94°C 15s

Reasociace 60°C 20s

Extenze 72°C 10s

c) Melting curve (křivka tání)* 95°C 5s

65°C 1min

97°C

d) Ochlazení 40°C 10s

* Analýza křivky tání umožní kontrolu přítomnosti případných nespecifických produktů. V našem případě byly výsledky negativní.

4.6 Statistická analýza

Data byla vyhodnocena základními statistickými metodami:

- aritmetický průměr: $\bar{x} = \sum x_i / n$
- směrodatná odchylka: $SD = [(1/n - 1) * \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}$
- střední chyba průměru: $S.E.M. = SD/n^{1/2}$

Přítomnost cirkadiánního rytmu v expresi vybraných hodinových genů byla testována pomocí cosinorové analýzy. Cosinorová analýza je metoda umožňující testovat hypotézu, že experimentální data lze fitovat na cosinovou křivku pomocí nelineární regrese podle rovnice:

$$Y = \text{Mesor} + (\text{Amplitude} * \cos(2 * \pi * (X - \text{Acrophase}) / \text{Wavelength}));$$

kde mesor je průměrná hodnota dat, kolem které sinusoida osciluje, amplituda je rozdíl mezi maximální hodnotou a průměrem, akrofáze je fáze maxima cosinové křivky a wavelength je definována jako 24 hodin. Analýza umožňuje stanovení hodnot R^2 (goodness of fit) a hladiny významnosti p . Pokud je $p < 0,05$, sledovaný profil odpovídá více cosinové křivce než horizontální linii a vykazuje tak cirkadiánní rytmus. Profily s hodnotou $R^2 > 0,2$ fitují cosinovou křivku a vykazují cirkadiánní rytmus.

Statistická významnost rozdílů v profilech exprese genů mezi skupinami a pokusných subjektů byla analyzována pomocí dvojné analýzy variance (ANOVA).

Statistická významnost rozdílů amplitud, akrofází a mesorů 24-hodinových expresních profilů vybraných hodinových genů mezi jednotlivými skupinami v pokusech analyzována pomocí jednoduché analýzy variance (ANOVA) v případě tří skupin či Studentovým T-testem mezi dvěma skupinami pokud oba porovnávané profily měly výsledek cosinové analýzy s p hodnotou $< 0,05$.

5. Výsledky

5.1 Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v oblastech CA1, CA3 a DG hipokampu kontrolních zvířat.

Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* podoblastí hipokampu pro daný gen jsou znázorněny na obrázku 6.

5.1.1 *Per1 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per1* v podoblastech hipokampu CA1, CA3 a DG pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 4,768$; $p = 0,0004$) a statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($F = 100,7$; $p < 0,0001$).

Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu v CA1 ($p_{CA1} = 0,0049$; $R_{CA1} = 0,2828$), CA3 ($p_{CA3} = 0,0372$; $R_{CA3} = 0,2398$) i DG ($p_{DG} = 0,0015$; $R_{DG} = 0,3332$).

Použití metody jednoduché analýzy variance pro porovnání rozdílů parametrů cosinové křivky (akrofáze, amplituda, mezor) prokázalo signifikantní rozdíl mezi podoblastmi v hipokampu v mezoru jejich cosinových křivek ($F = 110,3$; $p < 0,0001$).

5.1.2 *Per2 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per2* v podoblastech hipokampu CA1, CA3 a DG pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 3,526$; $p = 0,0039$) a statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($F = 36,06$; $p < 0,0001$).

Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu v CA1 ($p_{CA1} = 0,0354$; $R_{CA1} = 0,1996$), CA3 ($p_{CA3} = 0,0409$; $R_{CA3} = 0,1863$) i DG ($p_{DG} = 0,002$; $R_{DG} = 0,3483$).

Použití metody jednoduché analýzy variance pro porovnání rozdílů parametrů cosinové křivky (akrofáze, amplituda, mezor) zjistilo signifikantní rozdíl mezi podoblastmi v hipokampu v mezeru jejich cosinových křivek ($F = 37,73$; $p < 0,0001$).

5.1.3 Rev-Erba mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Rev-Erba* v podoblastech hipokampu CA1, CA3 a DG pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 20,92$; $p < 0,0001$) a statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($F = 78,02$; $p < 0,0001$).

Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu v CA1 ($p_{CA1} = 0,0001$; $R_{CA1} = 0,4509$), CA3 ($p_{CA3} = 0,0003$; $R_{CA3} = 0,4215$) i DG ($p_{DG} = 0,0002$; $R_{DG} = 0,4372$).

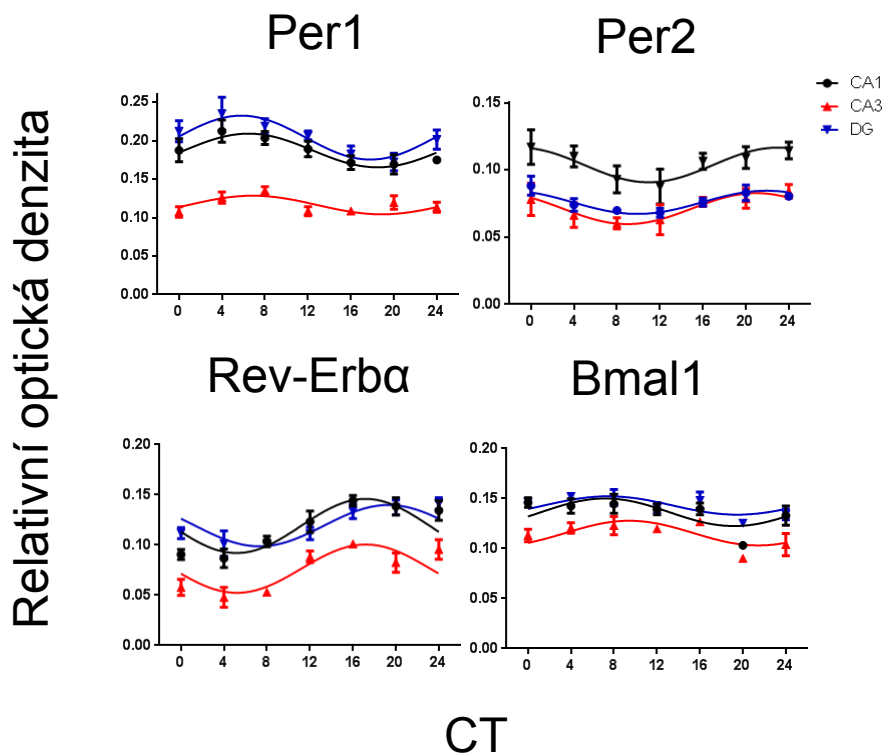
Použití metody jednoduché analýzy variance parametrů pro porovnání rozdílů cosinové křivky (akrofáze, amplituda, mezor) zjistilo signifikantní rozdíl mezi podoblastmi v hipokampu v mezeru jejich cosinových křivek ($F = 55,06$; $p < 0,0001$).

5.1.4 Bmal1 mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Bmal* v podoblastech hipokampu CA1, CA3 a DG pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 10,84$; $p < 0,0001$) a statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($F = 38,44$; $p < 0,0001$).

Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu v CA1 ($p_{CA1} = 0,0264$; $R_{CA1} = 0,2216$), CA3 ($p_{CA3} = 0,0146$; $R_{CA3} = 0,2386$) i DG ($p_{DG} = 0,0419$; $R_{DG} = 0,1798$).

Použití metody jednoduché analýzy variance pro porovnání rozdílů parametrů cosinové křivky (akrofáze, amplituda, mezor) zjistilo signifikantní rozdíl mezi podoblastmi v hipokampu v mezeru jejich cosinových křivek ($F = 25,80$; $p < 0,0001$).



Obrázek 6.: Denní profily mRNA hodinových genů v CA1, CA3 a DG hipokampu SHAM samců potkana Wistar. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat ± S.E.M.

Souhrn výsledků: Analýza denních profilů exprese vybraných hodinových genů v jednotlivých podoblastech hipokampu SHAM potkanů prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu v těchto hodinových genech v každé z podoblastí. Výsledky dvojnásobné analýzy variance dat a jednoduché analýzy variance parametrů cosinových křivek dále ukázaly, že jednotlivé podoblasti hipokampu se mezi sebou v expresi hodinových genů liší. Nejvyšší hladina genové exprese byla zjištěna v podoblasti CA1 u všech genů. Podoblast CA3 naopak vykazovala nejnižší hladinu genové exprese u genů *Per1*, *Rev-Erba* a *Bmal1*. Exprese v DG byla pro geny *Per1*, *Rev-Erba* a *Bmal1* významně vyšší než u CA3. Pro gen *Per2* byla exprese v CA3 a DG srovnatelná a významně nižší než v CA1.

5.2 Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN a hipokampu ADX a SHAM potkanů

5.2.1 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v SCN

Denní profily exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN potkanů obou skupin jsou znázorněny na obrázku 7.

5.2.1.1 *Per2 mRNA*

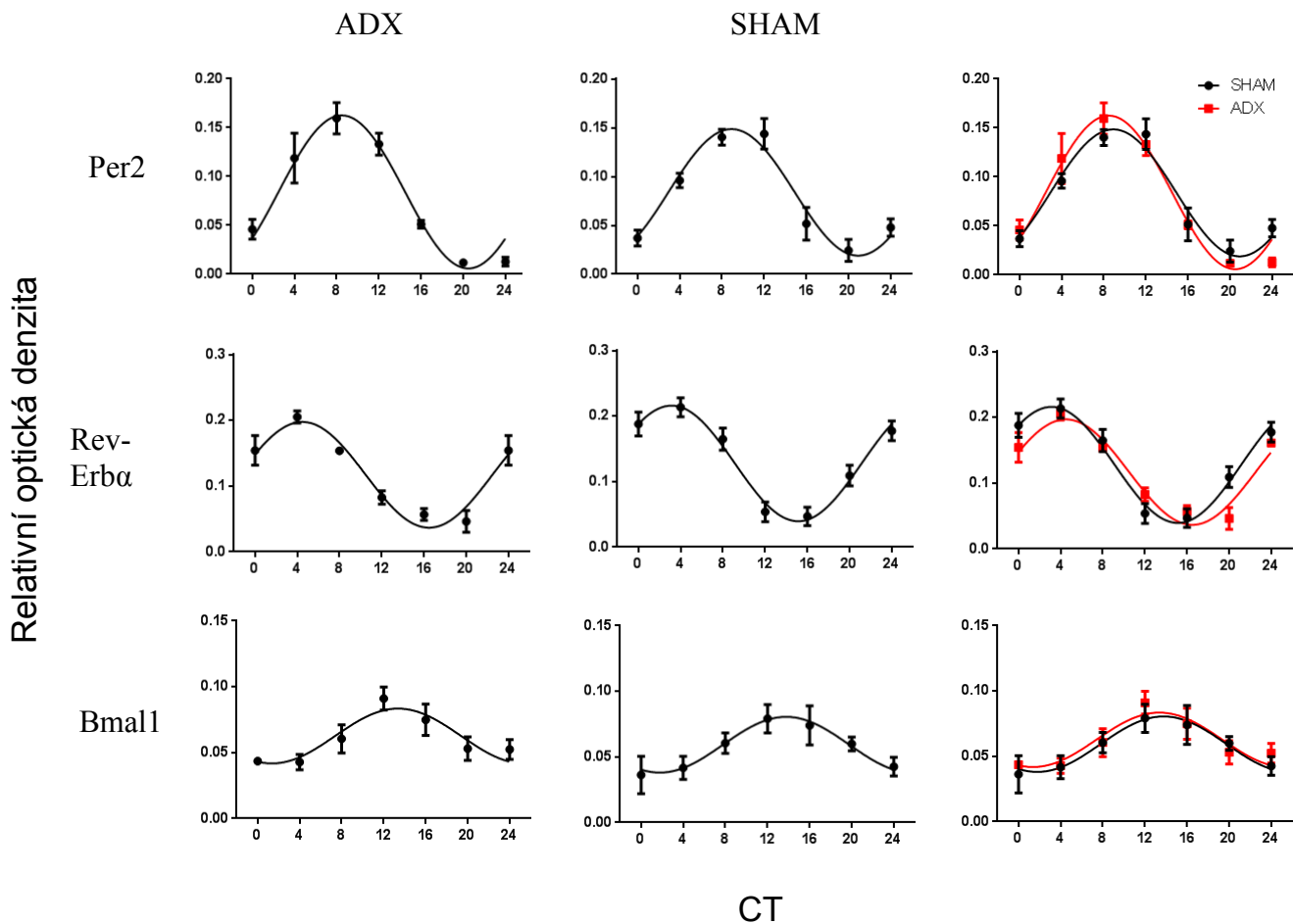
Porovnání profilů exprese genu *Per2* v SCN ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 32,12$; $p < 0,0001$), ne však významný rozdíl mezi skupinami ($F = 0,02256$; $p = 0,8812$). Cosinorová analýza prokázala u obou profilů přítomnost cirkadiálního rytmu ($p_{SHAM} < 0,0001$; $R^2_{SHAM} = 0,7645$; $p_{ADX} < 0,0001$; $R^2_{ADX} = 0,7823$).

5.2.1.2 *Rev-Erba mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Rev-Erba* v SCN ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 34,74$; $p < 0,0001$), ne však významný rozdíl mezi skupinami ($F = 2,368$; $p = 0,1310$). Cosinorová analýza prokázala u obou profilů přítomnost cirkadiálního rytmu ($p_{SHAM} < 0,0001$; $R^2_{SHAM} = 0,8134$; $p_{ADX} < 0,0001$; $R^2_{ADX} = 0,7640$).

5.2.1.3 *Bmal1 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Rev-Erba* v SCN ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 6,778$; $p < 0,0001$), ne však významný rozdíl mezi skupinami ($F = 0,5010$; $p = 0,4823$). Cosinorová analýza prokázala u obou profilů přítomnost cirkadiálního rytmu ($p_{SHAM} = 0,0005$; $R^2_{SHAM} = 0,4047$; $p_{ADX} = 0,0003$; $R^2_{ADX} = 0,4213$)..



Obrázek 7.: Denní profily mRNA genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN samců potkana Wistar skupin ADX a SHAM. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin proložené sinusoidní křivkou v jednom grafu; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (SCN) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků: Z výsledků vyplývá, že exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN potkanů nebyla po ADX významně změněná vůči kontrolní skupině.

5.2.2 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v CA1, CA3 a DG hipokampu.

