

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lucie Olejníková**

*Cirkadiánní hodiny během ontogeneze*

*Circadian clock during ontogenesis*

Bakalářská práce

Školitel:

PharmDr. Alena Sumová DrSc.

Praha, 2011

Poděkování patří mé školitelce PharmDr. Aleně Sumové DrSc. za pomoc a cenné rady při psaní této práce.

**Prohlášení:**

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

V Praze, 5.5.2011

Lucie Olejníková

## Abstrakt:

Cirkadiánní systém umožňuje organismům adaptovat se na periodicky se měnící podmínky na Zemi. U savců se skládá z centrálního pacemakeru v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu a dalších oscilátorů, které se nacházejí v jiných částech mozku a v periferních orgánech a tkáních. Ontogenetický vývoj cirkadiánního systému probíhá postupně a největší změny prodělává během pozdně embryonálního a raně postnatálního vývoje. Pro jeho správnou funkci není důležitý pouze morfologický vývoj jeho jednotlivých součástí, ale také vývoj jejich synchronizace jak s vnějším prostředím, tak mezi sebou navzájem. SCN začíná vykazovat oscilace v expresi hodinových genů už před narozením, ale vzhledem k nepřítomnosti detekovatelných hladin jejich proteinových produktů, je schopnost SCN generovat tyto oscilace *in vivo* před narozením stále diskutována. Po narození jsou již hladiny těchto proteinů prokazatelné a rytmy v expresi hodinových genů dosahují úrovně dospělého organismu v době ukončení synaptogeneze v SCN. Pro vývoj cirkadiánních oscilací není přítomnost funkčního cirkadiánního systému matky bezpodmínečně nutná, protože na SCN mláďat má pouze synchronizační vliv a cirkadiánní oscilace se vyvíjejí i u mláďat arytmičkových matek. Ostatní oscilátory v těle se vyvíjejí se zpožděním vzhledem k SCN. Jejich ontogeneze je specifická pro jednotlivé orgány a tkáně a není tolik prozkoumána jako ontogeneze SCN.

**Klíčová slova:** ontogeneze, cirkadiánní rytmy, suprachiasmatická jádra, periferní oscilátory, hodinové geny

## Abstract:

Circadian system enables adaptation of organisms to periodic changes in environment on the Earth. In mammals, it consists of central pacemaker in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of hypothalamus and of oscillators that reside in other brain areas as well as in the peripheral organs and tissues. Ontogenetic development of the circadian system is a gradual process and the most dramatic changes undergo during the late embryonic and early postnatal stage. For its proper function, not only the morphological development of its individual parts, but also development of their entrainment to external environment and among each other, is important. The oscillations in clock gene expressions in the SCN occur already before birth, but in view of the fact that the levels of their protein products are undetectable, at this developmental stage, the ability of SCN to generate these oscillations *in vivo* has been discussed. After birth, the levels of these proteins rise and the rhythms in clock genes expression achieve the adult-like level at the postnatal age, when the synaptogenesis in the SCN is completed. The presence of a functional maternal circadian system is not necessary for the endogenous development of the SCN clock in pups, because the maternal SCN only entrains the clock and the circadian oscillations thus develop even in pups of arrhythmic mothers. Other oscillators in body develop later than that in the SCN. Their ontogenesis is organ and tissue specific and so far it has not been examined in such detail as ontogenesis of the SCN.

**Keywords:** ontogenesis, circadian rhythms, suprachiasmatic nuclei, peripheral oscillators, clock genes

## Seznam použitých zkratk:

AA-NAT	arylalkyl-amin N-acetyltransferáza
AMPA	$\alpha$ -amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
AVP	arginin vasopresin
Bmal1	brain and muscle Amt-like protein 1
CaMK	calcium/calmodulin- dependent protein kinase
CHX	cykloheximid
CBP	CREB binding protein
CK1 $\epsilon$	kasein kináza 1 $\epsilon$
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
CREB	calcium/cAMP response element binding protein
CREs	calcium/cAMP response elements
Cry1,2	Cryptochrom
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
Egr1	Early growth response protein 1
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GHT	genikulohypotalamický trakt
GRP	gastrin-releasing peptid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MT1,2	melatoninový receptor 1,2
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid
PAC1	receptor pro vasoaktivní intestinální peptid
Per1,2	Period 1,2
Per1-luc	Period1-luciferase
PHI	histidin-isoleucin peptid
PKA	protein kináza A
PK2	prokineticin 2
RHT	retinohypotalamický trakt
Rora	RAR-related orphan receptor A
SCN	suprachiasmatické jádro
SS	somatostatin
TGF- $\alpha$	transformig growth faktor $\alpha$
TTX	tetrodotoxin
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VPAC1,2	receptor pro vasoaktivní intestinální peptid 1,2

## Obsah:

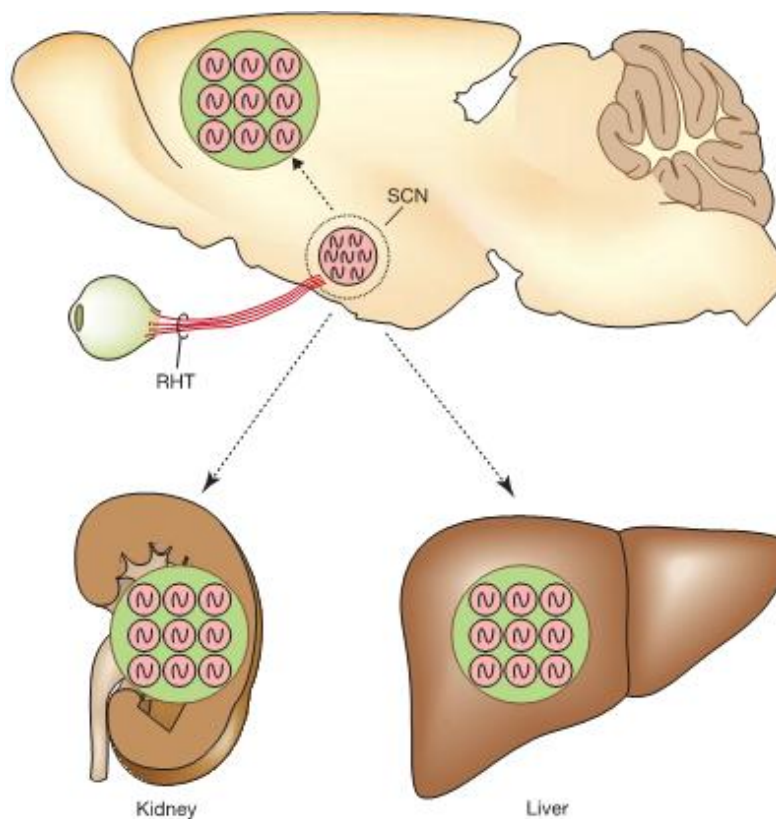
1. Úvod	1
2. Struktura a funkce cirkadiálního systému savců	2
2.1. Suprachiasmatická jádra	3
2.2. Další oscilátory v mozku	5
2.3. Retina	5
2.4. Periferní oscilátory	6
3. Jak pracují cirkadiální hodiny na molekulární úrovni?	6
4. Synchronizace cirkadiálního systému	8
4.1. Synchronizace SCN	8
4.2. Synchronizace ostatních oscilátorů v mozku	9
4.3. Synchronizace periferních oscilátorů	9
5. Ontogeneze cirkadiálního systému	10
5.1. Ontogeneze suprachiasmatických jader	10
5.1.1. Kdy se SCN vyvíjí morfologicky?	10
5.1.2. Kdy SCN začíná vykazovat rytmus?	11
5.2. Ontogeneze periferních oscilátorů	12
6. Synchronizace SCN během časné ontogeneze	14
6.1. Synchronizace fetálních hodin	14
6.2. Nesvětelná synchronizace novorozených mláďat	17
6.3. Ontogeneze světelné synchronizace SCN	19
7. Závěr	21
8. Seznam použité literatury	22

## 1. ÚVOD:

Většina známých organismů – od cyanobakterií až po člověka – je vybavena systémem schopným „měřit“ čas, což jim umožňuje lepší přizpůsobení periodicky se měnícím podmínkám na Zemi, které jsou způsobeny nejen střídáním dne a noci, ale i střídáním ročních období. Většina behaviorálních i fyziologických pochodů v savčím organismu proto vykazuje denní oscilace. Tyto rytmické procesy jsou řízeny vnitřním časovým systémem. Součástí tohoto vnitřního časového systému jsou endogenní hodiny, které běží s přibližně denní periodou, a proto se nazývají cirkadiánní hodiny (z latinského „*circa diem*“, přibližně jeden den). Se solárním dnem, který trvá přesně 24 hodin, jsou pravidelně seřizovány pomocí vnějších synchronizátorů, tzv. „Zeitgebers“ (z německého jazyka „udavač času“). Tyto Zeitgebers mohou být světelného i nesvětelného charakteru, nejdůležitější z nich jsou však periodické změny v intenzitě světla. Cirkadiánní systém savců se skládá z centrálního pacemakeru, uloženého v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, a dalších oscilátorů, které se nacházejí jak v jiných částech mozku, tak i v periferních orgánech a tkáních. Tento systém se vyvíjí postupně během ontogeneze a největší změny prodělává během pozdní embryonální a raně postnatální fáze života.

## 2. STRUKTURA A FUNKCE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Centrálním pacemakerem savčího cirkadiánního systému jsou suprachiasmatická jádra (SCN) hypotalamu (Klein, 1991). Další, tzv. periferní oscilátory se nacházejí i v jiných oblastech mozku a také v různých orgánech a tkáních těla (Abe a kol., 2001; Balsalobre, 2002; Schibler a Sassone-Corsi, 2002). Pro správnou funkci cirkadiánního systému musí být jednotlivé hodiny v těle synchronizovány, a to jednak mezi sebou navzájem a jednak vzhledem k denní době. Tuto synchronizační úlohu mají na starosti právě SCN, jako hlavní cirkadiánní pacemaker (Klein, 1991). Centrální hodiny v SCN jsou jako jediné přímo spojeny s retinou a přijímají tak informace o světle, které je pravidelně seřizuje. Centrální hodiny pak pomocí výstupních neuronálních i humorálních drah seřizují periferní oscilátory tak, aby byly ve správné fázi k denní době a také k sobě navzájem. Cirkadiánní systém savců je tedy hierarchicky uspořádán a zachování vzájemných fázových vztahů mezi jeho jednotlivými složkami je podmínkou jeho správné funkce (obrázek 1).



Obrázek 1 - Hierarchické uspořádání cirkadiánního systému u savců. Pacemaker uložený v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu dostává informace z vnějšího prostředí prostřednictvím retinohypotalamického traktu (RHT). Následně sesynchronizovává slabší oscilátory v jiných částech mozku a na periferii. (Reppert a Weaver, 2002)



## 2.1. Suprachiasmatická jádra

SCN jsou párové shluky neuronů, tj. jádra, která jsou uložena v předním hypotalamu, přímo nad překřížením optických nervů, chiasma opticus. Každé z nich obsahuje zhruba 10 000 buněk, které jsou vzájemně propojené. U dospělých jedinců má SCN dvě anatomicky a funkčně odlišné oblasti. Jedná se o ventrolaterální část, tzv. jádro (z angl. „core“), obsahující neurony produkující vasoaktivní intestinální peptid (VIP) nebo gastrin-releasing peptid (GRP). Nachází se bezprostředně nad optickým chiasma a je cílem aferentních drah, přinášejících informace do SCN. Druhá část SCN je dorsomediální oblast, tzv. obal (z angl. „shell“), obklopující jádro, který je charakterizován přítomností populace neuronů obsahujících arginin vasopresin (AVP) (Moore a kol., 2002).