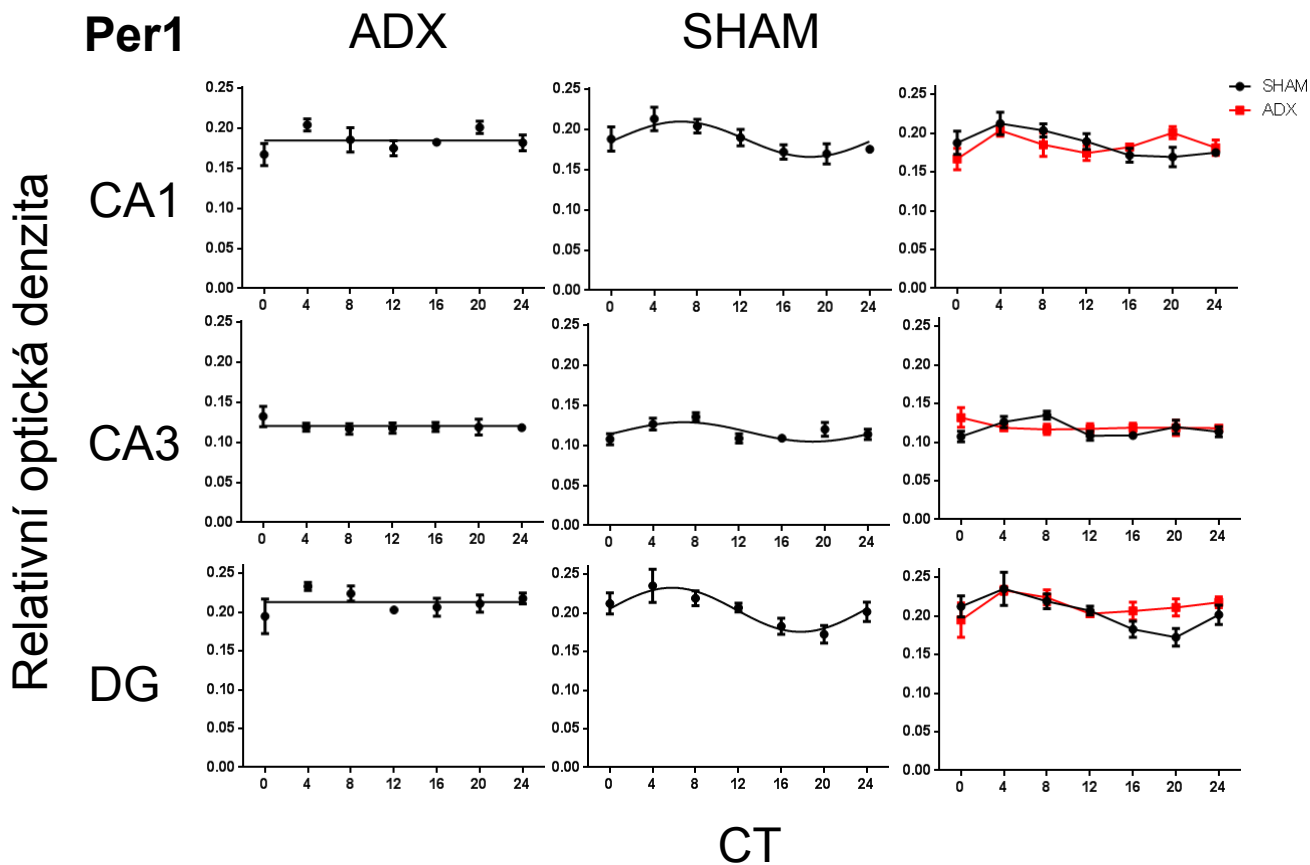
Denní profily exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v CA1, CA3 a DG hipokampu potkanů obou skupin jsou znázorněny na obrázcích 8 (*Per1*), 9 (*Per2*), 10 (*Rev-Erba*), a 11 (*Bmal1*).

5.2.2.1 *Per1* mRNA

Použití metody dvojnásobné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a ADX v případě genu *Per1* neprokázalo signifikantní rozdíl mezi skupinami, ani interakci mezi časem a skupinami.

Cosinorová analýza profilů genové exprese v hipokampu skupiny ADX neprokázala na rozdíl od skupiny SHAM (viz 1.1.) přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Per1* v žádné podoblasti hipokampu. P hodnoty v CA1 ($p_{CA1} = 0,8798$), CA3 ($p_{CA3} = 0,6439$) ani v DG ($p_{DG} = 0,2312$) nedosáhly požadované 5% hladiny pro nabitování cosinové křivky oproti přímce.

Použití metody dvojnásobné analýzy variance pro porovnání exprese v jednotlivých oblastech hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci skupiny ADX zjistilo statisticky významný rozdíl v genové expresi se stejným trendem jako u skupiny SHAM (viz. 5.1) ($p_{ADX} < 0,0001$).



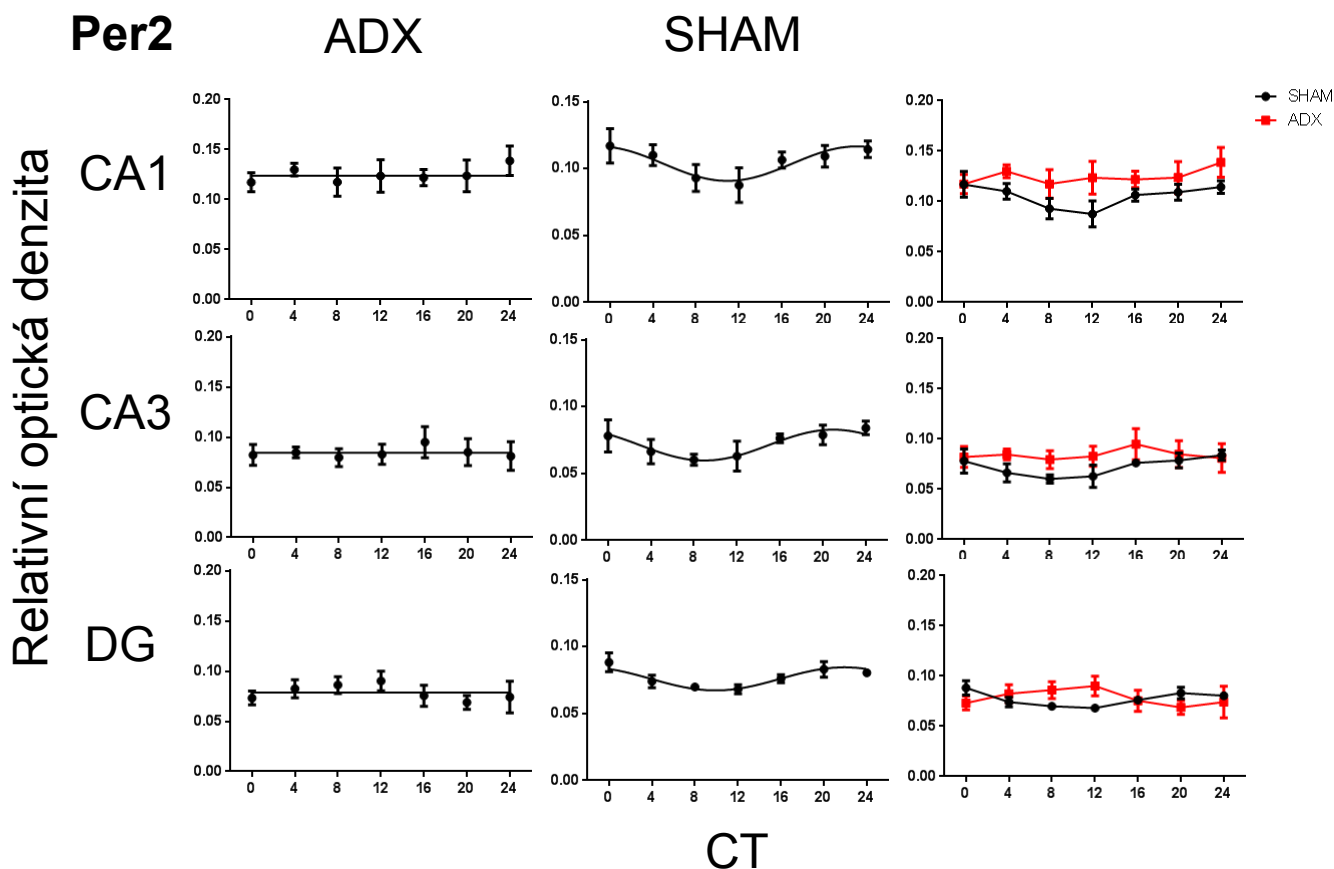
Obrázek 8.:Denní profily mRNA genu Per1 v CA1, CA3 a DG hipokampu samců potkana Wistar po ADX či sham operaci. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou (sloupce ADX a SHAM). Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin v jednom grafu bez vyhodnocení cosinorovou analýzou; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat ± S.E.M.

5.2.2.2 *Per2 mRNA*

Použití metody dvojnásobné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a ADX prokázalo statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami v oblasti CA1 ($p_{CA1} = 0,0024$) a CA3 ($p_{CA3} = 0,029$), ne však v DG ($p_{DG} = 0,7095$).

Cosinorová analýza profilů genové exprese v hipokampu skupiny ADX neprokázala na rozdíl od skupiny SHAM (viz 1.1.) přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Per2* v žádné podoblasti hipokampu. P hodnoty v CA1 ($p_{CA1} = 0,8979$), CA3 ($p_{CA3} = 0,7121$) ani v DG ($p_{DG} = 0,1403$) nedosáhly požadované 5% hladiny pro naitování cosinové křivky oproti přímce.

Použití metody dvojnásobné analýzy variance pro porovnání exprese v jednotlivých oblastech hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci skupiny ADX zjistilo statisticky významný rozdíl v genové expresi se stejným trendem jako u skupiny SHAM (viz. 5.1) ($p_{ADX} < 0,0001$).



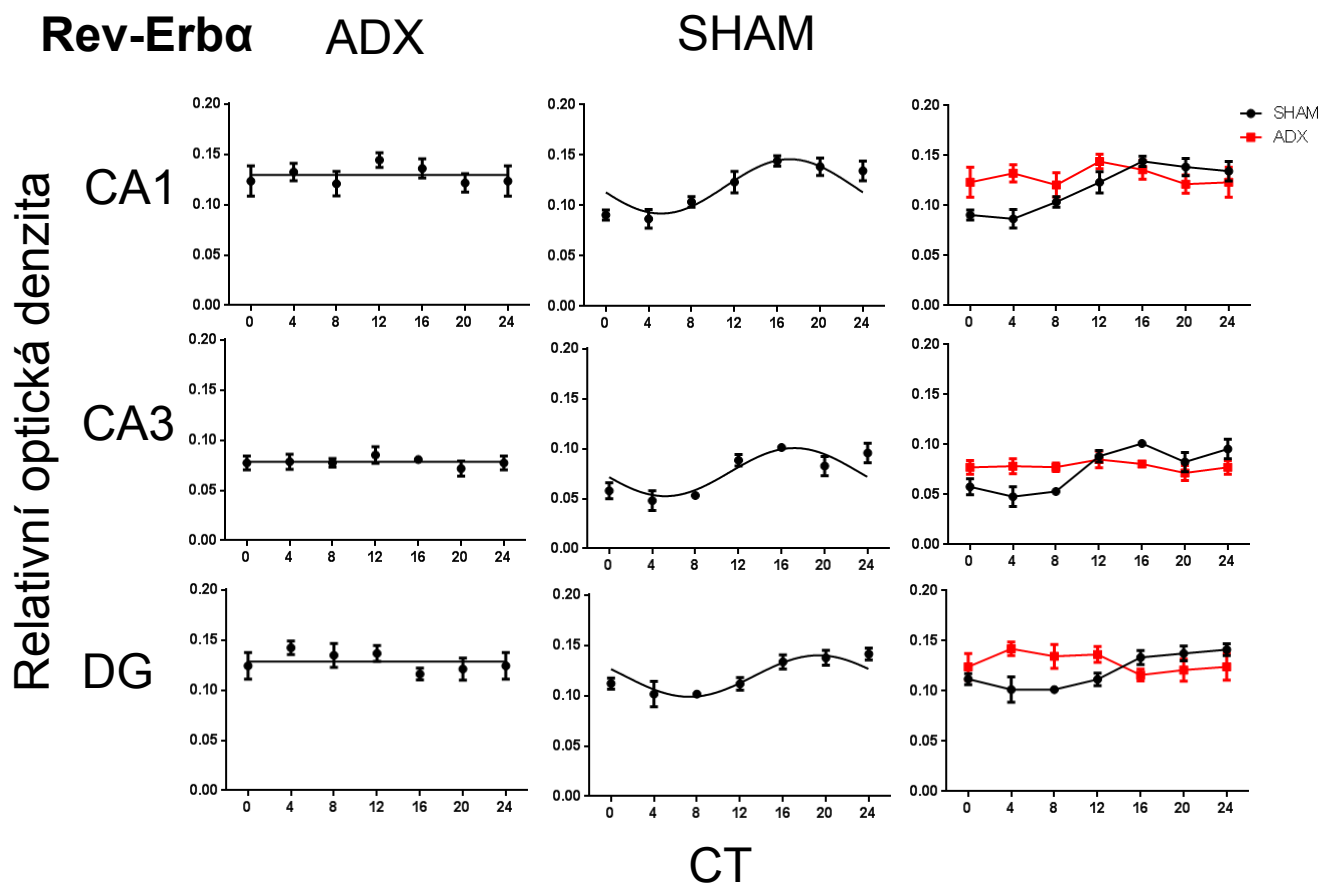
Obrázek 9.: Denní profily mRNA genu *Per2* v CA1, CA3 a DG hipokampu samců potkana Wistar po ADX či sham operaci. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou (sloupce ADX a SHAM). Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin v jednom grafu bez vyhodnocení cosinorovou analýzou; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

5.2.2.3 *Rev-Erba mRNA*

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a ADX prokázalo statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami v oblasti CA1 ($p_{CA1} = 0,0299$), ne však v CA3 ($p_{CA3} = 0,4218$) a DG ($p_{DG} = 0,0676$). Efekt interakce času a skupiny byl signifikantní v CA1 ($p_{CA1} = 0,0099$), CA3 ($p_{CA3} = 0,0009$) i v DG ($p_{DG} = 0,001$).

Cosinorová analýza profilů genové exprese v hipokampu skupiny ADX neprokázala na rozdíl od skupiny SHAM (viz 1.1.) přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Rev-Erba* v žádné podoblasti hipokampu. P hodnoty v CA1 ($p_{CA1} = 0,3650$), CA3 ($p_{CA3} = 0,5120$) ani v DG ($p_{DG} = 0,0904$) nedosáhly požadované 5% hladiny pro naitování cosinové křivky oproti přímce.

Použití metody dvojné analýzy variance pro porovnání exprese v jednotlivých oblastech hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci skupiny ADX zjistilo statisticky významný rozdíl v genové expresi se stejným trendem jako u skupiny SHAM (viz. 5.1) ($p_{ADX} < 0,0001$).



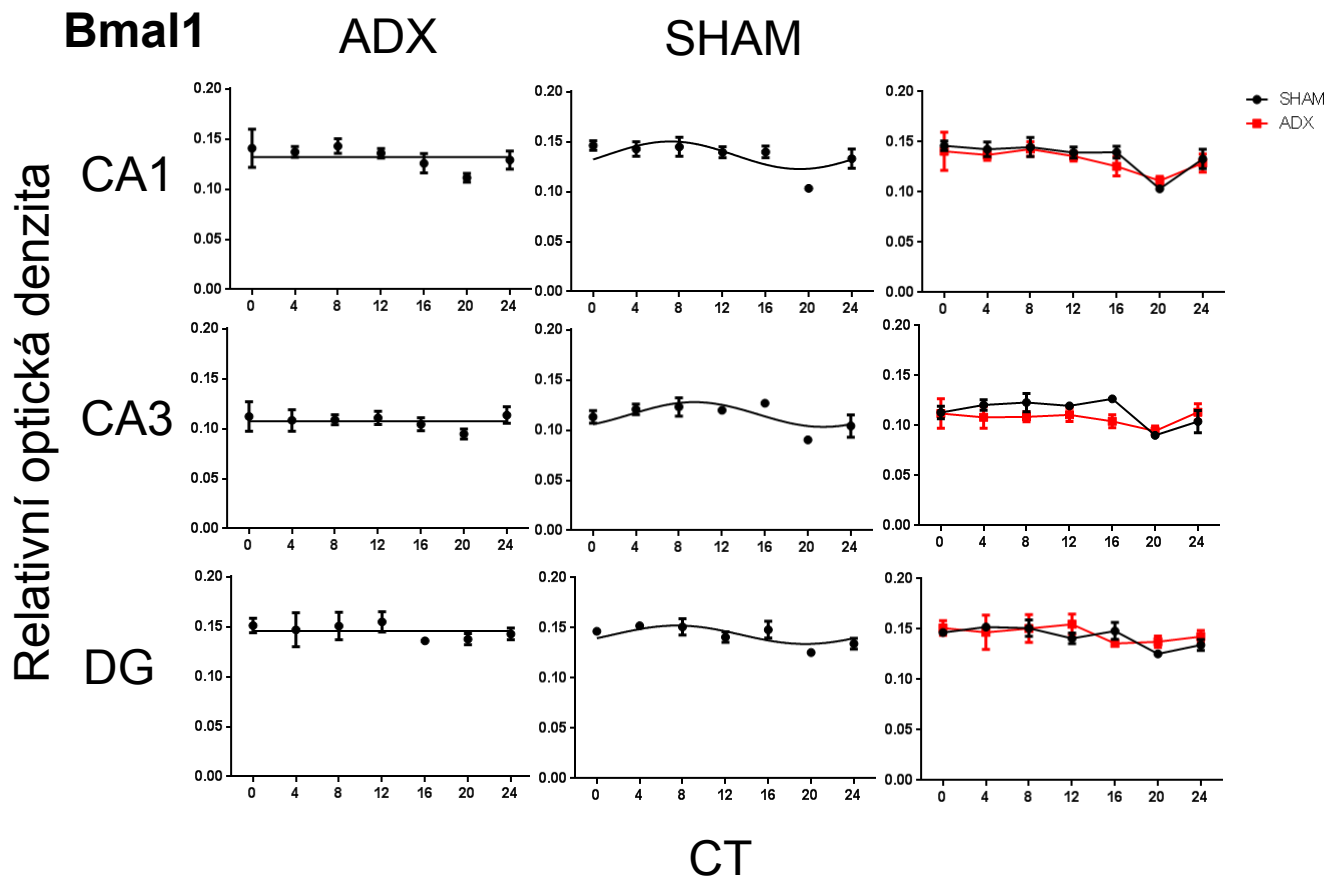
Obrázek 10.:Denní profily mRNA genu *Rev-Erba* v CA1, CA3 a DG hipokampu samců potkana Wistar po ADX či sham operaci. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou (sloupce ADX a SHAM). Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin v jednom grafu bez vyhodnocení cosinorovou analýzou; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

5.2.2.4 *Bmal1 mRNA*

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a ADX v případě genu *Bmal1* neprokázalo signifikantní rozdíl mezi skupinami v závislosti na operaci, ani interakci mezi časem a skupinami.

Cosinorová analýza profilů genové exprese v hipokampu skupiny ADX neprokázala na rozdíl od skupiny SHAM (viz 1.1.) přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Bmal1* v žádné podoblasti hipokampu. P hodnoty v CA1 ($p_{CA1} = 0,0831$), CA3 ($p_{CA3} = 0,5651$) ani DG ($p_{DG} = 0,4312$) nedosáhly požadované 5% hladiny pro naitování cosinové křivky oproti přímce.

Použití metody dvojné analýzy variance pro porovnání exprese v jednotlivých oblastech hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci skupiny ADX zjistilo statisticky významný rozdíl v genové expresi se stejným trendem jako u skupiny SHAM (viz. 5.1) ($p_{ADX} < 0,0001$).



Obrázek 11.: Denní profily mRNA genu *Bmal1* v CA1, CA3 a DG hipokampu samců potkana Wistar po ADX či sham operaci. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou (sloupce ADX a SHAM). Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin v jednom grafu bez vyhodnocení cosinorovou analýzou; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků: Hlavní rozdíl mezi oběma skupinami byl prokázán díky cosinorové analýze. Zatímco u skupiny SHAM vykazovala exprese všech sledovaných genů cirkadiánní rytmus, u skupiny ADX byly tyto rytmy vyrušeny.

Metoda dvojnásobné analýzy variance zjistila signifikantní rozdíly v genové expresi mezi jednotlivými oblastmi hipokampu i v profilech skupiny ADX s obdobnými trendy jako SHAM profily (viz. oddělení 5.1).

Rozdíly v expresi mezi SHAM a ADX skupinami sledované pomocí dvojnásobné analýzy variance byly zjištěny u genů *Per2* a *Rev-Erba*. U genu *Per2* byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami v oblastech CA1 a CA3. U genu *Rev-Erba* vykazovaly všechny tři oblasti signifikantní interakci mezi vlivem času a skupiny. Pro geny *Per1* a *Bmal1* nezjistila dvojnásobná analýza variance žádné rozdíly.

5.3 Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v distálním kolonu ADX a SHAM potkanů

Denní profily exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v distálním kolonu potkanů obou skupin jsou znázorněny na obrázku 12.

5.3.1 *Per1 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per1* v kolonu ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 24,91$; $p < 0,0001$) i významný rozdíl mezi skupinami ($F = 32,28$; $p < 0,0001$). Efekt interakce mezi vlivem času a skupiny byl signifikantní ($F = 7,417$, $p < 0,0001$). Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu u obou skupin ($p_{\text{SHAM}} = 0,0005$; $R^2_{\text{SHAM}} = 0,6427$; $p_{\text{ADX}} = 0,0003$; $R^2_{\text{ADX}} = 0,5970$). Použití Studentova T-testu parametrů cosinových křivek ukázalo signifikantní rozdíl v mesoru ($p_{\text{MESOR}} < 0,0001$; $\text{MES}_{\text{SHAM}} = 1,09 \pm 0,07$; $\text{MES}_{\text{ADX}} = 0,64 \pm 0,03$) a amplitudě ($p_{\text{AMPLI}} < 0,0001$; $\text{AMP}_{\text{SHAM}} = 0,76 \pm 0,10$; $\text{AMP}_{\text{ADX}} = 0,25 \pm 0,04$), významný rozdíl neukázal v akrofázi křivek.

5.3.2 *Per2 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per2* v kolonu ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 18,07$; $p < 0,0001$), ne však významný rozdíl mezi skupinami ($F = 1,58$; $p = 0,7183$). Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu u obou skupin ($p_{\text{SHAM}} < 0,0001$; $R^2_{\text{SHAM}} = 0,6274$; $p_{\text{ADX}} < 0,0001$; $R^2_{\text{ADX}} = 0,5821$). Použití Studentova T-testu parametrů cosinových křivek neukázalo signifikantní rozdíl v mesoru, amplitudě či akrofázi těchto křivek.

5.3.3 *Rev-Erba mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Rev-Erba* v kolonu ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 45,47$; $p < 0,0001$), ne však významný rozdíl mezi skupinami ($F = 0,09823$; $p = 0,7551$). Efekt interakce mezi vlivem času a skupiny byl signifikantní ($F = 6,792$, $p < 0,0001$).

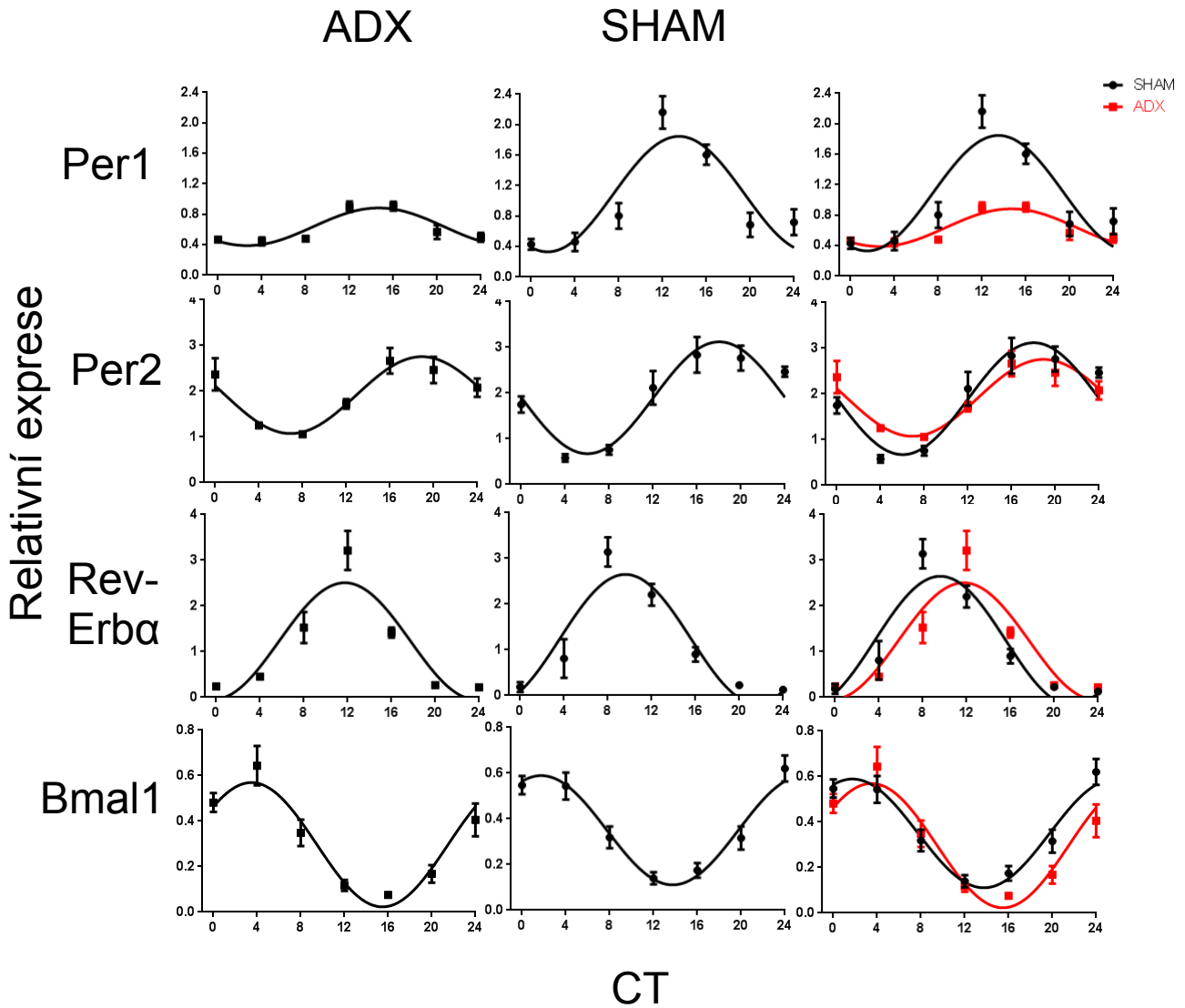
Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu u obou skupin ($p_{\text{SHAM}} < 0,0001$; $R^2_{\text{SHAM}} = 0,7451$ $p_{\text{ADX}} < 0,0001$; $R^2_{\text{ADX}} = 0,7272$). Použití Studentova T-testu parametrů cosinových křivek ukázalo signifikantní rozdíl v akrofázi ($p_{\text{AKRO}} = 0,0008$; $\text{ACRO}_{\text{SHAM}} = 10,39 \pm 0,39$; $\text{ACRO}_{\text{ADX}} = 11,75 \pm 0,47$), významný rozdíl neukázal v případě amplitudy a mesoru.

5.3.4 *Bmal1* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* v kolonu ADX a SHAM zvířat pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 31,69$; $p < 0,0001$) i významný rozdíl mezi skupinami ($F = 5,220$; $p = 0,0260$). Efekt interakce mezi vlivem času a skupiny byl signifikantní ($F = 2,332$, $p = 0,0437$). Cosinorová analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu u obou skupin ($p_{\text{SHAM}} = 0,0005$; $R^2_{\text{SHAM}} = 0,7690$; $p_{\text{ADX}} = 0,0003$; $R^2_{\text{ADX}} = 0,7231$). Použití Studentova T-testu parametrů cosinových křivek ukázalo signifikantní rozdíl v akrofázi ($p_{\text{AKRO}} = 0,0035$; $\text{ACRO}_{\text{SHAM}} = 1,76 \pm 0,40$; $\text{ACRO}_{\text{ADX}} = 3,49 \pm 0,40$) a mesoru ($p_{\text{MESOR}} = 0,0480$; $\text{MES}_{\text{SHAM}} = 0,35 \pm 0,02$; $\text{MES}_{\text{ADX}} = 0,30 \pm 0,02$), významný rozdíl neukázal v amplitudě křivek.

Souhrn výsledků: Výsledky cosinorové analýzy ukazují, že zvířata po ADX měla zachované rytmy v genové expresi vybraných hodinových genů v kolonu. Výsledky dvojnásobné analýzy variance a T-testů parametrů cosinových křivek ukazují na změnu některých parametrů rytmu genové exprese.

Rozdíly v expresi mezi SHAM a ADX skupinami sledované pomocí dvojnásobné analýzy variance se lišily mezi jednotlivými geny. Největší vliv ADX byl detekovaný u genu *Per1*, kde došlo k významnému snížení hladiny genové exprese. Posun fáze genové exprese byl detekován v genech *Rev-Erba* a *Bmal1*, u genu *Bmal1* také došlo ke změně hladiny genové exprese. U genu *Per2* nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami ADX a SHAM.

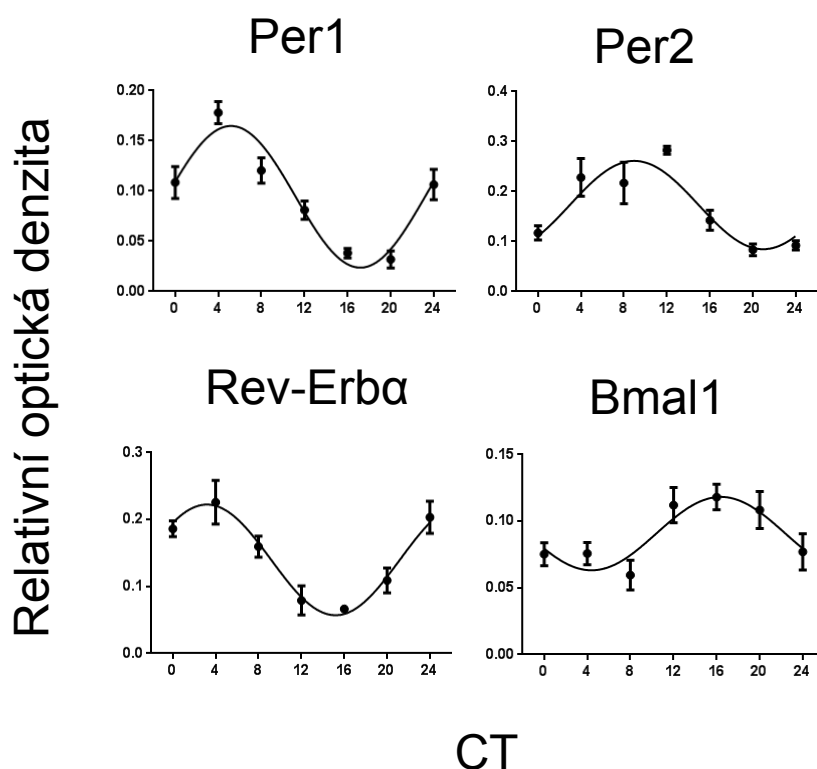


Obrázek 12.: Denní profily mRNA genů *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1* a *Per1* v distálním kolonu samců potkana Wistar po ADX či sham operaci. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Třetí sloupec ukazuje pro porovnání data obou skupin proložené sinusoidní křivkou v jednom grafu; skupina SHAM označena černě a ADX červeně. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní expresi genu v kolonu vůči referenčním genům GAPDH a TBP. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

5.4 Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN a hipokampu potkanů vystavených režimu RF

5.4.1 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v SCN

Denní profily exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1* a *Per1* v SCN potkanů jsou znázorněny na obrázku 13. Pro všechny geny použití cosinorové analýzy prokázalo přítomnost cirkadiálního rytmu ($p_{PER2} < 0,001$; $R^2_{PER2} = 0,5331$) ($p_{REV} < 0,001$; $R^2_{REV} = 0,6870$) ($p_{BMAL1} = 0,0008$; $R^2_{BMAL1} = 0,4635$) ($p_{PER1} < 0,0001$; $R^2_{PER1} = 0,7685$) (Obr. 13). Porovnání akrofází s profily SCN skupiny SHAM použitím Studentova t-testu neprokázalo signifikantní rozdíly pro geny *Per2* ($p = 0,9527$) a *Rev-Erba* ($p = 0,9395$). Pro gen *Bmal1* zjistil studentův t-test signifikantní rozdíl akrofází na pětiprocentní hladině ($p = 0,0467$), kde došlo k fázovému zpoždění oproti rytmu skupiny SHAM (CT 16,4 u RF oproti 13,8 skupiny SHAM).