Individuální neurony SCN generují autonomní cirkadiální rytmy (Welsh a kol., 1995). Od oscilátorů v ostatních buňkách těla se oscilátory v SCN odlišují v několika ohledech. Za prvé dostávají informace o světle přímo ze sítnice, což jim umožňuje synchronizovat se s cyklem světla a tmy (shrnutí v Morin a Allen, 2006). Za druhé mají topograficky organizovaný systém vzájemného propojení, který jim umožňuje se synchronizovat mezi sebou navzájem (viz níže) a to i v podmínkách konstantní tmy (Aton a Herzog, 2005). A za třetí generují cirkadiální rytmus v neuronální elektrické aktivitě, který jim umožňuje řadou přímých i nepřímých výstupních drah synchronizovat ostatní buňky v těle (Gachon a kol., 2004).

Ke komunikaci a synchronizaci mezi jednotlivými neurony v SCN navzájem dochází jednak prostřednictvím elektrické aktivity a také humorální cestou.

Yamaguchi a kol. v roce 2003 provedli pokus, jehož cílem bylo objasnit, zda je vzájemná synchronizace neuronů SCN vnitřní vlastností centrálních hodin, či zda se jedná jen o náhodnou a nepředvídatelně vznikající vlastnost tkáně. Sledovali rytmus v bioluminiscenci organotypických kultur obsahujících řezu SCN, která byla ukazatelem exprese genu *Per1*. Aplikace inhibitoru syntézy proteinů, cykloheximidu (CHX), zastavila rytmus v expresi *Per1* a po jeho odmytí byl rytmus opět obnoven, přičemž všechny neurony byly pomocí CHX synchronizovány do stejné fáze. Synchronizace rytmu v genové expresi byla napříč buněčnou kulturou obnovena prostřednictvím vzájemných interakcí mezi neurony. Schopnost synchronizovat se navzájem byla proto označena za schopnost vlastní tkáni SCN. Aplikace tetrodotoxinu (TTX), který selektivně a reversibilně blokuje Na kanály, a tím blokuje vznik akčního potenciálu, způsobila postupný pokles amplitud rytmů v expresi *Per1* a *Per2*. Okamžitě po odmytí TTX byla amplituda těchto rytmů obnovena. Tyto výsledky naznačily,

že akční potenciály, umožněné prostřednictvím  $\text{Na}^+$  napětově ovládanými kanály, mohou být důležité pro amplitudu rytmického signálu molekulárních hodin v SCN.

Vnitřní anatomie SCN se liší u různých živočišných druhů (shrnutí v Morin a Allen, 2006). Většina všech neuronů v SCN využívá jako neurotransmiter GABA (kyselina  $\gamma$ -aminohydroxymáselná) (Moore a Speh, 1993; Strecker a kol., 1997). Další neurochemickou látkou, zodpovědnou za správnou komunikaci a synchronizaci neuronů ve ventrolaterální části SCN, je již výše zmiňovaný VIP, společně s PHI (histidin-isooleucin peptid). Oba vznikají ze společného prekurzoru a oba se váží na tři třídy receptorů přítomných v mozku – VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> a PAC<sub>1</sub>. V SCN hlodavců byla prokázána přítomnost pouze VPAC<sub>2</sub> a PAC<sub>1</sub> (Usdin a kol., 1994). Pokud v SCN chybí funkční VPAC<sub>2</sub> receptory, cirkadiánní rytmus genové exprese i elektrické aktivity se zastaví (Cutler a kol., 2003). VIP je tudíž vnitřním faktorem nezbytným pro aktivaci a elektrickou synchronizaci neuronů SCN (Cutler a kol., 2003, Aton a kol., 2005). Maywood a kol. provedli v roce 2006 pokus, při kterém se jim podařilo pomocí depolarizace a aplikace neuropeptidu GRP na krátko zvýšit a synchronizovat molekulární hodiny v neuronech SCN, kterým chyběly receptory VPAC<sub>2</sub> (*Vipr2*<sup>-/-</sup> neurony), nicméně prchavě aktivované a synchronizované *Vipr2*<sup>-/-</sup> buňky nezůstaly v nepřítomnosti VIP-ergní signalizace synchronní. Kromě již výše zmíněných neuropeptidů VIP, PHI a GRP je nutné také zmínit malou populaci neuronů SCN, která vykazuje rytmickou syntézu somatostatinu SS. Jeho role v SCN však není dosud zcela objasněna (Card a kol., 1988).

Vstup informací z okolního prostředí do SCN je zajištěn dvěma základními mechanismy, neuronálními spoji a humorálními signály.

Neuronální dráhy, informující SCN o změnách ve vnějším prostředí, jsou dráhy retinohypotalamická, genikulohypotalamická a serotonergní. Retinohypotalamická dráha (RHT) je monosynaptická a je tvořena axony podskupiny retinálních gangliových buněk (Berson a kol., 2002). Fotoceptorové buňky a retinální gangliové buňky v sítnici zachycují a převádějí světelný signál přes tuto dráhu do SCN. Tomuto přenosu se budu detailně věnovat v kapitole 4.1. Retinální gangliové buňky (které nemají žádnou zrakovou funkci) jsou schopny přenášet světelný signál do SCN i při absenci tyčinek i čípků, a to prostřednictvím fotonepřevodního pigmentu melanopsinu (Ruby a kol., 2002; Semo a kol., 2003). Genikulohypotalamická dráha (GHT) je polysynaptická, vede z retiny nejprve do intergenikulárního listku talamu a odtud po přepojení do SCN. Mediátorem, který se uvolňuje na synapsích ve ventrolaterální části SCN je neuropeptid Y (Card a Moore, 1989; Moore a Card, 1994; Harrington a kol., 1985). Pomocí této dráhy dochází k integraci světelných signálů s nesvětelnými, které jsou do talamu přiváděny z jiných částí mozku (Harrington, 1997). Třetí drahou, přivádějící

informace do SCN, je dráha vedoucí ze středního mozku z jader raphe, využívající jako mediátor serotonin (shrnutí v van Esseveldt a kol., 2000).

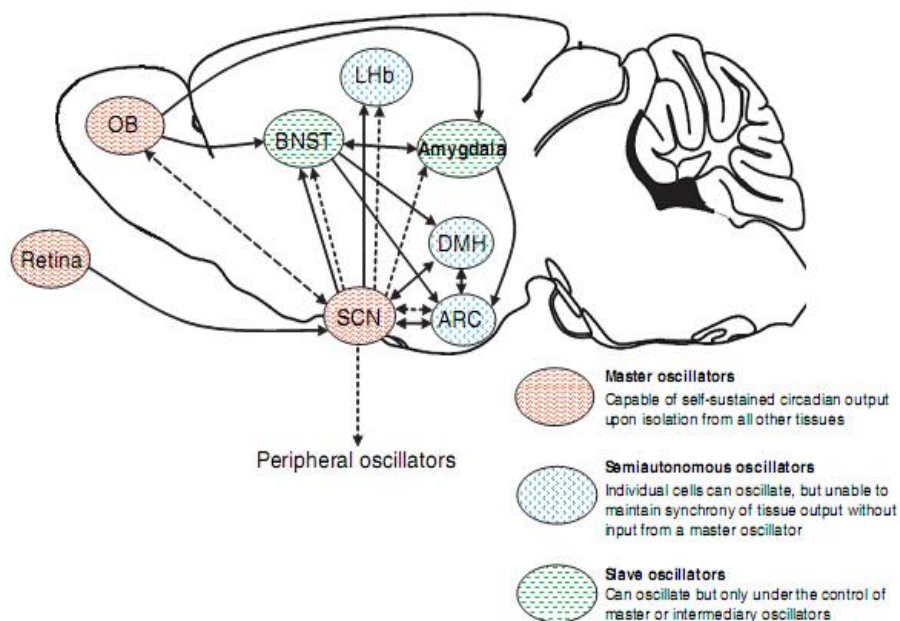
Humorální signály mohou SCN vnímat prostřednictvím receptorů, které jsou přítomny na membráně jejich neuronů. Pravděpodobně nejdůležitější jsou melatoninové receptory. Hormon melatonin je tvořen v epifyze a jeho tvorba je řízena z SCN tak, že jeho hladina je vysoká v noci a nízká ve dne (Klein a Moore, 1979). V SCN jsou přítomny dva podtypy melatoninových receptorů, MT1 a MT2 (Reppert a kol., 1995) a jejich hustota a rozdělení se liší v závislosti na živočišném druhu. Další receptory přítomné v SCN jsou například receptory leptinové (Hakansson a kol., 1998), ghrelinové (Zigman a kol., 2006) a insulinové receptory (Unger a kol., 1989).

## 2.2. Další oscilátory v mozku

Poznání molekulového mechanismu zajišťujícího chod cirkadiálních hodin (viz kapitola 3.) umožnilo v mozku kromě SCN identifikovat i jiné oblasti, které vykazují rytmické cirkadiální oscilace (Feillet a kol., 2008). Jako oscilátory mohou sloužit například i některá další jádra hypotalamu, dále jádra talamu, amygdala, bulbus olfactorius koncového mozku, mozeček a další (Abe a kol., 2002; Lamont a kol., 2005). Tyto jednotlivé oscilátory se však liší ve schopnosti udržovat endogenní oscilace a většina z nich je považována za oscilátory podřízené SCN (obrázek 2). Pokusy s transgenními potkany, u nichž je rytmická exprese genu pro luciferázu řízena myším promotorem hodinového genu *Per1* (viz kapitola 3) prokázaly, že z oscilátorů v mozku vykazovaly kromě SCN endogenní rytmus čichové bulby (bulbus olfactorius) a jádro s neuroendokrinní funkcí, nucleus arcuatus. Ostatní jádra vykazovala pouze slabší oscilace, které brzy vymizely (Abe a kol., 2002).

## 2.3. Retina

Sítnice savců také obsahuje autonomní hodiny (obrázek 2). Nejprve bylo objeveno, že v retině je rytmicky syntetizován melatonin, a to i v podmínkách stálé tmy, a že tento rytmus je teplotně kompenzovaný (Tosini a Menaker, 1996). Později pak bylo zjištěno, že v dopaminergních a jiných neuronech sítnice jsou rytmicky exprimovány hodinové geny. Cirkadiální oscilátory byly v retině lokalizovány nejen ve vnitřní vrstvě jader, ale také v samotné vrstvě fotoreceptorových buněk (Tosini a kol., 2007).



Obrázek 2 – Oscilátory v mozku savců. Červeně autonomní oscilátory. Modře semiautonomní. Zeleně slabé oscilátory. SCN – suprachiasmatická jádra, OB – čichové bulby, ARC – nucleus arcuatus, DMH – dorsomediální hypotalamu, BNST – bed nucleus of the stria terminalis, LHB – laterální habenula. (Guiliding a Piggins, 2007)

## 2.4. Periferní oscilátory

K objevu periferních oscilátorů přispěly pokusy, ve kterých byly *in vitro* kultivovány buňky nejrůznějších tkání transgenních zvířat a snímána bioluminiscence jako ukazatel exprese hodinového genu v reálném čase (viz kapitola 3). Tyto pokusy odhalily, že cirkadiánní oscilace v genové expresi vykazují mimo jiné játra, plíce, ledviny, slezina, slinivka, srdce, žaludek, kosterní svaly, rohovka, štítná žláza, nadledviny a střevo (Balsalobre a kol., 1998; Sládek a kol., 2007; Yamamoto a kol., 2004; Yamazaki a kol., 2000). Předpokládá se, že téměř všechny buňky v periferních tkáních obsahují vlastní cirkadiánní hodiny. Tyto periferní hodiny jsou schopny autonomních oscilací, vzájemně jsou však pravidelně synchronizovány signály z SCN (Guo a kol., 2006). Synchronizaci periferních oscilátorů je věnována kapitola 4.3.