Obrázek 13.: Denní profily mRNA genů *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v SCN samců potkana Wistar chovaných v režimu RF. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (SCN) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

5.4.2 Denní profily exprese vybraných hodinových genů v CA1, CA3 a DG hipokampu

Denní profily exprese hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1* a *Per1* v CA1, CA3 a DG potkanů jsou znázorněny na obrázku 14.

5.4.2.1 Per1 mRNA

Cosinorová analýza profilu genové exprese v hipokampu potkanů vystavených režimu RF prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Per1* v podoblastech CA1 a DG ($p_{CA1} = 0,0392$) a DG ($p_{DG} = 0,0135$), ne však v CA3 ($p_{CA3} = 0,6362$).

Použití Studentova T-testu pro porovnání hodnot akrofází cosinorů zjistilo fázový posun ve smyslu předběhnutí RF skupiny oproti SHAM u genu *Per1* v oblasti CA1 o $6,5 \pm 1,9$ hodiny ($p = 0,0009$) a v oblasti DG o $7,1 \pm 1,6$ hodiny ($p < 0,0001$).

Následně byla data relativní optické denzity všech tří skupin normalizována podle maxima pro další statistické metody.

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a RF po normalizaci zjistilo statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami v oblasti CA1 ($p_{CA1} < 0,0001$), CA3 ($p_{CA3} < 0,0001$) a v DG ($p_{DG} < 0,0001$). Efekt interakce času a skupiny byl signifikantní v CA1 ($p = 0,0113$) a DG ($p = 0,0047$), ne však v CA1 ($p = 0,7611$).

Při hodnocení vztahů mezi skupinami ADX a RF po normalizaci byl zjištěn významný rozdíl mezi skupinami v oblasti CA1 ($p < 0,0001$), CA3 ($p < 0,0001$) i v DG ($p < 0,0001$).

Použití metody dvojné analýzy variance hodnotící vztahy mezi jednotlivými oblastmi hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci jedné skupiny zjistilo u potkanů vystavených režimu RF statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($p < 0,0001$) odpovídající výsledkům u předchozích skupin.

5.4.2.2 *Per2 mRNA*

Cosinorová analýza profilu genové exprese v hipokampu potkanů vystavených režimu RF neprokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Per2* v žádné podoblasti hipokampu ($p_{CA1} = 0,4398$; $p_{CA3} = 0,5833$; $p_{DG} = 0,9441$).

Následně byla data relativní optické denzity všech tří skupin normalizována podle maxima pro další statistické metody.

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a RF po normalizaci zjistilo statisticky významný rozdíl mezi skupinami v oblasti CA1 ($p_{CA1} < 0,0001$) a CA3 ($p_{CA3} = 0,116$), ne však v DG ($p_{DG} = 0,4304$). Efekt interakce času a skupiny byl signifikantní v DG ($p = 0,0443$).

Při hodnocení vztahů mezi skupinami ADX a RF po normalizaci byl zjištěn významný rozdíl v oblasti CA1 ($p = 0,0097$) a CA3 ($p = 0,0151$), ne však v DG ($p = 0,4731$).

Použití metody dvojné analýzy variance hodnotící vztahy mezi jednotlivými oblastmi hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci jedné skupiny zjistilo u potkanů vystavených režimu RF statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($p < 0,0001$) odpovídající výsledkům u předchozích skupin (viz. 5.1).

5.4.2.3 *Rev-Erba mRNA*

V profilu genu *Rev-Erba* byla pro statistickou analýzu vynechána původní data z časového bodu CT24 a na jejich místo byla opětovně vynesena (tzv. replotována) data z CT0. Důvodem byla přílišná odchylka dat CT24 od ostatních časových bodů, která přesahovala tři standardní odchylky. Tato chyba pravděpodobně vznikla kvůli špatným řežům.

Cosinorová analýza profilu genové exprese v hipokampu potkanů vystavených režimu RF neprokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Rev-Erba* v žádné podoblasti hipokampu ($p_{CA1} = 0,4259$; $p_{CA3} = 0,8073$; $p_{DG} = 0,2254$).

Použití Studentova T-testu pro porovnání hodnot akrofází cosinorů zjistilo fázový posun ve smyslu předběhnutí RF skupiny oproti SHAM u genu *Rev-Erba* v oblasti CA1 o $6,6 \pm 1,9$ hodiny ($p = 0,0007$), v oblasti CA3 o $7,1 \pm 1,9$ hodiny ($p = 0,0004$) a v oblasti DG o $7,1 \pm 1,6$ hodiny ($p < 0,0001$)

Následně byla data relativní optické denzity všech tří skupin normalizována podle maxima pro další statistické metody.

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a RF po normalizaci zjistilo statisticky významný rozdíl v oblasti CA1 ($p_{CA1} < 0,0001$), ne však v CA3 ($p_{CA3} = 0,198$) a v DG ($p_{DG} = 0,1625$). Efekt interakce času a skupiny byl signifikantní v CA1 ($p = 0,0012$), CA3 ($p = 0,004$), ne v DG ($p = 0,4023$).

Při hodnocení vztahů mezi skupinami ADX a RF po normalizaci byl zjištěn významný rozdíl v oblasti CA1 ($p < 0,0001$), CA3 ($p = 0,0151$) i v DG ($p = 0,0347$).

Použití metody dvojné analýzy variance hodnotící vztahy mezi jednotlivými oblastmi hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci jedné skupiny zjistilo u potkanů vystavených režimu RF statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($p < 0,0001$) odpovídajících výsledkům u předchozích skupin.

5.4.2.4 Bmal1 mRNA

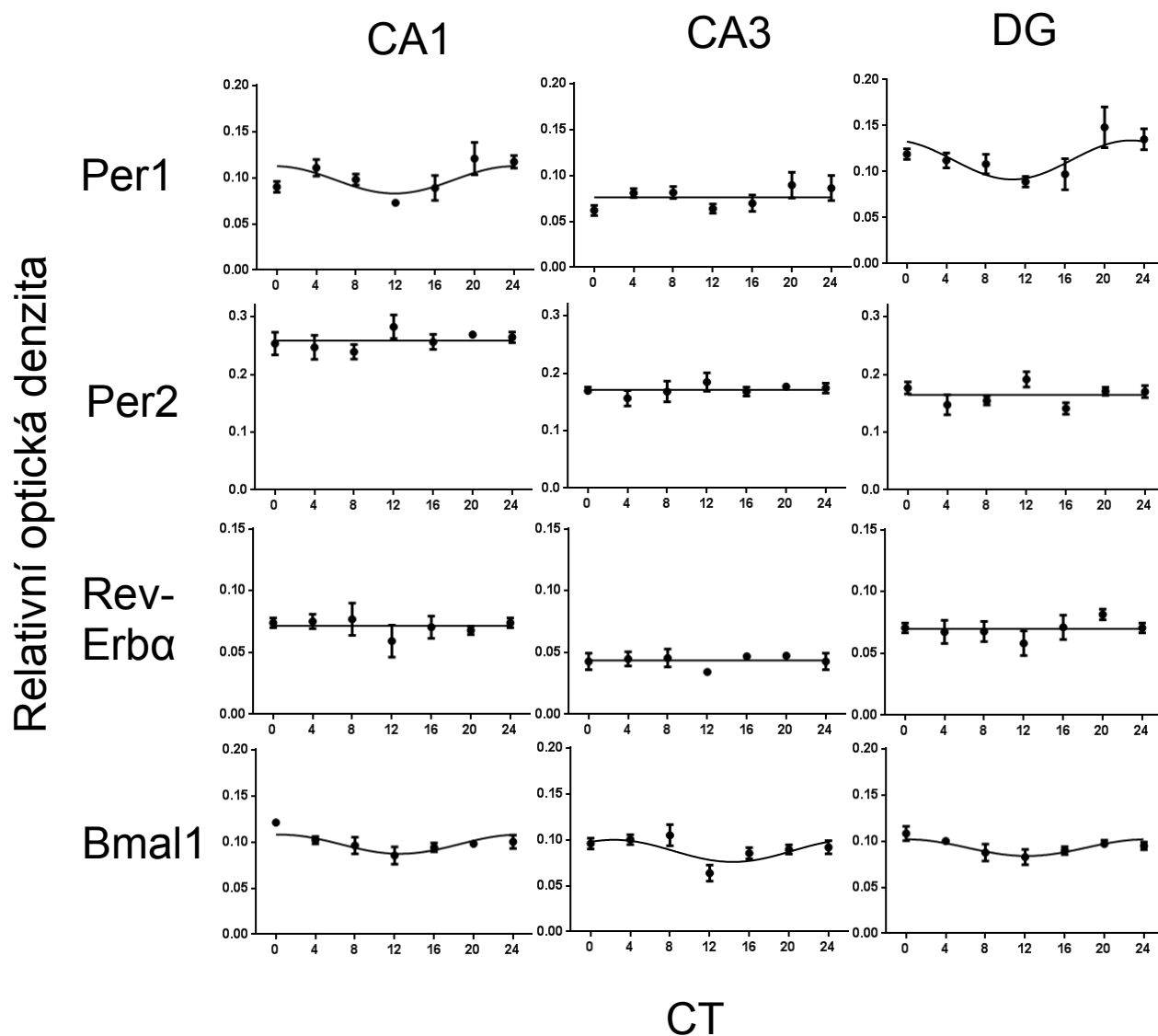
Cosinorová analýza profilu genové exprese v hipokampu potkanů vystavených režimu RF prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Bmal1* ve všech podoblastech hipokampu ($p_{CA1} = 0,0124$; $p_{CA3} = 0,0192$; $p_{DG} = 0,0153$).

Následně byla data relativní optické denzity všech tří skupin normalizována podle maxima pro další statistické metody.

Použití metody dvojné analýzy variance (two-way ANOVA) hodnotící vztahy mezi skupinami SHAM a RF po normalizaci nezjistilo statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami v žádné z oblastí. Efekt interakce času a skupiny byl signifikantní v CA1 ($p = 0,0149$), CA3 ($p = 0,0037$), i v DG ($p = 0,0379$).

Při hodnocení vztahů mezi skupinami ADX a RF metodou dvojné analýzy variance po normalizaci nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.

Použití metody dvojné analýzy variance hodnotící vztahy mezi jednotlivými oblastmi hipokampu (CA1, CA3, DG) v rámci jedné skupiny zjistilo u potkanů vystavených režimu RF statisticky významný rozdíl v genové expresi mezi oblastmi hipokampu ($p = 0,0278$) odpovídající výsledkům u předchozích skupin.



Obrázek 14.: Denní profily mRNA genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* a *Bmal1* v CA1, CA3 a DG hipokampu samců potkana Wistar chovaných v režimu RF. Data byla pro jednotlivé profily vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Osa X znázorňuje čas CT (h), osa Y relativní optickou denzitu cílové oblasti (CA1, CA3, DG) vůči pozadí. Data v každém časovém bodě představují průměr z 3 – 5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků: Výsledky cosinorové analýzy prokázaly vymizení rytmů exprese u genů *Per2* a *Rev-Erba* ve všech sledovaných částech hipokampu a u genu *Per1* v oblasti CA3. Spolu s výsledky dvojné analýzy variance a T-testů akrofází mezi skupinami RF a SHAM tedy vychází, že režim RF má vliv na cirkadiánní expresi hodinových genů v hipokampu a tento vliv se projevuje u některých hodinových genů vymizením rytmu v jejich expresi a u jiných fázovým posunem těchto rytmů ve smyslu jejich předběhnutí.

Výsledky dvojné analýzy variance mezi skupinami ADX a RF ve všech genech s výjimkou *Bmal1* prokázaly významné rozdíly. Odpověď hipokampálního oscilátoru na glukokortikoidy a změnu příjmu potravy je tedy rozdílná, jelikož zatímco profily skupiny ADX byly bez výjimky arytmičné, u téměř poloviční části profilů skupiny RF byly rytmy zachovány, a to v genu *Bmal1* a v genu *Per1* v podoblastech CA1 a DG.

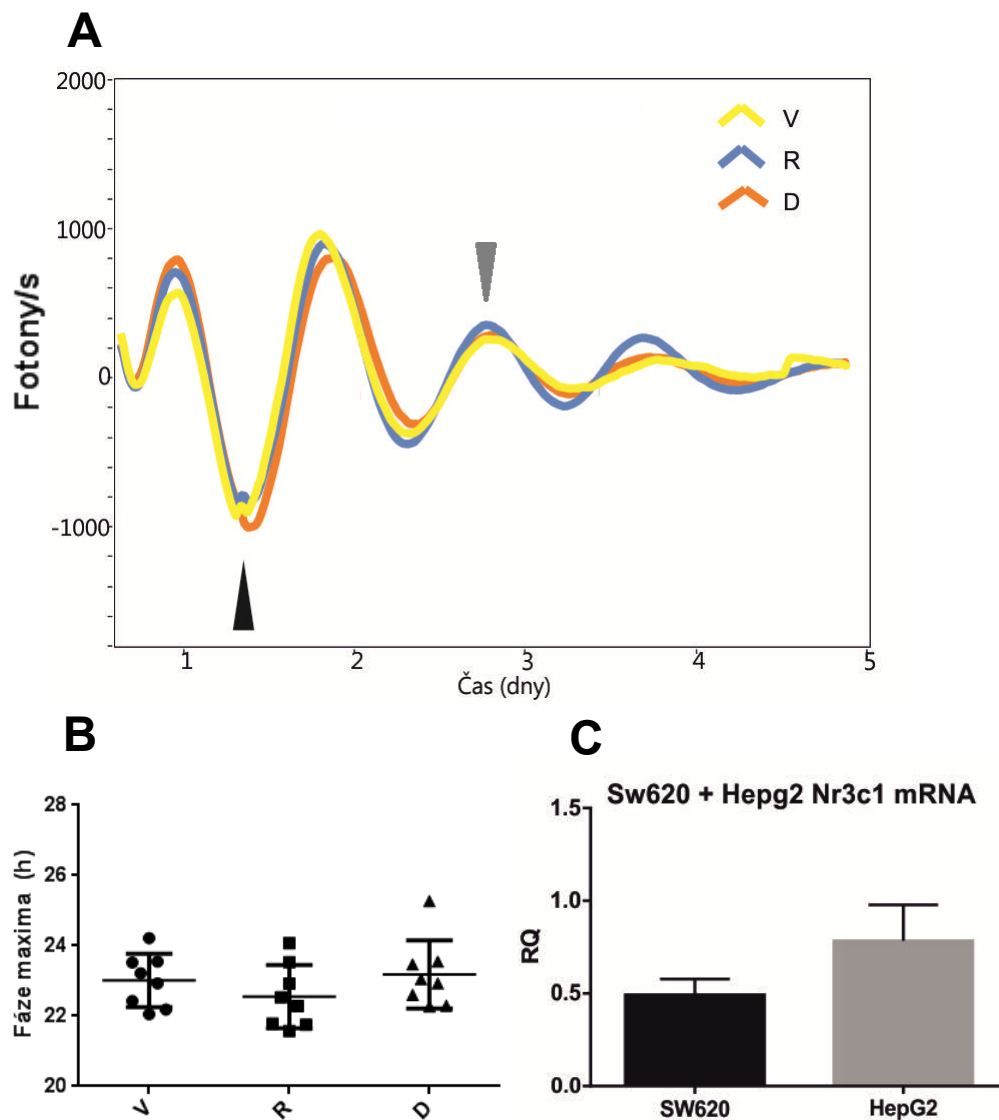
5.5 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiánní rytmy u SW620 sledovaný pomocí snímání luminiscence reportéru *Bmal1-luc*

V tomto experimentu byly jako model využity buňky SW620-Bmal1-luc, tj. lidské adenokarcinórní linie stabilně transfekované cirkadiánním reportérem odvozeným od části promotoru hodinového genu *Bmal1*, který řídí expresi luciferázy. Cílem bylo analyzovat jejich cirkadiánní rytmy a zjistit, zda lze tyto rytmy ovlivnit aktivací nebo inhibicí GR.

Pro potvrzení přítomnosti exprimovaného GR (gen *hNr3c1*) byly nejprve vzorky cDNA buněk linie SW620 analyzovány pomocí RT-qPCR. Graf relativní kvantity GR v buněčné linii SW620 vůči buněčné linii Hepg2 jaterního adenokarcinomu je znázorněn na obr. 15.

Na obr. 15 je znázorněn graf vyjadřující reprezentativní profil skupin V (přidáno 2 μ l 5% ethanolu) / R (přidáno 2 μ l 1mM RU486) / D (přidáno 8 μ l 100 μ M) a graf znázorňující čas, kdy jejich luminiscence dosáhla maxima v druhém cyklu po podání účinné látky. Průběh exprese reporterového genu nebyl mezi skupinami V/R/D významně odlišný (Obr. 15).

Hodnoty fáze maxima během druhého cyklu po podání účinné látky byly vzájemně porovnány pomocí metody jednoduché analýzy variance, která neprokázala vliv aktivity GR na tuto fázi ($p = 0,3598$)



Obrázek 15.: Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiánní rytmy linie SW620. A) Reprezentativní profily luminiscence buněk SW620 v čase. Černá šipka značí dobu přidání účinné látky do média, šedá šipka značí čas, který byl v grafu B) zaznamenán jako fáze maxima pro jednotlivé profily. Osa X značí uběhlý čas ve dnech, osa Y znázorňuje teoretický počet fotonů (reálný počet rozlišitelných signálů fotonásobiče) za sekundu. Žlutá barva značí skupinu V, modrá R a oranžová D. B) Hodnoty fáze maximální luminiscence zaznamenané ve druhém cyklu po podání účinné látky. Na ose X jsou uvedeny označení skupin, osa Y značí čas fáze v hodinách (průměr ± S.D.) C) Relativní kvantita GR mRNA v buněčné linii SW620 vůči linii Hepg2. Na ose X jsou uvedeny buněčné linie, na ose Y relativní kvantita GR mRNA ± S.D.

Souhrn výsledků: V buněčné linii SW620 byla potvrzena exprese GR mRNA. Nebyl zjištěn signifikantní vliv přidání inhibitoru RU486 ani zvýšení koncentrace DEX na průběh cirkadiánní exprese reportérového genu Bmal1Luc ani její fázi.

5.6 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiánní rytmy u NIH3T3 sledovaný pomocí snímání luminiscence reportéru *Per2-luc*

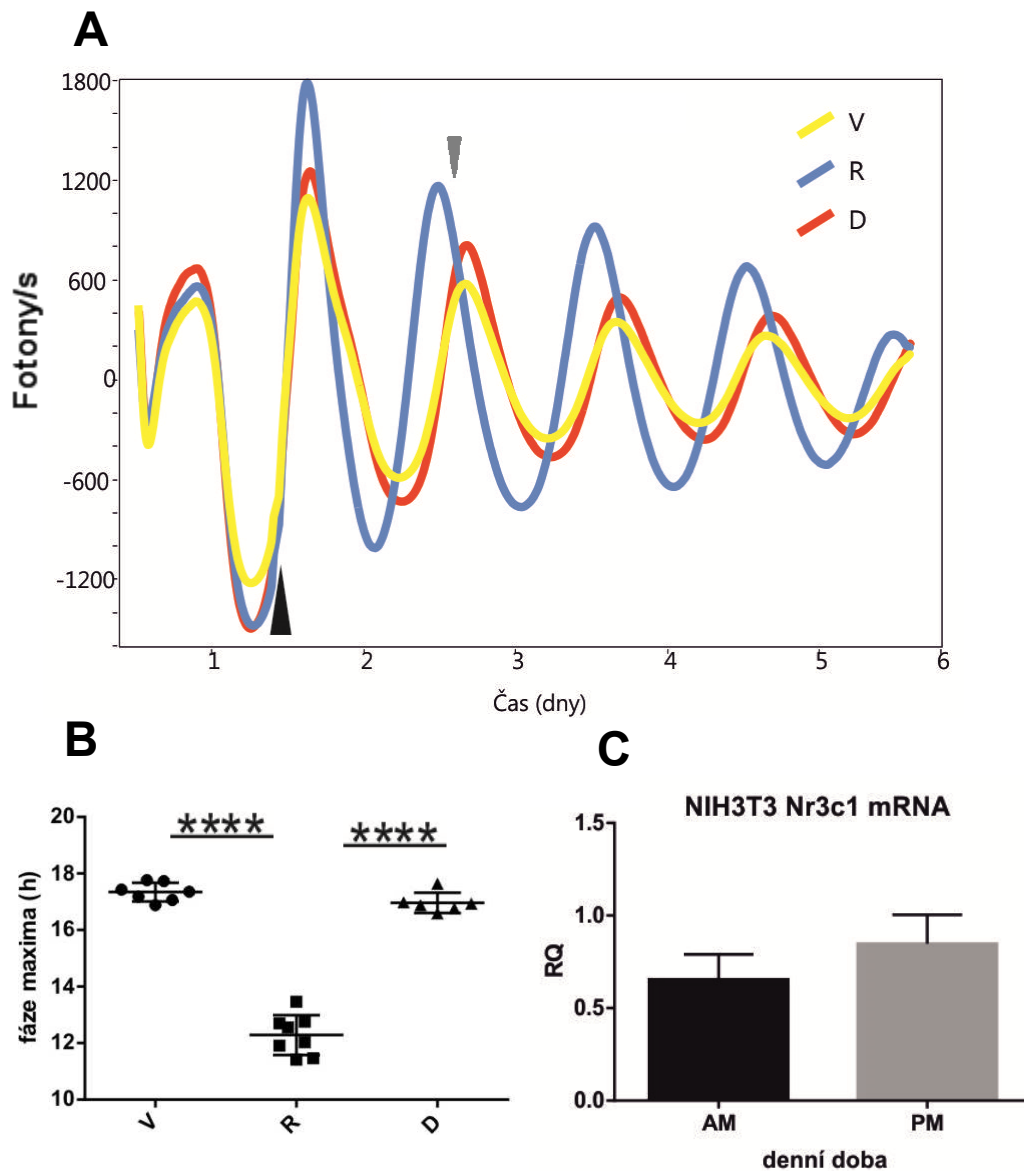
V tomto experimentu byly jako model využity buňky NIH3T3-Per2-luc, tj. myší fibroblastové linie stabilně transfekované cirkadiánním reportérem odvozeným od části promotoru hodinového genu *Per2*, který řídí expresi luciferázy. Cílem bylo analyzovat jejich cirkadiánní rytmy a zjistit, zda lze tyto rytmy ovlivnit aktivací nebo inhibicí GR.

Pro potvrzení přítomnosti expriomovaného GR (gen *mNr3c1*) byly nejprve vzorky cDNA buněk linie NIH3T3 ze dvou časových bodů (ranní a večerní) analyzovány pomocí RT-qPCR.

Graf relativní kvantity GR mRNA v buněčné linii NIH3T3 vůči referenčním vzorkům myší jaterní tkáně je znázorněn na obr. 16. Výsledky potvrdily expresi GR v NIH3T3, přičemž byl při použití Studentova T-testu nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi analyzovanými časovými body ($p = 0,181$).

Na obr. 16 je graf vyjadřující reprezentativní profil skupiny V (v T = 23 přidáno 2 μ l 5% ethanolu) / R (v T = 23 přidáno 2 μ l 1mM RU486) / D (v T = 23 přidáno 8 μ l 100 μ M) a graf znázorňující čas, kdy jejich luminiscence dosáhla maxima v druhém cyklu po podání účinné látky. Průběh exprese reportérového genu byl mezi skupinami V/R/D odlišný (Obr. 16).

Hodnoty fáze maxima během druhého cyklu po podání účinné látky byly vzájemně porovnány pomocí metody jednoduché analýzy variance, která prokázala vliv aktivity GR na tuto fázi mezi skupinami R a V ($p < 0,0001$) a R a D ($p < 0,0001$). Fáze skupiny R byla oproti skupině V předběhnutá o $5,06 \pm 0,27$ hodiny. Vliv aktivity GR na fázi maxima mezi skupinami V a D nebyl prokázán.



Obrázek 16.: Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy linie NIH3T3. A) Reprezentativní profily luminiscence buněk NIH3T3 v čase. Černá šipka značí dobu přidání účinné látky do média, šedá šipka značí čas, který byl v grafu B) zaznamenán jako fáze maxima pro jednotlivé profily. Osa X značí uběhlý čas ve dnech, osa Y znázorňuje teoretický počet fotonů (reálný počet rozlišitelných signálů fotonásobiče) za sekundu. Žlutá barva značí skupinu V, modrá R a oranžová D. B) Hodnoty fáze maximální luminiscence zaznamenané ve druhém cyklu po podání účinné látky. Na ose X jsou uvedeny označení skupin, osa Y značí čas fáze v hodinách (průměr ± S.D.) C) Relativní kvantita GR mRNA v buněčné linii NIH3T3 vůči vzorkům jaterní tkáně. Na ose X je uvedena doba odběru (AM v 9:00 ráno, PM ve 20:00 večer), na ose Y relativní kvantita GR mRNA ± S.D.

Souhrn výsledků: V buněčné linii NIH3T3 byla potvrzena exprese GR. U buněčné linie NIH3T3 přidání inhibitoru GR RU486 u skupiny R způsobilo 5-hodinové fázové předběhnutí oproti přidání vehikula. Zvýšení koncentrace DEX nemělo žádný signifikantní efekt na průběh cirkadiánní luminiscence.

5.7 Profily in vitro exprese genů *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1*, *TEF* a *HLF* v buněčné linii SW620

V tomto experimentu byl dále sledován vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiánní regulaci hladiny mRNA vybraných hodinových genů za využití metody kvantitativní RT PCR (RT-qPCR). Detailní popis experimentu je v kapitole Materiál a metody. Stručné shrnutí – buňky byly synchronizovány přidáním média se 100 nM DEX v čase T0 a poté z nich byla izolována RNA v pravidelných intervalech. V čase T20 bylo k dalším buňkám přidáno vehikulum (skupina V) 1 μ M RU486 (R) nebo 1 μ M DEX (D) a vzorky byly dále odebírány v pravidelných intervalech až do času T45. Výsledné profily exprese genů *Per1/2*, *Rev-Erba*, *Bmal1*, *TEF* a *HLF* jsou znázorněny na obrázku 17.

5.7.1 *Per1* mRNA

5.7.1.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese genu *Per1* ($p = 0,0035$, $R^2 = 0,4158$).

5.7.1.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato analýza potvrdila vliv času na expresi a nenašla vliv účinné látky v médiu na průběh genové exprese či interakci relativní exprese s časem.

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou. Pro všechny skupiny analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese ($p_V = 0,0005$; $R^2_V = 0,4846$) ($p_R = 0,0002$; $R^2_R = 0,5619$) ($p_D = 0,0089$; $R^2_D = 0,3492$).

Následně byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,7349$), amplitudy ($p = 0,9601$) a mesoru ($p = 0,6592$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami.

5.7.2 *Per2 mRNA*

5.7.2.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese genu *Per2* ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,5825$).

5.7.2.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato Analýza potvrdila vliv času na expresi a nenašla vliv účinné látky v médiu na průběh genové exprese. Pro gen *Per2* byla nalezena signifikantní interakce relativní exprese a času ($p = 0,0107$).

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou. Pro všechny skupiny analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese ($p_V = 0,0056$; $R^2_V = 0,3505$) ($p_R = 0,0014$; $R^2_R = 0,4357$) ($p_D < 0,0001$; $R^2_D = 0,5497$).

Následně byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,4337$), amplitudy ($p = 0,7146$) a mesoru ($p = 0,8497$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami.

5.7.3 *Rev-Erba mRNA*

5.7.3.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese genu *Rev-Erba* ($p = 0,0050$, $R^2 = 0,3958$).

5.7.3.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato analýza potvrdila vliv času na expresi a nenašla vliv účinné látky v médiu na průběh genové exprese či interakci relativní exprese s časem.

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou.. Pro všechny skupiny analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese ($p_V < 0,0001$; $R^2_V = 0,7483$) ($p_R = 0,0007$; $R^2_R = 0,4702$) ($p_{DA} < 0,0001$; $R^2_D = 0,6805$).

Následně byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,4212$) a mesoru ($p = 0,5616$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami. Analýza amplitudy prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami V a R ($p = 0,0435$).

5.7.4 Bmal1 mRNA

5.7.4.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která neprokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese genu *Bmal1* ($p = 0,6876$).

5.7.4.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato analýza potvrdila vliv času na expresi a nenašla vliv účinné látky v médiu na průběh genové exprese či interakci relativní exprese s časem.

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou. Pro všechny skupiny analýza prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu exprese ($p_V < 0,0001$; $R^2_V = 0,6538$) ($p_R = 0,0082$; $R^2_R = 0,3298$) ($p_D = 0,0357$; $R^2_D = 0,2424$).

Dále byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,2035$), amplitudy ($p = 0,2231$) a mesoru ($p = 0,3297$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami.

5.7.5 TEF mRNA

5.7.5.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese genu *TEF* ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,6545$).

5.7.5.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato analýza potvrdila vliv času na expresi a nenašla vliv účinné látky v médiu na průběh genové exprese či interakci relativní exprese s časem.

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou. Pro skupiny V a D analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese ($p_V < 0,0001$; $R^2_V = 0,5799$) ($p_D = 0,013$; $R^2_D = 0,4553$). Exprese skupiny R nebyla analýzou posouzena jako signifikantně rytmická ($p_R = 0,0818$).

Následně byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,8677$), amplitudy ($p = 0,5385$) a mesoru ($p = 0,3305$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami. V případě genu *TEF* byly použity parametry z imaginární křivky na 9% hladině.

5.7.6 HLF mRNA

5.7.6.1 T0 – T20

Data z T0 – T20 byla analyzována pomocí cosinorové analýzy, která prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese genu *HLF* ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,6211$).