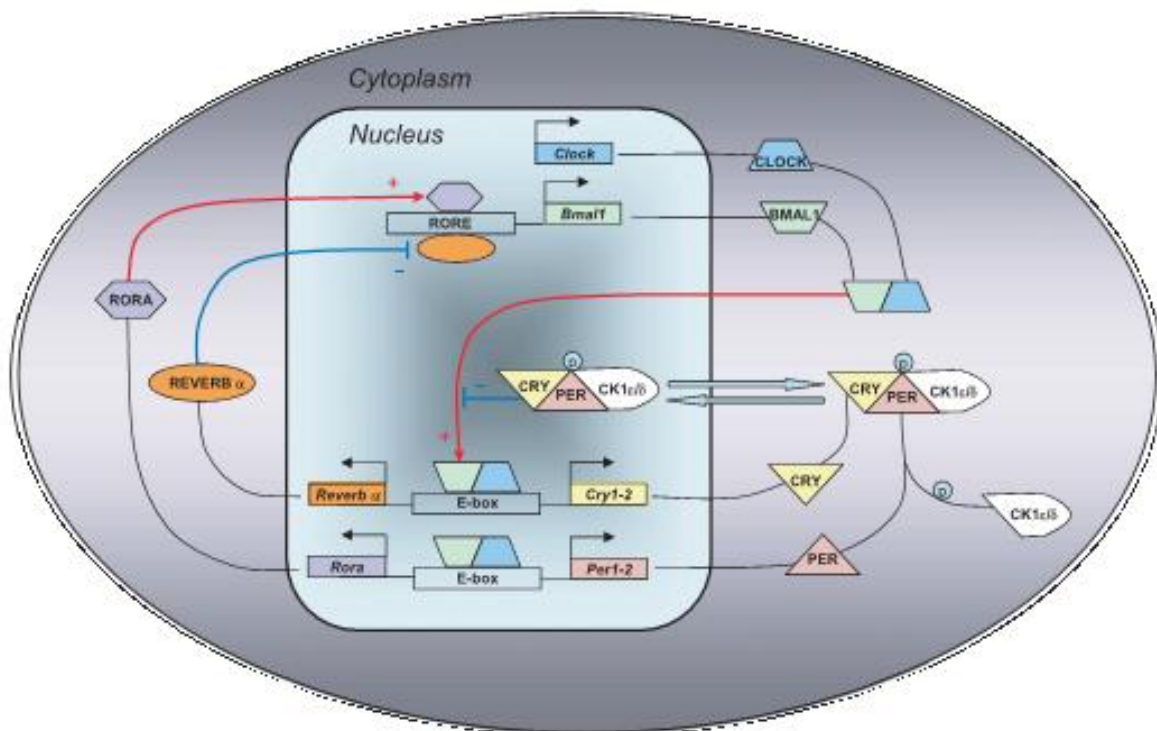
## 3. JAK PRACUJÍ CIRKADIÁNNÍ HODINY NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI?

Současný model molekulárního mechanismu hodin předpokládá, že rytmický signál vzniká na buněčné úrovni. Všechny buňky v těle jsou vybaveny sadou genů, nezbytných pro funkci cirkadiánních hodin, tzv. hodinových genů. Principy vytváření rytmického signálu jsou v centrálních i periferních hodinách podobné. Jedná se o autoregulační mechanismus řízený

vzájemně propojenými zpětnými vazbami, které časově kontrolují transkripci hodinových genů a translaci jejich proteinů (obrázek 3).

Do transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček jsou zahrnuty následující hodinové geny – tři geny *Period* (*Per1,2,3*), dva *Cryptochrom* (*Cry1,2*), *Clock*, *Bmal1*, *kasein kináza 1 epsilon* (*CK1ε*), *Rev-erba* a *Rora*. Proteinové produkty CLOCK a BMAL1 slouží jako transkripční aktivátory a zahajují transkripci genů *Per* a *Cry* vazbou na E-box elementy, přítomné na jejich promotorech. E-boxy jsou přítomny také na genech jaderných receptorů *Rev-erba* a *Rora*. Produkty genů *Per* a *Cry* - PER a CRY proteiny - tvoří heterodimery, vstupují do jádra, váží se na komplex CLOCK:BMAL1 a inhibují jeho aktivační vliv na transkripci svých genů, čímž uzavírají negativní zpětnovazebnou smyčku (Albrecht, 2004). Rytmická aktivace transkripce komplexem CLOCK:BMAL1 je dána cirkadiánními oscilacemi v transkripci hodinového genu *Bmal1*. Na regulaci jeho transkripce se podílí proteinové produkty genů REV-ERBA a RORA, které kompetují o vazebné místo na *Bmal1* promotoru a tím inhibují nebo aktivují jeho transkripci (Shearman a kol., 2000, Preitner a kol., 2002; Sato a kol., 2004). CK1ε je protein-kináza, která fosforyluje PER protein, čímž jej připravuje pro degradaci, a snižuje tak jeho hladinu v cytoplazmě. Další funkcí CK1ε je hyperfosforylace komplexu CLOCK:BMAL1 (Eide a kol., 2001; Eide a kol., 2005). Tyto spřažené pozitivní a negativní transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky, které tvoří základ autonomního chodu cirkadiánních hodin, se opakují s cirkadiánní periodou. Délka periody rytmičského signálu je regulována na úrovni post-translačních mechanismů (Lee a kol., 2001).

Kromě promotorů hodinových genů se E-boxy nacházejí také na promotorech dalších genů, které nejsou nezbytné pro molekulární chod hodin, ale jsou hodinovým mechanismem řízeny a nazývají se proto hodinami kontrolované geny (z angl. „clock-controlled genes“). Tyto rytmicky spínané geny zajišťují přenos cirkadiánního signálu z hodin na periferii. Odhaduje se, že 5 až 10% všech transkriptů v orgánech nebo tkáních, jsou hodinami kontrolované geny (Jin a kol., 1999; Panda a kol., 2002; Storch a kol., 2002). Mnoho z nich kóduje klíčové proteiny, zapojené do regulace fyziologických funkcí (Lowrey a Takahashi, 2004).



Obrázek 3 – Zjednodušený model molekulárního mechanismu hodin u savců. Mechanismus zahrnuje pozitivní (červeně) a negativní (modře) zpětnovazební smyčky. Heterodimery CLOCK:BMAL1 aktivují transkripci *Per*, *Cry* a *Rev-erba*. Fosforylovaný komplex PER:CRY se váže na heterodimery CLOCK:BMAL1 a tím inhibuje transkripci svých genů. Přidatná smyčka zahrnuje inhibici transkripce *Bmal1* prostřednictvím RORA a aktivaci jeho transkripce prostřednictvím REVERB $\alpha$  a aktivaci jeho transkripce prostřednictvím RORA. Pro bližší porozumění viz text výše. (Guilding a Piggins, 2007)

## 4. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Pro správnou funkci cirkadiánního systému je nutná jeho synchronizace s vnějším prostředím a také mezi jednotlivými oscilátory navzájem.

### 4.1. Synchronizace SCN

Pro SCN dospělých savců je hlavním synchronizačním signálem světlo. Informace o světle, které jsou přenášeny neuronálními spoji z oka do SCN, indukují genovou expresi, a tak synchronizují SCN k dennímu rytmu střídání světla a tmy. Světelný impulz způsobí, že axony speciálních gangliových buněk retiny, vedoucí do SCN, uvolňují glutamát a PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid) na synapsích s SCN neurony (Morin a Allen, 2006). Neuropeptid PACAP má modulační funkci – zvyšuje efekt glutamátu (Michel a kol., 2006). Glutamát působí na NMDA a AMPA receptory a depolarizuje membránu, což vede k vápníkovému influxu (Meijer a Schwartz, 2003). Vápník aktivuje komplexní síť kináz (calcium/calmodulin- dependent protein kinase (CaMK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase A (PKA)), což vede k fosforylaci CREB (calcium/cAMP response

element binding protein) (Ginty a kol., 1993; Obrietan a kol., 1998; Carlezon a kol., 2005). Aktivovaný CREB potom indukuje transkripci některých genů (včetně *c-fos* a *Period*) vazbou na calcium/cAMP response elements (CREs), ve spolupráci s přídatnými proteiny jako je CREB binding protein (CBP) (Hastings a kol., 1995; Rea, 1998; Field a kol., 2000; Shigeyoshi a kol., 1997). Změny v genové expresi v SCN jsou považovány za nejdůležitější mechanismus, který přenastavuje centrální hodiny u dospělých jedinců (Albrecht a kol., 2001).

#### 4.2. Synchronizace ostatních oscilátorů v mozku

Oscilátory v jiných částech mozku jsou pod přímou kontrolou SCN prostřednictvím nervových drah, které přináší rytmické vzruchy z SCN do konkrétních oblastí. Rytmus elektrické aktivity je zprostředkován iontovými kanály, které jsou řízeny molekulárním mechanismem (Pennartz a kol., 2002). Z axonů SCN se v těchto oblastech uvolňují signální molekuly, které zahrnují neurotransmitery a sekreční faktory. Dva neuropeptidy byly identifikovány jako tyto sekreční faktory a to transforming growth factor ( $TGF-\alpha$ ) a prokineticin 2 (PK2).  $TGF-\alpha$  je zřejmě inhibiční faktor, protože jeho vpravení do třetí mozkové komory má za následek zastavení motorické aktivity (Kramer a kol., 2001).  $TGF-\alpha$  je exprimován v SCN a retině, a zdá se, že inhibuje motorickou aktivitu působením na receptory v hypotalamické subparaventriculární zóně. Nejvýraznější efekt  $TGF-\alpha$  je však regulace světlem indukovaného potlačení motorické aktivity. Zprostředkováváním této světlem indukované suprese (tzv. „masking“) posiluje  $TGF-\alpha$  cirkadiální kontrolu nad noční aktivitou (Kramer a kol., 2001). PK2 je také rytmicky exprimován v myším SCN a přispívá ke kontrole cirkadiální behaviorální aktivity (Cheng a kol., 2002). Jeho vysoká hladina přes den snižuje lokomoční aktivitu myší. Pokud je PK2 aplikován intracerebroventrikulárně během noci, tj., v době, kdy je jeho hladina u nočních živočichů nízká, způsobí aplikace snížení aktivity (Cheng a kol., 2002).

#### 4.3. Synchronizace periferních oscilátorů

Periferní oscilátory jsou také kontrolovány centrálním pacemakerem v SCN. Přímé výstupní multisynaptické dráhy z SCN do periferních orgánů prostřednictvím autonomního nervového systému umožňují jejich přímou neuronální kontrolu (Bartness a kol., 2001). Pokud mají být periferní tkáně koordinované prostřednictvím SCN, potom musí existovat mechanismus k převodu synchronizovaných molekulárních oscilací na lokální rytmy. Jeden

ze způsobů jak je toto umožněno, je existence lokálních hodinami kontrolovaných genů (již dříve zmiňované „clock controlled genes“) (Jin a kol., 1999).

Periferní oscilátory jsou zřejmě synchronizovány prostřednictvím hormonální signalizace, např. glukokortikoidy (Balsalobre a kol., 2000).

Oscilátory v periferních tkáních mohou být synchronizovány i dalšími mechanismy. Například játra jsou synchronizována jednak signály z SCN, ale také nezávisle na centrálních hodinách např. změnou režimu v příjmu potravy. Omezený přístup k potravě způsobuje výrazný posun fáze exprese hodinových genů v játrech, i přes to, že cyklus střídání světla a tmy zůstává nezměněn (Stokkan a kol., 2001, Hara a kol., 2001). Damiola a kol. provedli v roce 2000 pokus, při kterém sledovali vliv omezeného přístupu k potravě na genovou expresi v různých orgánech. Změna režimu v příjmu potravy synchronizovala nejrychleji oscilátory v játrech a později i v oscilátory v ledvinách, srdci a pankreatu.