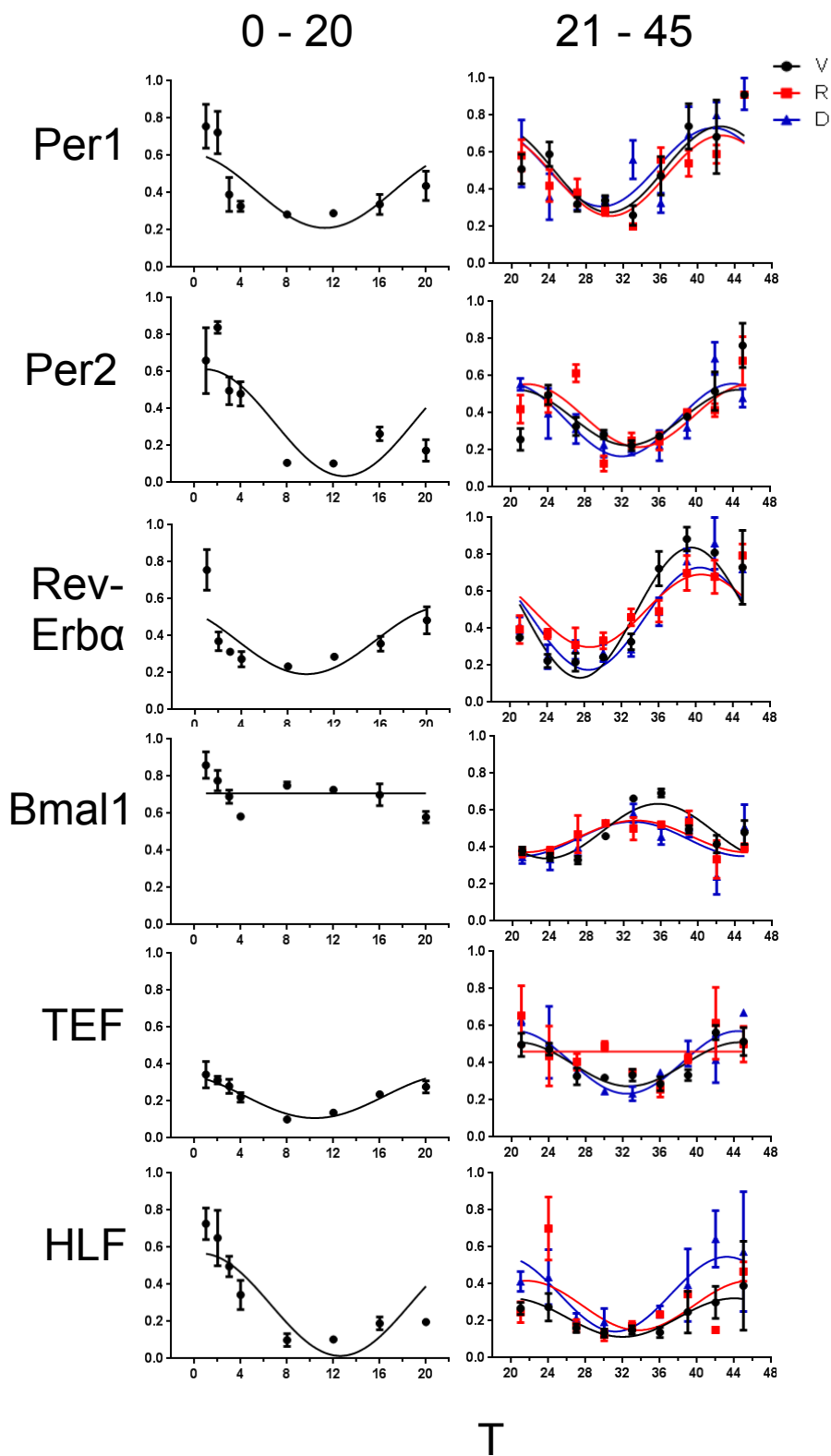
5.7.6.2 T21 – T45

Data ze všech tří skupin v T21 – T45 byla analyzována dvojnou analýzou variance. Tato analýza potvrdila vliv času na expresi a našla signifikantní rozdíly mezi skupinami V a D ($p = 0,0195$) v závislosti na účinné látce v médiu.

Dále byla data analyzována cosinorovou analýzou. Pro všechny skupiny analýza prokázala přítomnost cirkadiánního rytmu exprese ($p_V = 0,0495$; $R^2_V = 0,2216$) ($p_R = 0,0403$; $R^2_R = 0,2436$) ($p_D = 0,0036$; $R^2_D = 0,3866$).

Následně byla provedena jednoduchá analýza variance parametrů cosinových křivek (akrofáze, amplituda, mesor). Takto provedená analýza akrofáze ($p = 0,4754$) a amplitudy ($p = 0,3346$) neprokázala signifikantní rozdíl v těchto parametrech mezi skupinami. Analýza mesoru prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami V a D ($p = 0,0425$).

Souhrn výsledků: Exprese všech sledovaných genů byla statisticky potvrzena jako rytmická s výjimkou profilu genu *TEF* u skupiny R. Efekt přidání účinné látky byl u jednotlivých genů porovnán dvěma statistickými metodami. Výsledky jednoduché analýzy variance parametrů cosinových křivek prokázaly významný rozdíl mezi amplitudou skupiny rytmů exprese genu *Rev-Erba* u skupin V a R a mezi mesorem rytmu v expresi genu *HLG* u skupin V a D. Výsledky všech ostatních analýz však nepotvrdily u buněk linie SW620 vztah mezi zvýšenou koncentrací DEX či inhibitoru RU486 a signifikantních změn exprese vybraných rytmických genů.



Obrázek 17. : Profily exprese genů *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1*, *Per1*, *TEF* a *HLF* v buněčné linii SW620. Data byla pro soubory dat T0 – T20 a T21 - T45 vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy a proložena sinusoidní křivkou. Osa X znázorňuje čas T (h), osa Y relativní expresi daného genu vůči referenčním genům B2M a GAPDH.. Data v každém bodě představují průměr tří hodnot \pm S.E.M. V čase T21 – T45 je černou křivkou značena skupina V (EtOH), červenou skupina R (RU486) a modrou skupina D (DEX).

6. Diskuze

6.1 Přítomnost rytmu v expresi hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu

Podrobná analýza profilů genové exprese vybraných hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu u kontrolních zvířat prokázala přítomnost cirkadiánního oscilátoru v této oblasti mozku. Podařilo se detekovat cirkadiánní hodiny v oblastech CA1, CA3 a DG. Profily genové exprese se v těchto oblastech vzájemně lišily, a to v hladině exprese (mesoru).

V práci Wang et al. 2009 byla studována cirkadiánní exprese pouze hodinového genu *Per2* v podoblastech hipokampu. V této práci byl detekován cirkadiánní rytmus v expresi genu *Per2* na úrovni mRNA i proteinu s detekovatelnými rozdíly mezi podoblastmi. Hladina *Per2* mRNA byla nejvyšší v oblasti CA1 a nejnižší v oblasti CA3 a maximum exprese ve všech podoblastech hipokampu nastalo v antifázi k expresi v SCN, což odpovídá výsledkům pokusů uvedených v oddělení 5.1.2.

Podrobným studiem profilů exprese hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu se dosud žádná práce nezabývala a výsledky této práce jsou tak v tomto ohledu unikátní.

6.2 Vliv ADX a vystavení režimu RF na expresi hodinových genů v SCN a hipokampu

Výsledky prokázaly, že v SCN nemá ADX nebo vystavení RF žádný vliv na expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-Erba*. Pouze v případě genu *Bmal1* byl zaznamenán fázový posun u skupiny vystavené RF ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky jsou ve shodě s dostupnými údaji, které také popisují absenci účinku vystavení RF na hodiny v SCN. U zvířat v režimu RF dochází k rozpojení centrálního oscilátoru v SCN, jehož fáze zůstává nastavená světelným režimem, zatímco periferní oscilátory jsou synchronizovány s dobou příjmu potravy. Fáze rytmické exprese hodinových genů se v SCN nemění vlivem RF ani v podmínkách stálé tmy,

což ukazuje, že SCN nejsou citlivé na změnu v době příjmu potravy (Damiola et al. 2000). Na druhou stranu v podmínkách, kdy je funkce centrálních hodin v SCN narušena např. vlivem působení stálého světla, může RF rytmy v hodinových genech v SCN částečně ovlivňovat (Novakova et al. 2011).

Dřívější výsledky ukázaly, že glukokortikoidy jsou schopné synchronizovat rytmickou expresi hodinových genů v buněčných kulturách či změnit fázi genové exprese v periferních orgánech, ne však v SCN (Balsalobre et al. 2000). V savčím genomu se nachází množství konzervovaných glukokortikoid vazebných oblastí (glucocorticoid binding sites – GBS), které byly identifikovány i v blízkosti jednotek kbp od promotorů hodinových genů *Per1* a *Per2* (So et al. 2009). Tyto oblasti jsou odlišně citlivé na přítomnost aktivovaného GR a např. gen *Per1* byl identifikován jako vysoce citlivý na glukokortikoidní signalizaci (Reddy et al. 2012).

Absence vlivu glukokortikoidů na hodiny v SCN, která byla ve výsledcích potvrzena, by mohla souviset se skutečností, že SCN dospělých zvířat pravděpodobně neobsahuje GR. Avšak dostupné informace o jejich přítomnosti v SCN se různí. Studie používající metody imunohistochemie za pomoci anti-GR protilátky nedetekovala přítomnost GR v potkaních SCN od jednoho týdne po narození (Rosenfeld et al. 1998). Oproti tomu studie užívající metodu hybridizace in situ či RT-qPCR zjistily přítomnost mRNA GR u dospělých potkanů (Morimoto et al. 1996, Su et al. 2015).

Vzhledem k dříve publikovaným údajům bylo předpokládáno, že uvedené manipulace (ADX a RF) nebudou hodiny v SCN ovlivňovat. Stanovení profilů exprese hodinových genů v SCN, tj. jejich fáze, amplitudy a střední hodnoty sloužilo jako kontrola toho, že během experimentů nedošlo k narušení synchronizace centrálních hodin s vnějšími podmínkami. Toto narušení by mohlo způsobit některé pozorované změny v expresi hodinových genů v hipokampu a periferních hodinách tlustého střeva.

Výsledky dále prokázaly, že na rozdíl od SCN má absence glukokortikoidů, navozená chirurgickým odstraněním nadledvin, zásadní vliv na rytmickou expresi

hodinových genů v hipokampu. Vlivem ADX tyto rytmy zcela vymizely, a to v oblasti CA1, CA3 a DG.

Hipokampus je důležitá oblast ve zprostředkování negativní zpětnovazebné regulace hladiny glukokortikoidů v organismu. Zvýšení hladiny glukokortikoidů má za následek inhibici HPA osy. Na této inhibici se podílí více mechanismů, z nichž jeden je vlastní hipokampální oblast (Jacobson a Sapolsky 1991). Exprese GR a MR v hipokampu vykazuje cirkadiánní rytmus lišící se mezi jednotlivými podoblastmi. Hladina exprese těchto receptorů se mění v závislosti na hladině glukokortikoidů a ADX způsobí vymizení těchto rytmů (Herman et al. 1993). Nedávné studie ukázaly funkční specializaci jednotlivých podoblastí hipokampu (Mueller et al. 2011). Otázka, zda se tato specializace pojí s odlišným cirkadiánním profilem exprese jednotlivých podoblastí, se jeví jako zajímavé téma pro další studium.

Vzhledem k tomu, že RF je spojován s významným ovlivněním hladin glukokortikoidů (Pecoraro et al. 2006), bylo dalším cílem zjistit, zda omezení příjmu potravy ovlivní expresi hodinových genů v hipokampu a zda se případná odezva bude lišit mezi jednotlivými podoblastmi hipokampu.

Expese genů *Per2* a *Rev-Erba* v hipokampu zvířat vystavených RF nebyla rytmická na rozdíl od kontrol v žádné oblasti, tj. CA1, CA3 a DG, a rytmy byly též odstraněny i pro gen *Per1* v oblasti CA3. Na rozdíl od toho byly rytmy v expresi *Bmal1* zachovány ve všech oblastech a v expresi *Per1* v oblastech CA1 a DG. U těchto rytmických profilů došlo během 10 dnů vystavení RF k fázovému posunu ve smyslu předběhnutí o cca. 6 - 7 hodin.

Vliv režimu RF na expresi hodinových genů v hipokampu byl dříve popsán v práci Wakamatsu et al. 2001. V práci Wakamatsu et al. byla zvířata režimu RF vystavena po dobu 6 dnů a potrava byla omezena na 4 h denně, zatímco v této diplomové práci byl režim RF udržován po dobu 10 dnů a potkani měli přístup k potravě omezen na 6 h denně. Autoři sledovali expresi hodinových genů v nejasně definované oblasti hipokampu. V práci byla genová exprese u myší vystavených režimu RF měřena pouze ve dvou časových bodech a vykazovala rozdílné hodnoty,

než u myší na režimu AL (*ad libitum*), tzn. noční hodnoty exprese skupiny RF odpovídaly denním hodnotám skupiny AL a naopak. Tyto výsledky autoři interpretují jako fázový posun rytmické exprese. Zda se skutečně jedná o fázový posun lze ovšem z těchto výsledků jen obtížně vyvodit. V této diplomové práci byla exprese hodinových genů stanovována v průběhu celého dne ve 4 h intervalech, což umožnilo detailní analýzu vlivu RF na tuto expresi. Pokud by byla exprese hodinových genů sledována také pouze ve dvou časových bodech jako v práci Wakamatsu et al. 2001, pravděpodobně by byl zjištěn podobný výsledek. Avšak díky odlišnému experimentálnímu přístupu byla zjištěna genově specifická odpověď v jednotlivých částech hipokampu.

Z výsledků vyplývá, že vliv ADX a RF na hodiny v hipokampu je odlišný. Absence glukokortikoidů vedla k odstranění rytmů v expresi všech sledovaných hodinových genů. V případě RF došlo k vyrušení rytmů jen u některých genů, zatímco u jiných byla rytmická exprese fázově posunuta. Výsledky tak ukazují, že hipokampus integruje signály související jak s příjmem potravy, tak i s aktuální hladinou glukokortikoidů.

6.3 Vliv ADX na expresi hodinových genů v distálním kolonu

Výsledky prokázaly přítomnost rytmické exprese hodinových genů v distálním kolonu jak u kontrolních zvířat, tak u zvířat vystavených ADX. Výsledky experimentů ukazují, že i hodiny v distálním kolonu jsou citlivé na glukokortikoidní signalizaci. Profily genové exprese genů *Per1*, *Rev-Erba* a *Bmal1* se u skupin SHAM a ADX lišily, avšak pro gen *Per2* nebyl prokázán žádný rozdíl mezi oběma skupinami.

Reakce na ADX se ve tkáni kolonu významně lišila od hipokampální oblasti. Zatímco odstranění glukokortikoidů vedlo v hipokampu k vymizení rytmické exprese hodinových genů, v distálním kolonu exprese těchto genů zůstala i po operaci významně rytmická, byť s rozdíly oproti kontrolní skupině.

Tyto rozdíly podporují hypotézu, že vliv glukokortikoidů na cirkadiální hodiny je tkáňově specifický. Dřívější práce studovaly vliv ADX na bílou tukovou tkáň, kde po

odstranění nadledvin nedošlo ke ztrátě rytmicity hodinových genů, ale mimo jiné došlo k výraznému snížení amplitudy exprese genu *Per1* a efektu interakce času a skupiny mezi SHAM a ADX u genu *Rev-Erba* (Su et al. 2015). Bílá tuková tkáň a distální kolon vykazují tedy po ADX v expresi některých genů stejné trendy. Je známo, že až 95% vazby GR na GBS v genomu je tkáňově specifických a závisí na množství chromatinu, který je přístupný vazbě, a remodelace chromatinu umožňuje tkáňovou specifitu vazby receptoru na cílovou sekvenci (John et al. 2011). Další mechanismus specifity glukokortikoidní signalizace spočívá v přítomnosti tzv. „priming proteinů“, které nasedají na GBS a usnadňují vazbu receptorů na tyto sekvence. V játrech myši bylo pomocí chromatinové imunoprecipitace detekováno 62% GBS obsazených C/EBP β priming proteinem před vazbou GR na GBS (Grøntved et al. 2013). Exprese priming proteinů a proteinů ovlivňujících remodelaci chromatinu tedy může být specifická pro jednotlivé tkáně a společně s prereceptorovým metabolismem glukokortikoidů může dále regulovat odezvu jednotlivých tkání na glukokortikoidní signalizaci.

6.4 Vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy buněčných linií SW620 a NIH3T3

Druhá část diplomové práce zahrnuje pilotní experiment, jehož cílem bylo prozkoumat vliv aktivace a inhibice GR na cirkadiální rytmy. Jako modelu bylo využito dvou rozdílných stabilně transfekovaných reportérových buněčných linií dostupných v laboratoři – lidské karcinomální SW620 exprimující *Bmal1-luc* a myší fibroblastové NIH3T3 exprimující *Per2-luc*. V obou sledovaných buněčných liniích byla nejprve potvrzena exprese GR. V experimentech byla snaha ověřit hypotézu uvedenou v publikaci So et al. 2009, tedy že pro udržení fáze cirkadiálních rytmů je nutný aktivovaný GR navázaný kontinuálně na GR vazebném místě (GBS) v blízkosti hodinových genů. V experimentálním schématu byly proto buňky po indukci cirkadiálních rytmů dexamethasonem (DEX) rozděleny do tří skupin v závislosti na účinné látce přidané v průběhu experimentu do média, ve kterém buňky rostly. Do buněk skupiny V byl přidán pouze 5% ethanol jako rozpouštědlo účinných látek, skupina D byla charakterizována zvýšením koncentrace syntetického agonisty

glukokortikoidních receptorů DEX na pětinasobek a skupina R přidáním steroidního antagonisty GR v koncentraci dostatečné pro blokování efektu DEX v médiu (Sládek, ústní komunikace).

Zvýšení koncentrace DEX v buňkách skupiny D neovlivnilo výrazným způsobem průběh exprese reportérového genu v luminometru oproti buňkám skupiny V u obou linií. GBS byly v obou liniích tedy plně obsazeny při počáteční 100 nM koncentraci DEX v média.

Účinek RU486 při potlačení glukokortikoidní signalizace je založen na stabilizaci 8S komplexu GR s Hsp90 proteinem při vazbě RU486, který pak není translokován do jádra (Lindemeyer et al. 1990). So et al. 2009 ve své studii sledující účinek RU486 na genovou expresi mMSCs vyslovil teorii, že pro udržování rytmické exprese závislé na dexamethasonu (který byl obsažen v médiu) je třeba kontinuální aktivita GR.

Přidání RU486 nemělo v buňkách linie SW620 signifikantní vliv na fázi exprese jejich reportérového genu *Bmal1-luc*. V buňkách skupiny R linie NIH3T3 přidání RU486 do média výrazně ovlivnilo fázi exprese reportéru *Per2-luc*. Tento efekt je patrný v rychlejším poklesu luminiscence a následném předběhnutí maxima luminiscence o 5 h v druhém cyklu po podání oproti buňkám skupin V a D.

V experimentech byly pro měření luminiscence použity luciferázové vektory s regulačními sekvencemi odvozenými od *Per2* (NIH3T3) a *Bmal1* (SW620) promotorů. Regulační sekvence vložené do použitých vektorů neobsahovaly GBS, jelikož to je obvykle dosti vzdáleno od TSS (místo začátku transkripce – transcription start site) (So et al. 2008) - v případě genu *Per2* 22,8 kbp je za TSS (So et al. 2009). Oba reportéry ale reagovaly na změny v expresi genů transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky molekulárních hodin, a to prostřednictvím E-boxu v případě *Per2* (Yoo et al. 2005), či prostřednictvím RORE v případě *Bmal1* (Preitner et al. 2002). Pozorované buňky tedy změnou luminiscence nereagovaly na akutní vazbu GR na GBS reportérových genů (či její ztrátu), ale na synchronizační vstup (Zeitgeber) do oscilátoru způsobený navázáním či vytěsněním GR z GBS

endogenních hodinových genů a výslednou změnou jejich exprese. V tomto případě tedy následný efekt způsobil předběhnutí rytmu exprese reportérového genu v buňkách NIH3T3 v reakci na vytěsnění GR z GBS v genomu.

So et al. 2009 ve své studii sledující účinek RU486 na genovou expresi myších mesenchymálních kmenových buněk (mMSCs) sledoval akutní odpověď genové exprese vybraných genů na změny v aktivitě GR. V uvedené práci byl popsán akutní vliv přidání RU486 do média s buněčnou kulturou, který způsobil zdánlivé fázové zpoždění cirkadiánní exprese a změnu její amplitudy. Na rozdíl od publikovaných výsledků So et al. 2009 u mMSCs, buňky linie NIH3T3 na přidání RU486 zareagovaly fázovým předběhnutím, což sice prokazuje jejich citlivost na přidání RU486 do prostředí, ale následné změny genové exprese se liší od akutních změn, které byly popsány na mMSCs. Rozdílný charakter odpovědi buněk NIH3T3 a mMSCs může být daný: A) Použitím jiného buněčného modelu, což by ukazovalo na případnou tkáňovou specifitu glukokortikoidní signalizace. B) Jinou metodikou použitou v pokusech, kde výsledky zjištěné sledováním luminiscence pomocí *luc* reportérového genu (tedy přímá informace o cirkadiánní aktivitě BMAL1/CLOCK transkripčního komplexu) neodpovídají výsledkům získaných pomocí PCR, která analyzuje hladinu mRNA jednotlivých genů, jež může být ovlivněna celou řadou dalších faktorů aktivity kromě BMAL1/CLOCK komplexu (např. další transkripční faktory a posttranskripční regulace). C) V publikaci So et al. bylo měřeno časové období 24 h po přidání účinné látky. Ačkoliv akutní posun v hladině mRNA měřených genů naznačuje zpoždění fáze, krátká doba měření brání porovnat následný efekt zpětnovazebné smyčky viditelný v této diplomové práci – zde bylo sledováno delší časové období.

Na rozdíl od publikovaných výsledků So et al. 2009 však nebyly zjištěny změny cirkadiánního rytmu mezi buňkami linie SW620 s vysokou koncentrací RU486 oproti buňkám téže linie s vysokou koncentrací DEX či s přidáním vehikulem. Absence odpovědi buněk SW620 na přidání RU486 se dá vysvětlit několika způsoby.

A) Bohužel nebylo z časových důvodů možné využít stejný reportérový systém u NIH3T3 (*Per2* promotor) a SW620 (*Bmal1* promotor). Je proto možné, že *Bmal1-luc* reportér není dostatečně citlivý, aby zachytil posuny fáze se stejnou účinností jako

Per2-luc reportér. Proto v následných pokusech bude ještě nutno ověřit efekt RU486 u SW620 transfekovaných *Per2-luc* reportérem. Toto vysvětlení však není pravděpodobné, protože oba reportéry jsou hojně využívány při analýze cirkadiánních rytmů a i *Bmal1-luc* velmi citlivě reaguje na Zeitgeber jiného typu (Sládek a Sumová 2013) B) Buňky linie SW620 mají celkově slabší integritu cirkadiánních oscilací *in vitro*, což vede k rychlejšímu snížení amplitudy rytmů a snižuje přesnost analýzy. C) Buňky linie SW620 nepotřebují kontinuální vazbu GR pro udržování rytmické genové exprese, například kvůli rozdílnému tkáňovému a druhovému původu.

Pro upřesnění možné reakce linie SW620 na přidání antagonisty GR bylo v dalším experimentu postupováno stejnou metodou jako So et al. a pomocí sledování exprese mRNA v několika časových bodech byla ověřena okamžitá odpověď genové exprese několika hodinových i hodinami kontrolovaných genů na změnu v aktivitě GR. Všechny sledované hodinové geny (*Per1*, *Per2*, *Rev-ErbA* a *Bmal1*) byly jednoznačně rytmicky exprimovány a přitom nereagovaly významným způsobem na změnu v glukokortikoidní sinalizaci. Výjimku tvoří gen *TEF* kódující transkripční faktor rodiny PAR-bZIP (proline and acidic amino acid-rich basic region/leucine zipped), který je za fyziologických podmínek rytmicky exprimovaný v periferních tkáních (Fonjallaz et al. 1996). Kvůli většímu rozptylu mezi opakovanými biologickými měřeními nebyl u skupiny R nalezen signifikantní rytmus exprese *TEF*. Exprese příbuzného genu *HLF* však rytmická u skupiny R byla, což nasvědčuje spíše metodické chybě při izolaci *TEF* mRNA v jednom časovém bodě než skutečnému efektu.

Výsledky experimentů sledujících jak cirkadiánní luminiscenci, tak měření hladiny mRNA v buňkách SW620 si tedy odpovídají. V buňkách této linie nebyla zjištěna odpověď na změnu aktivity GR projevující se změnou rytmické exprese hodinových a hodinami kontrolovaných genů. Tyto výsledky podporují hypotézu, že buňky linie SW620 nepotřebují kontinuální vazbu GR na GBS pro udržování rytmické exprese svých hodinových genů, což je u tohoto modelu v rozporu s hypotézou So et al. 2009 o nutnosti této vazby pro zachování fáze rytmu.

Buněčná linie SW620 je odvozena z lidského kolorektálního adenokarcinomu. Testování primárních tumorů a buněčných linií kolorektálního karcinomu zjistilo, že jejich buňky exprimují enzymy a regulační faktory pro syntézu steroidních hormonů, patrně jako pomocný mechanismus utlumení imunitního systému (Sidler et al. 2011). Je tedy možné, že vyšší koncentrace glukokortikoidů v prostředí kolorektálního karcinomu má za následek změnu dynamiky glukokortikoidní signalizace v buňkách, které jej produkují.

Buněčná linie SW620 také vykazuje komparativně vysokou hladinu exprese 11beta-hydroxysteroid dehydrogenázy, enzymu zodpovědného za prereceptorovou konverzi glukokortikoidů (Nawrocki et al. 2002), což může korelovat s přizpůsobením a znečitlivěním buněk na prostředí s vysokou koncentrací glukokortikoidů.

Z výsledků tedy vyplývá, že reakce buněk a tkání na glukokortikoidní signalizaci či vyšší koncentraci antagonisty GR může být tkáňově a druhově specifická.

7. Souhrn

Výsledky prokázaly přítomnost cirkadiánních oscilátorů ve třech podoblastech hipokampu, které se mezi sebou liší v hladině genové exprese hodinových genů. Tyto hodiny jsou citlivé na glukokortikoidní signalizaci či omezení doby příjmu potravy. Při absenci glukokortikoidů dojde k vymizení cirkadiánní exprese hodinových genů v hipokampálním oscilátoru, a to ve všech jeho částech. V režimu RF s omezením příjmu potravy na 6 hodin denně došlo v části profilů k vymizení rytmicity genové exprese, u části pak byla rytmicita zachována, ale došlo k fázovému posunu. Zajímavé je, že rozdíly v hladinách exprese hodinových genů v jednotlivých částech hipokampu, prokázané u kontrolní skupiny, byly zachovány i u skupiny ADX a RF.

Také byla prokázána citlivost genové exprese periferních hodin v distálním kolonu na glukokortikoidní signalizaci. Vzhledem k rozdílné odpovědi hipokampu a kolonu na vymizení hladiny glukokortikoidů je evidentní, že tyto tkáně jsou rozdílně citlivé na jejich signalizaci. Zatímco v kolonu je po ADX rytmická exprese zachována díky dalším faktorům, hipokampus je na glukokortikoidní signalizaci více závislý a proto došlo k vymizení rytmicity exprese hodinových genů v této oblasti mozku.

V experimentech na dvou buněčných liniích byla dále ukázána závislost glukokortikoidní signalizace k aktivaci či inhibici GR ve tkáňovém kontextu. Tyto buněčné linie se vyznačovaly odlišnou reakcí na přidání antagonisty GR. Buňky linie SW620 nereagovaly na RU486 signifikantním způsobem, což naznačuje, že nejsou závislé na obsazení GBS pro zachování cirkadiánního rytmu. Oproti tomu buňky linie NIH3T3 na RU486 reagovaly změnami ve fázi. NIH3T3 jsou tedy více citlivé na přítomnost aktivovaného GR na GBS hodinových genů.

Vzhledem k povaze experimentů a jejich pojetí jako pilotních studií není zatím možné konkrétně popsat povahu glukokortikoidní signalizace a její vztah k obsazení GR pro uchování cirkadiánní exprese hodinových a hodinami kontrolovaných genů. Dílčí výsledky ukazují důležitost tkáňového či druhového kontextu pro tuto signalizaci. Rozmanitost účinků glukokortikoidní signalizace a její důležitost pro cirkadiánní systém organismu i mimo něj se jeví jako důležité téma budoucího výzkumu a případné nové poznatky by mohly pomoci porozumět povaze mnoha patologií.

8. Seznam použité literatury

- Abe, K., Kroning, J., Greer, M.A., Critchlow, V. (1979). Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinology* 29, 119-131.
- Abrahamson, E.E., Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916, 172-191.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., Kyriacou, C.P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology* 12, 540-550.
- Alexis, M.N., Stylianopoulou, F., Kitraki, E., Sekeris, C.E. (1983). The distribution and properties of the glucocorticoid receptor from rat brain and pituitary. *Journal of Biological Chemistry* 258, 4710-4714.
- Amir, S., Lamont, E.W., Robinson, B., Stewart, J. (2004). A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Neuroscience* 24, 781-790.
- Andrews, R.V., Folk, G.E. (1964). Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comparative Biochemistry and Physiology* 11, 393-&.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y.L., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H., Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655-667.
- Aston-Jones, G., Chen, S., Zhu, Y., Oshinsky, M.L. (2001). A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nature Neuroscience* 4, 732-738.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.
- Berridge, C.W., Foote, S.L. (1991). Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Journal of Neuroscience* 11, 3135-3145.
- Berson, D.M. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences* 26, 314-320.
- Bogdan, A., Bouchareb, B., Touitou, Y. (2001). Ramadan fasting alters endocrine and neuroendocrine circadian patterns. Meal-time as a synchronizer in humans? *Life Sciences* 68, 1607-1615.
- Brown, S.A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology* 12, 1574-1583.
- Buckingham, J.C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology* 147, S258-S268.
- Buijs, R.M., Wortel, J., van Heerikhuizen, J.J., Feenstra, M.G.P., Ter Horst, G.J., Romijn, H.J., Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience* 11, 1535-1544.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I.H., Draetta, G.F., Pagano, M. (2007). SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 316, 900-904.

- Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J.J., Sassone-Corsi, P. (2005). Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 309, 1390-1394.
- Carneiro, B.T.S., Araujo, J.F. (2009). The food entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiology International* 26, 1273-1289.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M. (1994). The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse leydig tumor cells – characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). *Journal of Biological Chemistry* 269, 28314-28322.
- Colwell, C.S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., Waschek, J.A. (2003). Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 285, R939-R949.
- Conrad, C.D. (2008). Chronic Stress-induced Hippocampal Vulnerability: The Glucocorticoid Vulnerability Hypothesis. *Reviews in the Neurosciences* 19, 395-411.
- Côté, M., Guillon, G., Payet, M.D., Gallo-Payet, N. (2001). Expression and regulation of adenylyl cyclase isoforms in the human adrenal gland. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 4495-4503.
- Coutinho, A.E., Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335, 2-13.
- Dallman, M.F., Engeland, W.C., Rose, J.C., Wilkinson, C.W., Shinsako, J., Siedenburg, F. (1978). Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *American Journal of Physiology* 235, R210-R218.
- Damiola, F., Le Minh, 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 & Development* 14, 2950-2961.
- Dana, R.C., Martinez, J.L. (1984). Effect of adrenalectomy on the circadian rhythm of LTP. *Brain Research* 308, 392-395.
- Dardente, H., Cermakian, N. (2005) Les noyaux suprachiasmatisques: une horloge circadienne composée. *Medecine/Sciences* 21, 66-72
- Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T.D.L., Weitz, C.J., Takahashi, J.S., Kay, S.A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* 280, 1599-1603.
- Davidson, A.J. (2006). Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 290, R1524-R1526.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. In *Annual Review of Physiology* (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 517-549.
- Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125, 497-508.
- Ebling, F.J.P. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Neurobiology* 50, 109-&.