Kromě rytmického příjmu potravy hrají důležitou roli v synchronizaci periferních oscilátorů také rytmické změny v tělesné teplotě (Brown a kol., 2002).

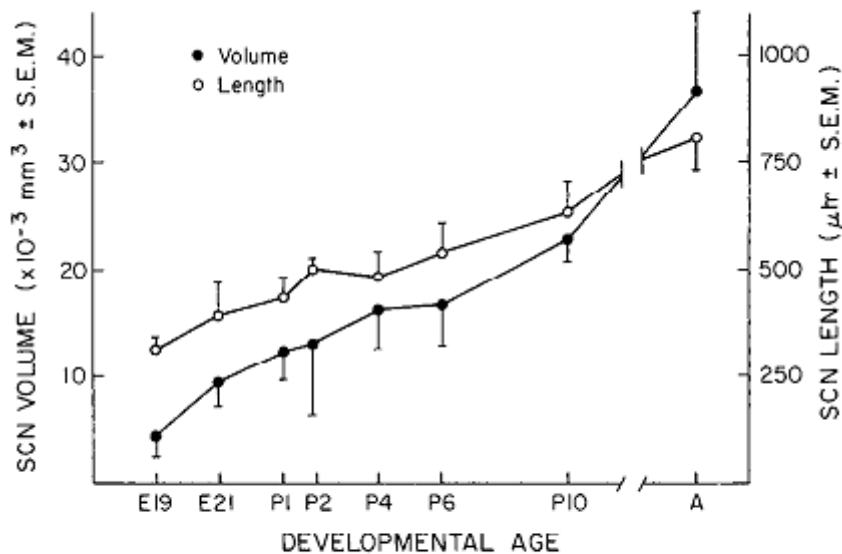
## 5. ONTOGENEZE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

### 5.1. ONTOGENEZE SUPRACHIASMATICKÝCH JADER

#### 5.1.1. Kdy se SCN vyvíjí morfologicky?

Ontogenetický vývoj morfologie SCN byl sledován nejvíce u potkana (Moore, 1991). Morfologicky se SCN u potkanů vyvíjí postupně. Prenatální období trvá 22 až 23 dní. Neurony SCN se začínají formovat od 14. dne embryonálního vývoje (E14) a neurogeneze pokračuje až do E17. SCN vzniká ze specializované zóny ventrálního diencefalického zárodečného (germinálního) epitelu, který je součástí periventrikulární skupiny buněk. Neurony tvořící obal („shell“) se vyvíjejí dříve, tj. v E15 a E16, a neurony tvořící jádro („core“) později, tj. v E16 až E17. Neurogeneze je ukončena v E18, ale další postupné zrání neuronální morfologie pokračuje až do 10. postnatálního dne (P10, obrázek 4). Synaptogeneze v SCN je převážně postnatální proces. V E19 je počet synapsí minimální, jejich počet stoupá nejprve pomalu do P4 a mezi P4 a P10 začne počet synapsí velmi rychle stoupat. V P10 synaptická densita dosahuje stejné úrovně jako v dospělosti a také jsou již přítomny všechny typy synapsí jako u dospělého jedince (Moore a Bernstein, 1989).





Obrázek 4 – Vývoj suprachiasmatických jader (SCN). Délka a objem jádra v závislosti na věku. (Moore a Bernstein, 1989)

### 5.1.2. Kdy SCN začínají vykazovat rytmus?

Vývoj rytmu v metabolické aktivitě buněk v SCN byl sledován pomocí obratu C14- značené deoxyglukózy (Reppert a Schwartz, 1984a). U potkana byl rozdíl mezi denní a noční hodnotou v metabolické aktivitě pozorován v pozdním embryonálním stádiu (E19 – E22). (Reppert a Schwartz, 1984a). Podobný výsledek byl zjištěn i u primátů (Reppert a Schwartz, 1984b). Je tedy zřejmé, že denní rytmus v metabolické aktivitě buněk SCN je přítomen krátce před narozením. Elektrická aktivita neuronů v SCN začíná vykazovat cirkadiánní rytmus v E22, ale postupně vzrůstá až do P14 (Shibata a Moore, 1987). U lidských plodů byly některé rytmy, které u dospělých řídí SCN, naměřeny již v prenatálním období, jako například rytmy ve střídání fáze aktivity a klidu, v dýchacích pohybech, v tepové frekvenci a v produkci moči (shrnuto v Mirmiran a kol., 1992).

Vývojem rytmů v expresi hodinových genů v SCN se zabývalo více výzkumných skupin. V práci autorů Sládek a kol. (2004) byly v SCN potkana sledovány cirkadiánní profily exprese pěti hodinových genů, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock*, a tří proteinů PER1, PER2 a CRY1, a to ve třech vývojových stádiích, tj. v E19, P3 a P10. Vývojové stádium E19, tj. 3 dny před porodem, bylo vybráno, protože je v tuto dobu již ukončena neurogeneze SCN, P3 reprezentuje vývojové stádium, kdy je v SCN stále ještě nízký počet synapsí a v P10 je synaptogeneze v SCN ukončena (Moore a Bernstein, 1989). Bylo zjištěno, že všechny sledované geny byly v E19 již exprimovány, tato exprese však nevykazovala rytmus. Na

rozdíl od mRNA však nebyly v tomto vývojovém stádiu detekovány hladiny žádného ze sledovaných proteinových produktů těchto genů. V E20, tedy 2 dny před porodem, se začínají objevovat rytmy v expresi některých hodinových genů a to konkrétně *Per1* a *Per2* (Ohta a kol. 2002, 2003, Kováčiková a kol., 2006). V P3 byl zjištěn rytmus v expresi genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Cry1*, avšak amplituda tohoto rytmu byla ještě stále nižší než v P10, kdy rytmus v expresi těchto genů odpovídal rytmům naměřeným u dospělých zvířat. Expresí genu *Clock* nebyla rytmická v žádném ze sledovaných vývojových stádií, stejně jako je tomu i v SCN dospělých zvířat (Sládek a kol., 2004). Z výsledků těchto studií tedy vyplynulo, že rytmy v expresi hodinových genů se v populaci SCN neuronů vyvíjí postupně až do 10. postnatálního dne. Ve studiích, které provedli Ohta a kol. (Ohta a kol., 2002, 2003), byla prokázána rytmická exprese hodinových genů *Per1* a *Per2* ve všech sledovaných fázích vývoje potkaních mláďat, tzn. v E20, P6, P13 a P20.

U myši, která má kratší dobu gestace, byl rytmus v expresi genu *Per1* prokázán v E17, tj. jeden den před porodem (Shimomura a kol., 2001; Ansari a kol., 2009). Podobně jako u potkana nebyly ani u myši v prenatalním období detekovány hladiny hodinových proteinů PER1 a PER2. Jediným hodinovým proteinem, který byl v prenatalním období v SCN detekován, je protein BMAL1 (Ansari a kol., 2009).

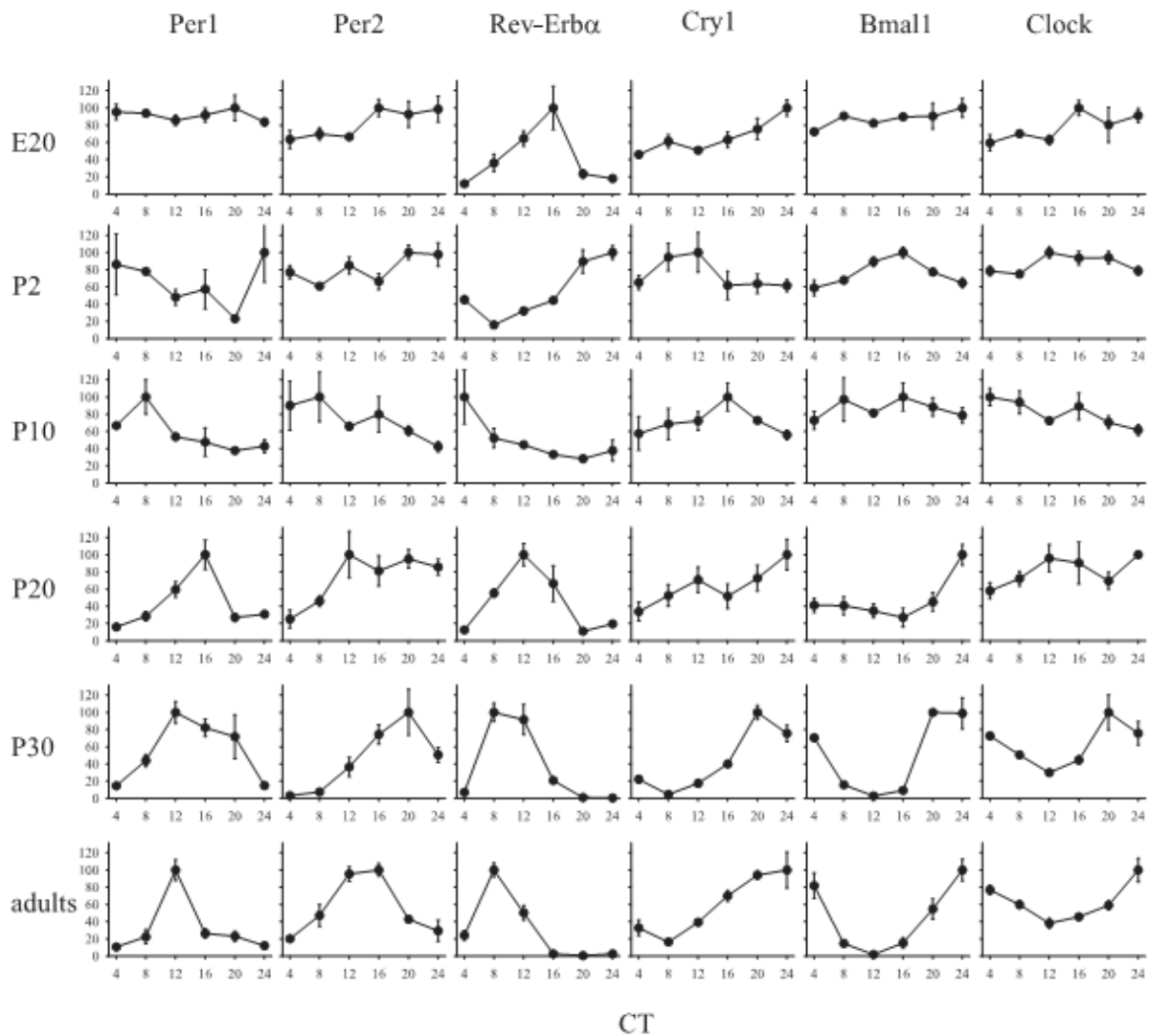
U Syrského křečka byla v SCN sledována *in vivo* exprese tří hodinových genů, tj. *Bmal1*, *Cry1* a *Per1* a před narozením nebyly přítomny rytmy v expresi žádného z těchto genů. Kromě BMAL1 nebyly přítomny ani proteinové produkty těchto genů (Li a Davis, 2005).

Vzhledem k nepřítomnosti detekovatelných hladin proteinových produktů hodinových genů, které hrají zásadní roli v molekulovém mechanismu hodin, je otázka schopnosti fetálních SCN generovat *in vivo* cirkadiální signál stále diskutována.