- Echeverria, P.C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Pilipuk, G.P., Galigniana, M.D. (2009). Nuclear Import of the Glucocorticoid Receptor-hsp90 Complex through the Nuclear Pore Complex Is Mediated by Its Interaction with Nup62 and Importin beta. *Molecular and Cellular Biology* 29, 4788-4797.
- Eckel-Mahan, K.L. (2012). Circadian oscillations within the hippocampus support memory formation and persistence. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, 9.
- Evanson, N.K., Tasker, J.G., Hill, M.N., Hillard, C.J., Herman, J.P. (2010). Fast Feedback Inhibition of the HPA Axis by Glucocorticoids Is Mediated by Endocannabinoid Signaling. *Endocrinology* 151, 4811-4819.
- Fonjallaz, P., Ossipow, V., Wanner, G., Schibler, U. (1996). The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences. *Embo Journal* 15, 351-362.
- Freeman, D.A., Dhandapani, K.M., Goldman, B.D. (2004). The thalamic intergeniculate leaflet modulates photoperiod responsiveness in Siberian hamsters. *Brain Research* 1028, 31-38.
- Friedrich, M. (2013). Biological Clocks and Visual Systems in Cave-Adapted Animals at the Dawn of Speleogenomics. *Integrative and Comparative Biology* 53, 50-67.
- Furay, A.R., Murphy, E.K., Mattson, M.P., Guo, Z., Herman, J.P. (2006). Region-specific regulation of glucocorticoid receptor/HSP90 expression and interaction in brain. *Journal of Neurochemistry* 98, 1176-1184.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569.
- Gerber, A., Esnault, C., Aubert, G., Treisman, R., Pralong, F., Schibler, U. (2013). Blood-Borne Circadian Signal Stimulates Daily Oscillations in Actin Dynamics and SRF Activity. *Cell* 152, 492-503.
- Godinho, S.I.H., Maywood, E.S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A.R., Busino, L., Pagano, M., Kendall, R., Quwailid, M.M., Romero, M.R., *et al.* (2007). The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. *Science* 316, 897-900.
- Grøntved, L., John, S., Baek, S., Liu, Y., Buckley, J.R., Vinson, C., Aguilera, G., Hager, G.L. (2013). C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements. *Embo Journal* 32, 1568-1583.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms* 20, 391-403.
- Guo, H.G., Brewer, J.M., Lehman, M.N., Bittman, E.L. (2006). Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: Effects of transplanting the pacemaker. *Journal of Neuroscience* 26, 6406-6412.
- Harbour, V.L., Weigl, Y., Robinson, B., Amir, S. (2014). Phase Differences in Expression of Circadian Clock Genes in the Central Nucleus of the Amygdala, Dentate Gyrus, and Suprachiasmatic Nucleus in the Rat. *Plos One* 9, 9.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 774-785.

- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S.B., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.C., *et al.* (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497-508.
- Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P.J., Mikkelsen, J.D. (2003). Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 25, 293-310.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P., Cato, A.C.B. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo Journal* 13, 4087-4095.
- Herman, J.P., Spencer, R. (1998). Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *Journal of Neuroscience* 18, 7462-7473.
- Herman, J.P., Watson, S.J., Chao, H.M., Coirini, H., McEwen, B.S. (1993). Diurnal regulation of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor messenger-RNAs in rat hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience* 4, 181-190.
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450, 1086-U1013.
- Hoes, J.N., Jacobs, J.W.G., Buttgeriet, F., Bijlsma, J.W.J. (2010). Current view of glucocorticoid co-therapy with DMARDs in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 693-702.
- Huang, N.A., Chelliah, Y., Shan, Y.L., Taylor, C.A., Yoo, S.H., Partch, C., Green, C.B., Zhang, H., Takahashi, J.S. (2012). Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* 337, 189-194.
- Chaudhury, D., Wang, L.M., Colwell, C.S. (2005). Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. *Journal of Biological Rhythms* 20, 225-236.
- Chaves, I., Yagita, K., Barnhoorn, S., Okamura, H., van der Horst, G.T.J., Tamanini, F. (2006). Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: Importance of the C terminus of mammalian CRY1 for circadian core oscillator performance. *Molecular and Cellular Biology* 26, 1743-1753.
- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metabolism* 2, 297-307.
- Jacobson, L., Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews* 12, 118-134.
- John, S., Sabo, P.J., Thurman, R.E., Sung, M.H., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Hager, G.L., Stamatoyannopoulos, J.A. (2011). Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nature Genetics* 43, 264-U116.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J., Stoter, M. (2005). The casein kinase I family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling* 17, 675-689.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15, R271-R277.
- Kondratov, R.V., Chernov, M.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Gudkov, A.V., Antoch, M.P. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes & Development* 17, 1921-1932.

- Koren, L., Whiteside, D., Fahlman, A., Ruckstuhl, K., Kutz, S., Checkley, S., Dumond, M., Wynne-Edwards, K. (2012). Cortisol and corticosterone independence in cortisol-dominant wildlife. *General and Comparative Endocrinology* 177, 113-119.
- Kotelevtsev, Y., Holmes, M.C., Burchell, A., Houston, P.M., Schmol, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C.R.W., Seckl, J.R., *et al.* (1997). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14924-14929.
- Kumaki, Y., Ukai-Tadenuma, M., Uno, K.D., Nishio, J., Masumoto, K., Nagano, M., Komori, T., Shigeyoshi, Y., Hogenesch, J.B., Ueda, H.R. (2008). Analysis and synthesis of high-amplitude *Cis*-elements in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14946-14951.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X.W., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. (1999). *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., *et al.* (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science* 326, 437-440.
- Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G., Schibler, U. (2001). Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *Embo Journal* 20, 7128-7136.
- Leak, R.K., Card, J.P., Moore, R.Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* 819, 23-32.
- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R.A., Loudon, A.S.I., Reppert, S.M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867.
- Lee, H.M., Chen, R.M., Kim, H., Etchegaray, J.P., Weaver, D.R., Lee, C. (2011). The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16451-16456.
- Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M., Bittman, E.L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant – immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience* 7, 1626-1638.
- Lemos, D.R., Downs, J.L., Urbanski, H.F. (2006). Twenty-four-hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. *Molecular Endocrinology* 20, 1164-1176.
- Li, J.Z., Bunney, B.G., Meng, F., Hagenauer, M.H., Walsh, D.M., Vawter, M.P., Evans, S.J., Choudary, P.V., Cartagena, P., Barchas, J.D., *et al.* (2013). Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9950-9955.
- Liberzon, I., Lopez, J.F., Flagel, S.B., Vazquez, D.M., Young, E.A. (1999). Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: Relevance to post-traumatic stress disorder. *Journal of Neuroendocrinology* 11, 11-17.
- Lindemeyer, R.G., Robertson, N.M., Litwack, G. (1990). Glucocorticoid receptor monoclonal antibodies define the biological action of Ru38486 in intact B16 melanoma cells. *Cancer Research* 50, 7985-7991.

- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288, 483-491.
- Lu, W., Meng, Q.-J., Tyler, N.J.C., Stokkan, K.-A., Loudon, A.S.I. A Circadian Clock Is Not Required in an Arctic Mammal. *Current Biology* 20, 533-537.
- Mayr, B., Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 599-609.
- Maywood, E.S., Smith, E., Hall, S.J., Hastings, M.H. (1997). A thalamic contribution to arousal-induced, non-photic entrainment of the circadian clock of the Syrian hamster. *European Journal of Neuroscience* 9, 1739-1747.
- Mazzoccoli, G., Paziienza, V., Vinciguerra, M. (2012). Clock Genes and Clock-Controlled Genes in the Regulation of Metabolic Rhythms. *Chronobiology International* 29, 227-251.
- Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N., Bittman, E.L. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140, 207-218.
- Michel, S., Itri, J., Han, J.H., Gnietczynski, K., Colwell, C.S. (2006). Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Bmc Neuroscience* 7, 11.
- Miller, W.L. (1998). Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 12, 67-81.
- Mistlberger, R.E. (1994). Circadian food-anticipatory activity – formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 18, 171-195.
- Moore, R.Y. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator – the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proceedings* 42, 2783-2789.
- Moore, R.Y., Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in rat. *Brain Research* 42, 201-&.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research* 26, 235-269.
- Mueller, S.G., Chao, L.L., Berman, B., Weiner, M.W. (2011). Evidence for functional specialization of hippocampal subfields detected by MR subfield volumetry on high resolution images at 4 T. *Neuroimage* 56, 851-857.
- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 5, 25-44.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705.
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-415.
- Nawrocki, A.R., Goldring, C.E., Kostadinova, R.M., Frey, F.J., Frey, B.M. (2002). In vivo footprinting of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter - Evidence for cell-specific regulation by Sp1 and Sp3. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14647-14656.

- Niijima, A., Nagai, K., Nagai, N., Akagawa, H. (1993). Effects of light stimulation on the activity of the autonomic nerves in anesthetized rats. *Physiology & Behavior* *54*, 555-561.
- Nishi, M., Kawata, M. (2007). Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: Implications from live cell imaging studies. *Neuroendocrinology* *85*, 186-192.
- Novakova, M., Polidarova, L., Sladek, M., Sumova, A. (2011). Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience* *197*, 65-71
- Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N., Ishida, N. (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Research* *12*, 191-202.
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M.W., Eichele, G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metabolism* *4*, 163-173.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307-320.
- Partch, C.L., Shields, K.F., Thompson, C.L., Selby, C.P., Sancar, A. (2006). Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10467-10472.
- Payne, A.H., Hales, D.B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* *25*, 947-970.
- Pecoraro, N., Dallman, M.F., Warne, J.P., Ginsberg, A.B., Laugero, K.D., la Fleur, S.E., Houshyar, H., Gomez, F., Bhargava, A., Akana, S.F. (2006). From Malthus to motive: How the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Progress in Neurobiology* *79*, 247-340.
- Pratt, W.B., Morishima, Y., Murphy, M., Harrell, M. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 111-138
- Preitner, N., Damiola, F., Molina, L.L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* *110*, 251-260.
- Qian, X.X., Droste, S.K., Lightman, S.L., Reul, J., Linthorst, A.C.E. (2012). Circadian and Ultradian Rhythms of Free Glucocorticoid Hormone Are Highly Synchronized between the Blood, the Subcutaneous Tissue, and the Brain. *Endocrinology* *153*, 4346-4353.
- Rabbitt, E.H., Lavery, G.G., Walker, E.A., Cooper, M.S., Stewart, P.M., Hewison, M. (2002). Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *Faseb Journal* *16*, 36-44.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975-978.
- Rea, M.A., Glass, J.D., Colwell, C.S. (1994). Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience* *14*, 3635-3642.
- Reddy, T.E., Gertz, J., Crawford, G.E., Garabedian, M.J., Myers, R.M. (2012). The Hypersensitive Glucocorticoid Response Specifically Regulates Period 1 and Expression of Circadian Genes. *Molecular and Cellular Biology* *32*, 3756-3767.

- Rege, J., Nakamura, Y., Wang, T., Merchen, T.D., Sasano, H., Rainey, W.E. (2014). Transcriptome Profiling Reveals Differentially Expressed Transcripts Between the Human Adrenal Zona Fasciculata and Zona Reticularis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99, E518-E527.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. Schütz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541
- Reinke, H., Saini, C., Fleury-Olela, F., Dibner, C., Benjamin, I.J., Schibler, U. (2008). Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes & Development* 22, 331-345.
- Riedel, G., Micheau, J. (2001). Function of the hippocampus in memory formation: Desperately seeking resolution. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 25, 835-853.
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., Merrow, M. (2003). Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms* 18, 80-90.
- Rosenfeld, P., Vaneekelen, J.A.M., Levine, S., Dekloet, E.R. (1988). Ontogeny of the type-2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions – an immunocytochemical study. *Developmental Brain Research* 42, 119-127.
- Sage, D., Maurel, D., Bosler, O. (2002). Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282, E458-E465.
- Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K., *et al.* (1998). Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *Journal of Biological Chemistry* 273, 27039-27042.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging – the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews* 7, 284-301.
- Sedwick, C. (2014). Wanted: A New Model for Glucocorticoid Receptor Transactivation and Transrepression. *Plos Biology* 12, 2.
- Segall, L.A., Perrin, J.S., Walker, C.D., Stewart, J., Amir, S. (2006). Glucocorticoid rhythms control the rhythm of expression of the clock protein, *Period2*, in oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. *Neuroscience* 140, 753-757.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B.H., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H., *et al.* (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
- Sidler, D., Renzulli, P., Schnoz, C., Berger, B., Schneider-Jakob, S., Fluck, C., Inderbitzin, D., Corazza, N., Candinas, D., Brunner, T. (2011). Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncogene* 30, 2411-2419.
- Siepkka, S.M., Yoo, S.H., Park, J., Song, W.M., Kumar, V., Hu, Y.N., Lee, C., Takahashi, J.S. (2007). Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* 129, 1011-1023.
- Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1988). Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal-cortical cells by ACTH. *Annual Review of Physiology* 50, 427-440.

- Sladek, M., Rybova, M., Jindrakova, Z., Zemanova, Z., Polidarova, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pacha, J., Sumova, A. (2007). Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* *133*, 1240-1249.
- Sladek, M., Sumova, A. (2013). Entrainment of Spontaneously Hypertensive Rat Fibroblasts by Temperature Cycles. *Plos One* *8*, 10.
- So, A.Y.L., Cooper, S.B., Feldman, B.J., Manuchehri, M., Yamamoto, K.R. (2008). Conservation analysis predicts *in vivo* occupancy of glucocorticoid receptor-binding sequences at glucocorticoid-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 5745-5749
- 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*, 17582-17587.
- Son, G.H., Chung, S., Choe, H.K., Kim, H.D., Baik, S.M., Lee, H., Lee, H.W., Choi, S., Sun, W., Kim, H., *et al.* (2008). Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 20970-20975.
- Spanswick, S.C., Epp, J.R., Keith, J.R., Sutherland, R.J. (2007). Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the hippocampus causes spatial memory deficits that are not reversed by chronic treatment with corticosterone or fluoxetine. *Hippocampus* *17*, 137-146.
- Starkman, M.N., Gebarski, S.S., Berent, S., Schteingart, D.E. (1992). Hippocampal formation volume, memory dysfunction and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biological Psychiatry* *32*, 756-765.
- Stephan, F.K., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *69*, 1583-&.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* *291*, 490-493.
- Su, Y., van der Spek, R., Foppen, E., Kwakkel, J., Fliers, E., Kalsbeek, A. (2015). Effects of adrenalectomy on daily gene expression rhythms in the rat suprachiasmatic and paraventricular hypothalamic nuclei and in white adipose tissue. *Chronobiology International* *32*, 211-224.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M., Shigeyoshi, Y. (2012). Differential Entrainment of Peripheral Clocks in the Rat by Glucocorticoid and Feeding. *Endocrinology* *153*, 2277-2286.
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H., Shibata, S. (2003). Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 6795-6800.
- Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S.H., Buchanan, G.F., Gillette, M.U. (2003). Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the Suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 718-723.
- Tong, X., Yin, L. (2013). Circadian Rhythms in Liver Physiology and Liver Diseases. *Comprehensive Physiology* *3*, 917-940.
- Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W.B., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics* *37*, 187-192.

- Valnegri, P., Khelifaoui, M., Dorseuil, O., Bassani, S., Lagneaux, C., Gianfelice, A., Benfante, R., Chelly, J., Billuart, P., Sala, C., *et al.* (2011). A circadian clock in hippocampus is regulated by interaction between oligophrenin-1 and Rev-erb alpha. *Nature Neuroscience* *14*, 1293-U1108.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H., Virshup, D.M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 4888-4899.
- Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., Turek, F.W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health* *25*, 85-+.
- Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S. (2001). Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *European Journal of Neuroscience* *13*, 1190-1196.
- Walker, J.J., Terry, J.R., Lightman, S.L. (2010). Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* *277*, 1627-1633.
- Wang, L.M.C., Dragich, J.M., Kudo, T., Odom, I.H., Welsh, D.K., O'Dell, T.J., Colwell, C.S. (2009). Expression of the circadian clock gene *Period2* in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. *Asn Neuro* *1*, 14.
- Wardlaw, S.M., Phan, T.X., Saraf, A., Chen, X.M., Storm, D.R. (2014). Genetic disruption of the core circadian clock impairs hippocampus-dependent memory. *Learning & Memory* *21*, 417-423.
- Watts, A.G., Tanimura, S., Sanchez-Watts, G. (2004). Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: Daily rhythms and their interactions with corticosterone. *Endocrinology* *145*, 529-540.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* *14*, 697-706.
- Yagita, K., Tamanini, F., van der Horst, G.T.J., Okamura, H. (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* *292*, 278-281.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* *302*, 1408-1412.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* *288*, 682-685.
- Yau, J.L.W., Seckl, J.R. (2012). Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Frontiers in Aging Neuroscience* *4*, 15.
- Yoo, S.H., Ko, C.H., Lowrey, P.L., Buhr, E.D., Song, E.J., Chang, S.W., Yoo, O.J., Yamazaki, S., Lee, C., Takahashi, J.S. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 2608-2613.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepenka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., *et al.* (2004). *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 5339-5346.