## 5.2. ONTOGENEZE PERIFERNÍCH OSCILÁTORŮ

Jak už bylo výše zmíněno, mnoho oblastí v mozku, periferních orgánů i tkání vykazuje rytmickou expresi hodinových genů. Zatímco v SCN začíná cyklická exprese hodinových genů mezi E19 a P3 (Sládek a kol., 2004; Ohta a kol., 2002; Ohta a kol., 2003), v periferních tkáních k tomu dochází později. V mozkové kůře se objevuje denní rytmus v expresi *mPer1* a *mPer2* mezi P14 a P50 (Shimomura a kol., 2001). V srdci potkana začíná rytmická exprese *Per1* a *Bmal1* mezi P2 a P5, avšak exprese *Per2* vykazuje rytmus až po P14 (Sakamoto a kol., 2002). V játrech se poprvé objevuje rytmus v expresi *Rev-erba* již v E20, exprese ostatních hodinových genů však vykazovala rytmus až během postnatálního období, tj. *Per1* v P10,

*Per2* a *Bmal1* v P20 a *Cry1* a *Clock* až teprve v P30. Fáze rytmu v expresi sledovaných genů se během vývoje posouvala. Tento posun zřejmě souvisí s postupným přechodem od krmení matkou, které probíhá během dne, na příjem pevné stravy, ke kterému dochází převážně během noci (Weinert a kol. 1994). Ze získaných dat vyplývá, že se v játrech cirkadiánní hodiny na molekulární úrovni vyvíjejí postupně a tento vývoj je ukončen v P30, tedy okolo odstavu (Sládek a kol., 2006), (obrázek 5).



Obrázek 5 – Denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock* v játrech potkana ve 20. embryonálním dni (E20), 2. postnatálním dni (P2), P10, P20, P30 a v játrech dospělého potkana. Čas je zde vyjádřen jako cirkadiánní čas (CT), kde CT12-24 představuje subjektivní noc. (Sládek a kol., 2006)

Yamazaki a kol. (2009) studovali v obsáhlé *in vitro* studii vývoj rytmické exprese genu *Per1-luc* (*Period1-luciferase*) u potkaních mláďat v různých periferních orgánech. Játra, štítná žláza a epifýza vykazovaly rytmickou expresi *Per1-luc* už v den narození a fáze jejich rytmické exprese se během vývoje znatelně posouvala. V játrech se fáze maxima v expresi *Per1-luc* posouvala ze dne do noci kolem P22. Ve štítné žláze se maximum v expresi *Per1-luc* posouvalo ze středu světlé části dne do brzké noci kolem P20. V epifýze k posunu došlo již kolem P5. V nadledvinkách byla maximální exprese *Per1-luc* po setmění a amplituda rytmu postupně vzrůstala až do P25. Buněčná kultura, kultivovaná z plicních buněk byla arytmiická až do P12, tj. do té doby než mláďata začala opouštět hnízdo. Z výsledků vyplývá, že vývoj periferních oscilátorů je tkáňově specifický.

## 6. SYNCHRONIZACE SCN BĚHEM ČASNÉ ONTOGENEZE

Dostupné důkazy indikují, že cirkadiánní hodiny v SCN začínají vykazovat oscilace již v pozdním embryonálním stádiu (viz kapitola 5.1.2.). Během prenatalního a časného postnatalního období jsou tyto hodiny vystavovány rytmickým mateřským signálům, které je synchronizují. V dospělosti je nejvýznamnějším synchronizátorem cirkadiánních hodin střídání světla a tmy. Avšak v rané ontogenezi, tzn. v pozdním embryonálním a časném postnatalním stádiu vývoje, se uplatňují nesvětelné podněty.

### 6.1. Synchronizace fetálních SCN

Informace o světlé fázi dne je z prostředí přenášena na plod prostřednictvím matky. Rytmus v metabolické aktivitě SCN fetů je synchronizován matkou i v případě, že matka nemůže vnímat světlo, např. pokud je slepá a její cirkadiánní rytmy tak volně běží v čase (Reppert and Schwartz, 1983). Pro synchronizaci fetálních SCN je potřeba intaktní SCN matky. Chirurgické odstranění SCN matky v rané fázi gestace neovlivnilo vývoj rytmů u jejich jednotlivých potomků, tyto rytmy však byly mezi sebou desynchronizovány (Reppert a Schwartz, 1986b; Davis a Gorski, 1988; Honma a kol., 1984a, Honma a kol., 1984b, Shibata a Moore, 1988, Weaver a Reppert, 1989b). Z toho vyplývá, že matčino SCN má funkci pouze synchronizační, ale není nezbytné pro to, aby se v SCN mláďat vyvinul mechanismus generující rytmy.

Podobné závěry byly učiněny také na základě výsledků studie, kdy byly mateřské cirkadiánní hodiny vyřazeny z funkce geneticky. Matky, které byly arytmiické z důvodu pozměnění funkce dvou hodinových genů, tj. *Per1* a *Per2* nebo *Per2* a *Cry1* (tzv. „double

mutant“), byly spárovány se samci, kteří měli funkční cirkadiánní hodiny („wild-type“). Heterozygotní potomci měli genetickou výbavu pro funkční cirkadiánní hodiny po otci a přitom byli vychováni matkou, která měla nefunkční hodiny. U jednotlivých mláďat se cirkadiánní hodiny vyvinuly stejně jako u kontrol, ale mláďata jednoho vrhu nebyla vzájemně synchronizována (Jud a Albrecht, 2006). Tyto výsledky opět potvrdily, že vývoj cirkadiánních rytmů není závislý na funkčních hodinách matky

Mechanismy, jakými matka nastavuje fázi cirkadiánních rytmů plodů, nejsou stále ještě zcela poznány. Pravděpodobně se jedná o celý komplex matčiných rytmických signálů, které mohou fetální SCN synchronizovat, např. rytmy behaviorální, metabolické, hormonální, apod.

Rané studie se zaměřovaly hlavně na působení hormonů, a to především na melatonin, který prostupuje placentou (Reppert a kol., 1979; McMillen a Nowak, 1989a; Yellon a Longo, 1987). Avšak chirurgické odstranění matčiny epifýzy nemělo výrazný vliv na koordinaci fetálních cirkadiánních rytmů. Také odstranění jiných matčiných endokrinních orgánů, jako hypofýzy, nadledvinek, štítné žlázy a příštítných tělísek nebo vaječnicků, nenarušilo mateřskou synchronizaci metabolické aktivity fetálního SCN (Reppert a Schwartz, 1986a).

Na druhou stranu však časované injekce melatoninu březím samicím Syrského křečka, kterým bylo předtím chirurgicky odstraněno SCN, obnovily synchronizaci fetálních rytmů (Davis a Mannion, 1988). Tento efekt vymizel po P6 (Grosse a kol., 1996). Podle všeho melatonin působí přímo na fetální SCN, které exprimuje melatoninové receptory (Duncan a Davis, 1993, Reppert a kol., 1988). Pokusy s transplantáty SCN potvrdily hypotézu, že fetální SCN obsahuje synchronizovatelný oscilátor, který je přímo senzitivní na melatonin. U křečka je tato senzitivita pouze dočasná a během vývoje klesá (Grosse a Davis, 1998).

Dalším mechanismem, který se podílí na mateřské synchronizaci fětů je dopaminergní systém. Periodické podávání agonisty D<sub>1</sub>-receptoru, SKF38393, matkám s odstraněným SCN bylo schopno synchronizovat plody a novorozence potkanů a křečků (Grosse a Davis, 1999; Viswanathan a kol., 1994). Stejně jako melatonin mohou i dopaminergní podněty působit přímo na SCN, které exprimuje D<sub>1</sub>-receptor (Weaver a kol., 1992). Navíc podávání kokainu nebo agonisty D<sub>1</sub>-receptoru indukuje expresi *c-fos* ve fetálním SCN u hlodavců (Bender a kol., 1997). Exprese okamžitých časných genů jako *c-fos*, *junB* a *egr-1* v SCN souvisí se zvýšenou neuronální aktivitou buněk SCN, ke které dochází během světlé fáze (shrnutí v Hastings a kol., 1995). Tudíž indukce *c-fos*, která následuje aktivaci D<sub>1</sub>-receptorů, může být pro fetální hodiny synchronizačním signálem. Melatonin a dopaminergní podněty synchronizují fetální hodiny do opačných fází, a to bez ohledu na to, kdy byla látka podána (Viswanathan a Davis, 1997). Dopamin působí jako signál pro světlou část dne a melatonin

pro tmavou část dne. Jakým mechanismem jsou však tyto signály spojeny s mechanismem, který seřizuje fetální hodiny není známo.

Podobně jako u hlodavců hraje mateřský melatonin roli v synchronizaci perinatálního cirkadiálního systému i u primátů (*Cebus paella*) (Seron-Ferre a kol., 2002). Také u lidí mohou být cirkadiální hodiny synchronizovány prostřednictvím melatoninu. SCN člověka obsahuje melatoninové receptory jak v dospělosti, tak již u plodů, takže vliv melatoninu na cirkadiální rytmicitu může začít u člověka již *in utero* (Reppert a kol., 1988). Vzhledem k tomu, že se melatoninové receptory vyskytují nejen v mozku, ale také i v periferních tkáních, nemusí být vliv melatoninu omezen jen na synchronizaci centrálního pacemakeru fétů (Thomas a kol., 1998). Cirkadiální systém primátů může být ovlivněn také dopaminergními látkami. Studie z konce 90. let minulého století dokázaly přítomnost mRNA a funkčních D<sub>1</sub>-receptorů v SCN u plodů i dospělých jedinců primátů a lidí (Rivkees a Lachowicz, 1997).

Dalším mechanismem, který by se mohl na mateřské synchronizaci fétů podílet, je signalizace prostřednictvím rytmického příjmu potravy. Weaver a Reppert (1989b) prováděli experimenty, ve kterých byl březím samicím s odstraněnými SCN omezen přístup k potravě pouze na určitou část dne. Zjistili, že tato změna režimu v příjmu potravy synchronizovala jejich fety. Podobně, pokud byl cirkadiální systém březích samic desynchronizován vlivem vystavení stálému světlu, byly rytmy v expresi genů v SCN jejich novorozených mláďat desynchronizovány. Změna režimu v příjmu potravy březích samic tyto rytmy synchronizovala (Nováková a kol. 2010). Pokud však byly březí samice synchronizovány vnějším světelným režimem, změna v příjmu potravy neměla na fázi rytmů v SCN jejich novorozených mláďat žádný vliv. Tento výsledek naznačuje, že fetální hodiny v SCN jsou primárně synchronizovány rytmickými signály z mateřského SCN, ale v podmínkách, kdy může být tento rytmický signál oslaben, jako např. v podmínkách stálého světla, může pravidelný příjem potravy hrát důležitou roli v synchronizaci hodin v SCN fétů a novorozených mláďat. Signály spojené s rytmickým kolísáním hladin živin a metabolitů v krvi jsou u dospělých jedinců schopny synchronizovat periferní oscilátory, nikoliv však SCN (Brown a kol., 2002; Rutter a kol., 2002; Stokkan a kol., 2001). V tomto ohledu se tedy fetální SCN chová jako periferní oscilátor. Kdy a jakým mechanismem fetální SCN tuto vlastnost ztrácí však není dosud známo.

Z dostupných dat tedy vyplývá, že mateřská synchronizace není zprostředkována pouze jedním synchronizačním signálem, ale spíše se jedná o komplex mateřských signálů, které se při synchronizaci fetálních biologických hodin navzájem doplňují a zastupují.

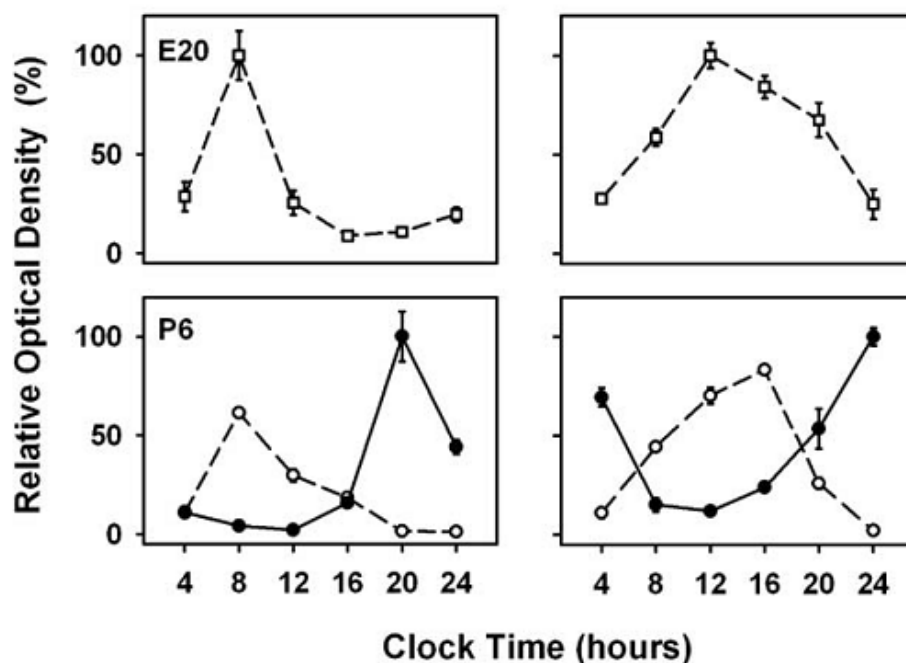
## 6.2. Nesvětelná synchronizace novorozených mláďat

Mateřský cirkadiánní systém synchronizuje časový systém mláďat i po porodu u altriciálních hlodavců, jako jsou myši, potkani a křečci. Důležitost mateřského vlivu je nejvíce zjevná během prvních dní života, než mláďata otevrou oči a začnou opouštět hnízdo a shánět si samy potravu. U prekociálních hlodavců, jako jsou morčata a myši bodlinaté, byla sice také pozorována významná mateřská synchronizace fětů, avšak po porodu už vliv matčina cirkadiánního systému pozorován nebyl. Tyto druhy se rodí ve vývojovém stádiu, které jim umožňuje okamžitě po porodu autonomní život (Weaver a Reppert, 1989a). Hlavním synchronizačním signálem tak pro ně je, stejně jako u dospělých, cyklus střídání světla a tmy (viz kapitola 6.3.).

Významný synchronizační vliv mateřských podnětů na neonatální hodiny byl dokázán ve studiích, kdy byla mláďata vychovávána náhradní matkou, tzv. „cross-fostering“ studie. Novorozenci byli synchronizováni s náhradní matkou, pokud k jejímu nahrazení došlo hned v prvních dnech života (Duffield a Ebling, 1998; Hiroshige a kol., 1982; Honma a kol., 1987; Reppert a kol., 1984; Takahashi a Deguchi, 1983). V další studii byly sledovány rytmy v expresi genů *Per1* a *Per2* v SCN mláďat, která byla okamžitě po narození oslepena a vychovávána náhradními matkami (Ohta a kol., 2002). Náhradní matky byly chovány na původním nebo obráceném světelném režimu. Byly pozorovány slabé, ale prokazatelné, rozdíly ve fázi cirkadiánních rytmů v expresi *Per1* a *Per2* mezi mláďaty odchovanými oběma skupinami matek, což dokazuje možnost mateřské synchronizace molekulárních hodin v neonatálním SCN (Ohta a kol., 2002). Současně výsledky ukázaly, že vliv kojící matky na neonatální cirkadiánní systém je relativně slabý.

Cyklus matčiny přítomnosti a nepřítomnosti v hnízdě může synchronizovat mláďata potkanů (Shimoda a kol., 1986; Sugishita a kol., 1993) a myši (Viswanathan, 1999; Viswanathan a Chandrashekar, 1985). Větší význam má zřejmě matčina nepřítomnost, než její péče (Ohta a kol., 2003). Matčina nepřítomnost během světlé části dne kompletně obrátila fázi cirkadiánního rytmu v hladinách *Per1* a *Per2* mRNA v neonatálním SCN (obrázek 6), zatímco výměna matek synchronizovaných k opačnému světelnému režimu posunula fázi rytmu exprese *Per1* v SCN pouze asi o 2 hodiny (Ohta a kol., 2002). Tyto výsledky naznačují, že periodická absence matky během obvyklé doby kojení přenastavuje fázi neonatálních cirkadiánních hodin (Ohta a kol., 2003). Nepřítomnost kojící matky je pro novorozence stresující a mění vnímavost neonatální osy hypotalamus – hypofýza – nadledvinky k vnějším

stimulům (Dent a kol., 2000a, 2000b; Meaney, 2001, Ohta a kol., 2003). Stres by se tedy mohl na synchronizaci novorozených mláďat podílet.



Obrázek 6 – Grafy ukazují 24-h profily relativní optické density hybridizačního signálu *Per1* a *Per2* mRNA v SCN ve 20. embryonálním dni (E20, prázdné čtverečky) a 6. postnatálním dni (P6, prázdná kolečka jsou kontrola a plná kolečka jsou mláďata s periodickou absencí matky). Vidíme obrácenou fázi cirkadiálního rytmu v expresi *Per1* a *Per2* mRNA oproti kontrolním mláďatům. (Ohta a kol., 2003)

V přirozených podmínkách nejsou mláďata hlodavců pravděpodobně nikdy přímo vystavena cyklu střídání světla a tmy. Matka proto pomáhá udržovat a posilovat jejich synchronizaci s vnějším světem až do té doby, než jsou schopna samostatného života a opustí hnízdo v podzemí. Matky jsou aktivní během noci, kdy si shánějí potravu mimo hnízdo a během dne odpočívají a zůstávají v kontaktu s mláďaty. Dokonce i v laboratorních podmínkách jsou matky aktivní a nemají kontakt s mláďaty během aktuální nebo subjektivní noci (Viswanathan, 1999). S cyklem přítomnosti a nepřítomnosti matky přímo souvisí i cyklus krmení novorozených mláďat. Krmení mláďat probíhá převážně během světlé části dne, a proto vykazují mláďata rytmus v příjmu potravy v podstatě obrácený s rytmem dospělců (Ader a Grotta, 1970, Levin a Stern, 1975). Důležité je, že fyzický kontakt s matkou je pro mláďata signálem subjektivního dne a matčina nepřítomnost je signálem subjektivní noci (Viswanathan, 1999).

Neuronální dráhy odpovědné za synchronizaci při kontaktu matky s mláďaty nejsou známy, ačkoliv mohou být podobné těm, které u dospělých jedinců zprostředkují synchronizaci prostřednictvím indukovaného vybuzení („arousal“) (Hastings a kol., 1998).



Mateřská synchronizace mláďat postupně klesá se stoupající zralostí jejich cirkadiálního systému (Reppert a kol., 1984; Shimoda a kol., 1986; Viswanathan, 1999).

### 6.3. Ontogeneze světelné synchronizace SCN

U potkanů začínají axony retinálních gangliových buněk opouštět retinu a formovat optický nerv v E15. Optické chiasma a primární optická dráha jsou formovány v E16 a E17 současně s RHT. V rané vývojové fázi (E18-P21) jsou optické chiasma a SCN odděleny zřetelnou hranicí. V P2 začínají axony z optického chiasma vstupovat do ventrální části SCN a mezi P4 a P10 zde dochází k velmi aktivní synaptogenezi. Hustota inervace postupně vzrůstá a v P15 dosahuje stejné úrovně jako u dospělého jedince. Ve stejné době probíhá také vývoj propojení axonů GHT (Moore 1991; Speh a Moore, 1993).

Pro zjištění, kdy začíná být cirkadiální systém citlivý na světelné podněty, bylo použito několik různých experimentálních postupů. SCN jsou citlivá na světlo již v den narození, protože metabolická aktivita SCN byla po expozici světlem během noci zvýšena (Fuchs a Moore, 1980). U potkanů indukovalo vystavení světelnému pulsu expresi časného raného genu *c-fos* (Weaver a Reppert, 1995, Leard a kol., 1994, Matějů a kol., 2009) a hodinového genu *Per1* (Matějů a kol., 2009) v SCN již první den po narození. U syrských a sibiřských křečků k indukci *c-fos* exprese světlem docházelo v P3 (Duffield a kol., 1995; Kaufman a Menaker, 1994). U myši byl Fos-like protein indukován světlem v SCN v P4 (Munoz a kol., 2000).

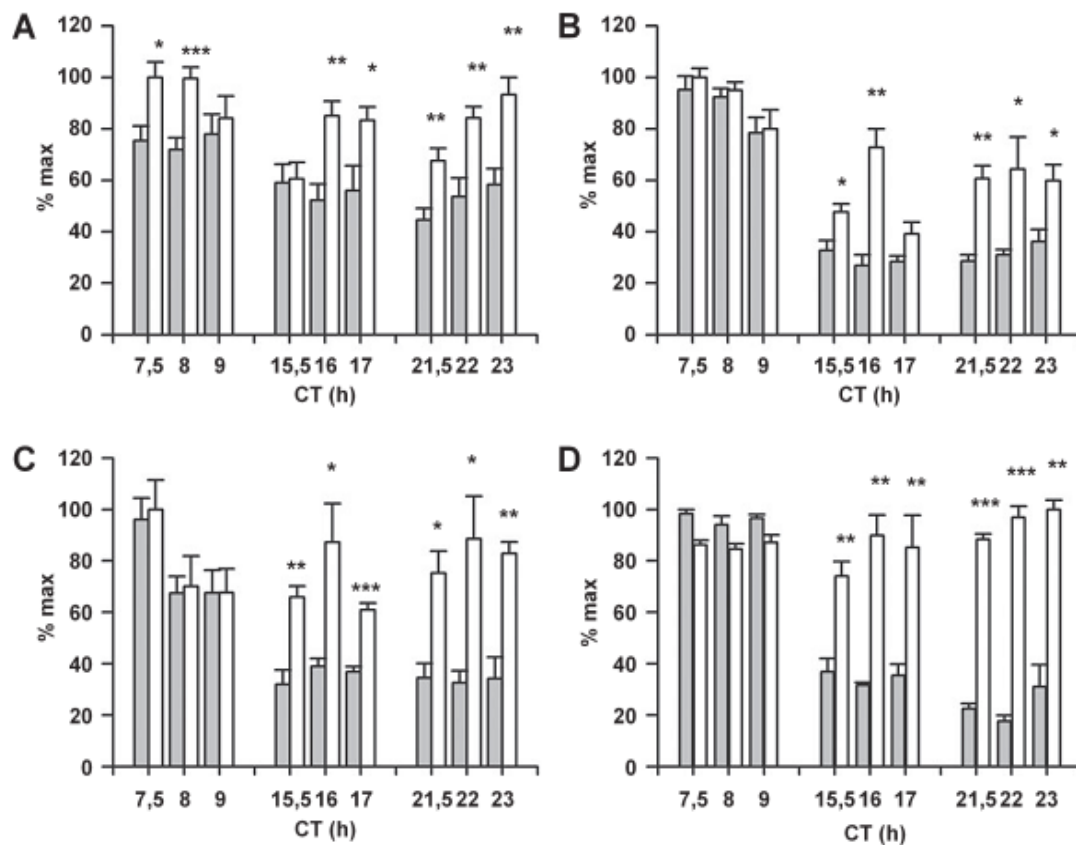
Jiná studie sledovala efekt světelné expozice na aktivitu pineální arylalkyl-amin N-acetyltransferázy (AA-NAT), která je klíčovým enzymem v syntéze melatoninu v epifýze (Ribelayga a kol., 1999). Cirkadiální rytmus v aktivitě AA-NAT je kontrolován SCN a poprvé se objevuje v P3. Inhibice tohoto enzymu po světelné expozici v noci byla poprvé pozorována v P6 (Bronstein a kol., 1990; Vaněček a Illnerová, 1985).

Světlo začíná u potkana synchronizovat SCN v P6 (Duncan a kol., 1986). Mláďata potkanů různého věku byla chována v podmínkách režimu střídání světla a tmy, který byl posouván a následně byl monitorován rytmus AA-NAT v epifýze mláďat. Výsledky ukázaly, že synchronizace světlem, která začíná v P6 zcela nahradí mateřskou synchronizaci v P8 (Duncan a kol., 1986).

U dospělých zvířat je světelná indukce exprese *c-fos* omezena na určitou cirkadiální dobu („gating mechanism“) a to konkrétně na subjektivní noc, kdy světelné impulzy způsobí fázový posun cirkadiální rytmicity (Colwell a Foster, 1992; Kornhauser a kol., 1990; Rusak a kol.,

1990). Cirkadiální „gating“ je předpokladem pro umožnění synchronizace prostřednictvím světla a tmy. Weaver a Reppert (1995) toto pozorovali u potkanů poprvé v P2. V jiné studii bylo zjištěno, že světelná expozice v jakoukoliv denní dobu indukuje vysokou produkci c-Fos a Per1 v SCN u potkaních mláďat do P3 a „gating“ mechanismus se postupně vyvíjí až okolo P10 (Matějů a kol., 2009), (obrázek 7).

Z výsledků těchto studií tedy vyplývá, že SCN je fotosenzitivní okamžitě po narození, světelná synchronizace se však postupně vyvíjí během prvního postnatálního týdne. Schopnost synchronizace je tak zřejmě závislá na dosažení určitého vývojového stupně, který pravděpodobně souvisí s vývojem funkčních synapsí mezi jednotlivými oscilátory v SCN. Zřejmě proto doba, kdy začínají být SCN synchronizována světlem, odpovídá době ukončení synaptogeneze v SCN.



Obrázek 7 - Účinek světelného pulzu na hladiny *Per2* mRNA v SCN. Mláďata potkana ve věku: 1.postnatální den P1 (A), P3(B), P5(C) a P10(D) byla umístěna do konstantní tmy a vystavena světelnému pulzu o délce 30min (700lux) během subjektivního dne (CT7) a v první (CT15) a druhé části subjektivní noci (CT21). Kontrolní mláďata zůstala ve tmě (tmavé sloupce). Hladiny *Per2* mRNA v SCN byly stanoveny histochemicky metodou *in situ* hybridizace a byly měřeny vždy 30min, 1hod a 2hod po začátku světelného pulzu (vždy trojice sloupců). Čas je zde vyjádřen jako cirkadiální čas (CT), kde CT0 je začátek subjektivního dne. Světelný pulz během světlé části dne způsobí nárůst *Per2* mRNA pouze v P3, ale nepůsobí podstatný nárůst hladiny *Per2* mRNA v pozdějších vývojových stádiích („gating mechanism“). Během noci hladiny *Per2* mRNA po expozici světlem narůstají oproti kontrolám. Nejmarkantněji to lze vidět v P10, kdy už je ukončena synaptogeneze v SCN. (Matějů a kol., 2009)

## 7. ZÁVĚR:

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o ontogenetickém vývoji cirkadiánního systému u savců. Časná ontogeneze není pouze záležitostí morfologického vývoje jednotlivých oscilátorů, ale také vývoje jejich synchronizace jak s vnějším prostředím, tak mezi sebou navzájem, která je nezbytná pro správnou funkci cirkadiánního systému.

Z dostupných výsledků vyplývá, že SCN začíná sice vykazovat oscilace v expresi hodinových genů už den před narozením, ale vzhledem k nepřítomnosti detekovatelných hladin jejich proteinových produktů, je schopnost SCN generovat tyto oscilace *in vivo* před narozením stále diskutována. Po narození jsou již hladiny těchto proteinů prokazatelné a rytmy v expresi hodinových genů dosahují úrovně dospělého jedince v době, kdy v SCN dochází k ukončení synaptogeneze. Pro vývoj cirkadiánních oscilací není přítomnost funkčního cirkadiánního systému matky bezpodmínečně nutná, protože na SCN mlád'at má pouze synchronizační vliv a cirkadiánní oscilace se vyvíjejí i u mlád'at arytmičtých matek. K synchronizaci SCN dochází nejprve během embryonálního vývoje prostřednictvím matky. I po narození je schopna během prvního týdne života mlád'ata synchronizovat, ale její vliv postupně slábne a po ukončení synaptogeneze je SCN mláděte plně synchronizované světlem. Ostatní oscilátory v těle se vyvíjejí se zpožděním vzhledem k SCN. Jejich ontogeneze je specifická pro jednotlivé orgány a tkáně a není tolik prozkoumána jako ontogeneze SCN.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- ABE, H., HONMA, S., NAMIHARA, M., MASUBUCHI, S., IKEDA, M., EBIHARA, S. & HONMA, K. 2001. Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice. *Molecular Brain Research*, 87, 92-99.
- ADER, R. & GROTA, L. J. 1970. Rhythmicity in maternal behaviour of *Rattus-Norvegicus*. *Animal Behaviour*, 18, 144-&.
- ALBRECHT, U. 2004. The mammalian circadian clock: A network of gene expression. *Frontiers in Bioscience*, 9, 48-55.
- ALBRECHT, U., ZHENG, B. H., LARKIN, D., SUN, Z. S. & LEE, C. C. 2001. mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 100-104.
- ANSARI, N., AGATHAGELIDIS, M., LEE, C., KORF, H. W. & VON GALL, C. 2009. Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *European Journal of Neuroscience*, 29, 477-489.
- ATON, S. J., COLWELL, C. S., HARMAR, A. J., WASCHEK, J. & HERZOG, E. D. 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8, 476-483.
- ATON, S. J. & HERZOG, E. D. 2005. Come together, right...now: Synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron*, 48, 531-534.
- BALSALOBRE, A. 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and Tissue Research*, 309, 193-199.
- 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.
- BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F. & SCHIBLER, U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-937.
- BARTNESS, T. J., SONG, C. K. & DEMAS, G. E. 2001. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 196-204.
- BERSON, D. M. 2003. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, 26, 314-320.
- BERSON, D. M., DUNN, F. A. & TAKAO, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295, 1070-1073.
- BRONSTEIN, D. M., HAAK, K. A., TORRES, G. & LYTLE, L. D. 1990. Light-induced-changes in pineal-gland N-acetyltransferase activity – developmental aspects. *Neuroendocrinology*, 51, 139-146.
- BROWN, S. A., ZUMBRUNN, G., FLEURY-OLELA, F., PREITNER, N. & SCHIBLER, U. 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology*, 12, 1574-1583.
- CARD, J. P., FITZPATRICKMCELLIGOTT, S., GOZES, I. & BALDINO, F. 1988. Lokalizacija of vasopresin-messenger RNA, vasoactive intestinal polypeptid-messenger RNA and somatostatin-messenger RNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell and Tissue Research*, 252, 307-315.
- CARD, J. P. & MOORE, R. Y. 1989. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 284, 135-147.
- CARLEZON, W. A., DUMAN, R. S. & NESTLER, E. J. 2005. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, 28, 436-445.
- CHENG, M. Y., BULLOCK, C. M., LI, C. Y., LEE, A. G., BERMAK, J. C., BELLUZZI, J., WEAVER, D. R., LESLIE, F. M. & ZHOU, Q. Y. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417, 405-410.
- COLWELL, C. S. & FOSTER, R. G. 1992. Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the

- suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 324, 135-142.
- CUTLER, D. J., HARAURA, M., REED, H. E., SHEN, S., SHEWARD, W. J., MORRISON, C. F., MARSTON, H. M., HARMAR, A. J. & PIGGINS, H. D. 2003. The mouse VPAC(2) receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 17, 197-204.
- 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.
- DAVIS, F. C. & GORSKI, R. A. 1988. Development of hamster circadian-rhythms – role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 162, 601-610.
- DAVIS, F. C. & MANNION, J. 1988. Entrainment of hamster pup circadian-rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *American Journal of Physiology*, 255, R439-R448.
- DENT, G. W., OKIMOTO, D. K., SMITH, M. A. & LEVINE, S. 2000a. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*, 71, 333-342.
- DENT, G. W., SMITH, M. A. & LEVINE, S. 2000b. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology*, 141, 1593-1598.
- DUFFIELD, G. E., DICKERSON, J. M., ALEXANDER, I. H. M. & EBLING, F. J. P. 1995. Ontogeny of a photic response in the suprachiasmatic nucleus in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *European Journal of Neuroscience*, 7, 1089-1096.
- DUFFIELD, G. E. & EBLING, F. J. P. 1998. Maternal entrainment of the developing circadian system in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Journal of Biological Rhythms*, 13, 315-329.
- DUNCAN, M. J., BANISTER, M. J. & REPERT, S. M. 1986. Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Research*, 369, 326-330.
- DUNCAN, M. J. & DAVIS, F. C. 1993. Developmental appearance and age-related-changes in specific 2-I-125 iodomelatonin binding-sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian-hamsters. *Developmental Brain Research*, 73, 205-212.
- EIDE, E. J., KANG, H., CRAPO, S., GALLEGOS, M. & VIRSHUP, D. M. 2005. Casein kinase I in the mammalian circadian clock. *Circadian Rhythms*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- EIDE, E. J. & VIRSHUP, D. M. 2001. Casein kinase I: Another cog in the circadian clockworks. *Chronobiology International*, 18, 389-398.
- FEILLET, C. A., MENDOZA, J., ALBRECHT, U., PEVET, P. & CHALLET, E. 2008. Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37, 209-221.
- FIELD, M. D., MAYWOOD, E. S., O'BRIEN, J. A., WEAVER, D. R., REPERT, S. M. & HASTINGS, M. H. 2000. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, 25, 437-447.
- FUCHS, J. L. & MOORE, R. Y. 1980. Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus – a study using the 2-deoxy glucose-1-C-14 method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77, 1204-1208.
- GACHON, F., NAGOSHI, E., BROWN, S. A., RIPPERGER, J. & SCHIBLER, U. 2004. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*, 113, 103-112.
- GINTY, D. D., KORNHAUSER, J. M., THOMPSON, M. A., BADING, H., MAYO, K. E., TAKAHASHI, J. S. & GREENBERG, M. E. 1993. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, 260, 238-241.
- GROSSE, D. & DAVIS, F. C. 1998. Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian

- hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts. *Journal of Neuroscience*, 18, 8032-8037.
- GROSSE, J. & DAVIS, F. C. 1999. Transient entrainment of a circadian pacemaker during development by dopaminergic activation in Syrian hamsters. *Brain Research Bulletin*, 48, 185-194.
- GROSSE, J., VELICKOVIC, A. & DAVIS, F. C. 1996. Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 270, R533-R540.
- 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.
- GUILDING, C. & PIGGINS, H. D. 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience*, 25, 3195-3216.
- HAKANSSON, M. L., BROWN, H., GHILARDI, N., SKODA, R. C. & MEISTER, B. 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 18, 559-572.
- HARA, R., WAN, K. K., WAKAMATSU, H., AIDA, R., MORIYA, T., AKIYAMA, M. & SHIBATA, S. 2001. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*, 6, 269-278.
- HARRINGTON, M. E. 1997. The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: Interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 705-727.
- HARRINGTON, M. E., NANCE, D. M. & RUSAK, B. 1985. Neuropeptide-Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Research Bulletin*, 15, 465-472.
- HASTINGS, M. H., DUFFIELD, G. E., SMITH, E. J. D., MAYWOOD, E. S. & EBLING, F. J. P. 1998. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology International*, 15, 425-445.
- HASTINGS, M. H., EBLING, F. J. P., GROSSE, J., HERBERT, J., MAYWOOD, E. S., MIKKELSEN, J. D. & SUMOVA, A. 1995. Immediate-early genes and neural bases of photic and non-photoc entrainment. In: CHADWICK, D. J. & ACKRILL, K. (eds.) *Circadian Clocks and Their Adjustment*.
- HIROSHIGE, T., HONMA, K. I. & WATANABE, K. 1982. Prenatal onset and maternal modifications of the circadian-rhythm of plasma-corticosterone in blind infantile rats. *Journal of Physiology-London*, 325, 521-532.
- HONMA, K., HONMA, S., SHIRAKAWA, T. & HIROSHIGE, T. 1987. Phase setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *American Journal of Physiology*, 252, R256-R261.
- HONMA, S., HONMA, K., SHIRAKAWA, T. & HIROSHIGE, T. 1984a. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma-corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology*, 114, 1791-1796.
- HONMA, S., HONMA, K. I., SHIRAKAWA, T. & HIROSHIGE, T. 1984b. Effects of elimination of maternal circadian-rhythms during pregnancy on the postnatal-development of circadian corticosterone rhythm in blinded infantile rats. *Endocrinology*, 114, 44-50.
- JIN, X. W., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., ZYLKA, M. J., DE VRIES, G. J. & REPERT, S. M. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96, 57-68.
- JUD, C. & ALBRECHT, U. 2006. Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, 21, 149-154.
- KLEIN, D. C. & MOORE, R. Y. 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase – control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 174, 245-262.

- KLEIN, D.C., MOORE, R.Y., REPPERT, S.M., eds. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford University Press, 391-404.
- KORNHAUSER, J. M., NELSON, D. E., MAYO, K. E. & TAKAHASHI, J. S. 1990. Photic and circadian regulation of c-fos-gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, 5, 127-134.
- KOVACIKOVA, Z., SLADEK, M., BENDOVA, Z., ILLNEROVA, H. & SUMOVA, A. 2006. Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *Journal of Biological Rhythms*, 21, 140-148.
- KRAMER, A., YANG, F. C., SNODGRASS, P., LI, X. D., SCAMMELL, T. E., DAVIS, F. C. & WEITZ, C. J. 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, 294, 2511-2515.
- LAMONT, E. W., ROBINSON, B., STEWART, J. & AMIR, S. 2005. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 4180-4184.
- LEARD, L. E., MACDONALD, E. S., HELLER, H. C. & KILDUFF, T. S. 1994. Ontogeny of photic-induced c-fos messenger-RNA expression in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport*, 5, 2683-2687.
- 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.
- LEVIN, R. & STERN, J. M. 1975. Maternal influence on ontogeny of suckling and feeding rhythms in rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 89, 711-721.
- LI, X. D. & DAVIS, F. C. 2005. Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster. *Developmental Brain Research*, 158, 31-40.
- LOWREY, P. L. & TAKAHASHI, J. S. 2004. Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 407-441.
- MATEJU, K., BENDOVA, Z., EL-HENNAMY, R., SLADEK, M., SOSNIYENKO, S. & SUMOVA, A. 2009. Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 29, 490-501.
- MAYWOOD, E. S., REDDY, A. B., WONG, G. K. Y., O'NEILL, J. S., O'BRIEN, J. A., MCMAHON, D. G., HARMAR, A. J., OKAMURA, H. & HASTINGS, M. H. 2006. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology*, 16, 599-605.
- MCMILLEN, I. C. & NOWAK, R. 1989. Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Journal of Endocrinology*, 120, 459-464.
- MEANEY, M. J. 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161-1192.
- MEIJER, J. H. & SCHWARTZ, W. J. 2003. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18, 235-249.
- MICHEL, S., ITRI, J., HAN, J. H., GNIOTCZYNSKI, K. & COLWELL, C. S. 2006. Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Bmc Neuroscience*, 7.
- MIRMIRAN, M., KOK, J. H., BOER, K. & WOLF, H. 1992. Perinatal-development of human circadian-rhythms – role of the fetal biological clock. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 371-378.
- MOORE, R.Y. 1991. Development of the suprachiasmatic nucleus. In: KLEIN, D.C., MOORE, R.Y., REPPERT, S.M., eds. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford University Press, 391-404.
- MOORE, R. Y. & BERNSTEIN, M. E. 1989. Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by elektron-microscopy and synapsin-1 immunoreactivity. *Journal of Neuroscience*, 9, 2151-2162.

- MOORE, R. Y. & CARD, J. P. 1994. Intergeniculate leaflet – an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *Journal of Comparative Neurology*, 344, 403-430.
- MOORE, R. Y. & SPEH, J. C. 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, 150, 112-116.
- MOORE, R. Y., SPEH, J. C. & LEAK, R. K. 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309, 89-98.
- MORIN, L. P. & ALLEN, C. N. 2006. The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews*, 51, 1-60.
- MUNOZ, L.M., HUERTA, J.J., CERNUDA-CERNUDA, R., GARCIA-FERNANDEZ, J.M. 2000. Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Developmental Brain Research*, 120, 1-6.
- NOVAKOVA, M., SLADEK, M. & SUMOVA, A. 2010. Exposure of Pregnant Rats to Restricted Feeding Schedule Synchronizes the SCN Clocks of Their Fetuses under Constant Light but Not under a Light-Dark Regime. *Journal of Biological Rhythms*, 25, 350-360.
- OBRIETAN, K., IMPEY, S. & STORM, D. R. 1998. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nature Neuroscience*, 1, 693-700.
- OHTA, H., HONMA, S., ABE, H. & HONMA, K. 2002. Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *European Journal of Neuroscience*, 15, 1953-1960.
- OHTA, H., HONMA, S., ABE, H. & HONMA, K. 2003. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1628-1634.
- 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.
- PENNARTZ, C. M. A., DE JEU, M. T. G., BOS, N. P. A., SCHAAP, J. & GEURTSSEN, A. M. S. 2002. Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature*, 416, 286-290.
- 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.
- REA, M. A. 1998. Photic entrainment of circadian rhythms in rodents. *Chronobiology International*, 15, 395-423.
- REPPERT, S. M., CHEZ, R. A., ANDERSON, A. & KLEIN, D. C. 1979. Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatric Research*, 13, 788-791.
- REPPERT, S. M., COLEMAN, R. J., HEATH, H. W. & SWEDLOW, J. R. 1984. Pineal N-acetyltransferase activity in 10-day-old rats – a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinology*, 115, 918-925.
- REPPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A. & GUSELLA, J. F. 1995. Molecular characterization of a 2nd melatonin receptor expressed in human retina and brain – the MEL(1B)melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8734-8738.
- REPPERT, S. M. & SCHWARTZ, W. J. 1983. Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science*, 220, 969-971.
- REPPERT, S. M. & SCHWARTZ, W. J. 1984a. Functional-activity of the suprachiasmatic nuclei in the fetal primate. *Neuroscience Letters*, 46, 145-149.
- REPPERT, S. M. & SCHWARTZ, W. J. 1984b. THE SUPRACHIASMATIC NUCLEI OF THE FETAL-RAT -



- CHARACTERIZATION OF A FUNCTIONAL CIRCADIAN CLOCK USING C-14-LABELED DEOXYGLUCOSE. *Journal of Neuroscience*, 4, 1677-1682.
- REPPERT, S. M. & SCHWARTZ, W. J. 1986a. Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology*, 119, 1763-1767.
- REPPERT, S. M. & SCHWARTZ, W. J. 1986b. Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *Journal of Neuroscience*, 6, 2724-2729.
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., RIVKEES, S. A. & STOPA, E. G. 1988. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*, 242, 78-81.
- RIBELAYGA, C., GARIDOU, M. L., MALAN, A., GAUER, F., CALGARI, C., PEVET, P. & SIMONNEAUX, V. 1999. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *Journal of Biological Rhythms*, 14, 105-115.
- RIVKEES, S. A. & LACHOWICZ, J. E. 1997. Functional D1 and D5 dopamine receptors are expressed in the suprachiasmatic, supraoptic, and paraventricular nuclei of primates. *Synapse*, 26, 1-10.
- RUBY, N. F., BRENNAN, T. J., XIE, X. M., CAO, V., FRANKEN, P., HELLER, H. C. & O'HARA, B. F. 2002. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 298, 2211-2213.
- RUSAK, B., ROBERTSON, H. A., WISDEN, W. & HUNT, S. P. 1990. Light-pulses that shift rhythms induce gene-expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 248, 1237-1240.
- RUTTER, J., REICK, M. & MCKNIGHT, S. L. 2002. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 307-331.
- SAKAMOTO, K., OISHI, K., NAGASE, T., MIYAZAKI, K. & ISHIDA, N. 2002. Circadian expression of clock genes during ontogeny in the rat heart. *Neuroreport*, 13, 1239-1242.
- SATO, T. K., PANDA, S., MIRAGLIA, L. J., REYES, T. M., RUDIC, R. D., MCNAMARA, P., NAIK, K. A., FITZGERALD, G. A., KAY, S. A. & HOGENESCH, J. B. 2004. A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43, 527-537.
- SCHIBLER, U. & SASSONE-CORSI, P. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111, 919-922.
- SEMO, M., LUPI, D., PEIRSON, S. N., BUTLER, J. N. & FOSTER, R. G. 2003. Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *European Journal of Neuroscience*, 18, 3007-3017.
- SERON-FERRE, M., TORRES, C., PARRAGUEZ, V. H., VERGARA, M., VALLADARES, L., FORCELLEDO, M. L., CONSTANDIL, L. & VALENZUELA, G. J. 2002. Perinatal neuroendocrine regulation. Development of the circadian time-keeping system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186, 169-173.
- 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. & REPPERT, S. M. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288, 1013-1019.
- SHIBATA, S. & MOORE, R. Y. 1987. Development of neuronal-activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, 34, 311-315.
- SHIBATA, S. & MOORE, R. Y. 1988. Development of a fetal circadian-rhythm after disruption of the maternal circadian system. *Developmental Brain Research*, 41, 313-317.
- SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAMAMOTO, S., TAKEKIDA, S., YAN, L., TEI, H., MORIYA, T., SHIBATA, S., LOROS, J. J., DUNLAP, J. C. & OKAMURA, H. 1997. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, 91, 1043-1053.
- SHIMODA, K., HANADA, K., YAMADA, N., TAKAHASHI, K. & TAKAHASHI, S. 1986. Periodic exposure to mother is potent Zeitgebers of rat pups rhythm. *Physiology & Behavior*, 36, 723-730.

- SHIMOMURA, H., MORIYA, T., SUDO, M., WAKAMATSU, H., AKIYAMA, M., MIYAKE, Y. & SHIBATA, S. 2001. Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *European Journal of Neuroscience*, 13, 687-693.
- SLADEK, M., JINDRAKOVA, Z., BENDOVA, Z. & SUMOVA, A. 2006. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 292, R1224-R1229.
- 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., KOVACIKOVA, Z., BENDOVA, Z., LAURINOVA, K. & ILLNEROVA, H. 2004. Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 6231-6236.
- SPEH, J. C. & MOORE, R. Y. 1993. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Developmental Brain Research*, 76, 171-181.
- 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.
- STORCH, K. F., LIPAN, O., LEYKIN, I., VISWANATHAN, N., DAVIS, F. C., WONG, W. H. & WEITZ, C. J. 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417, 78-83.
- STRECKER, G. J., WUARIN, J. P. & DUDEK, F. E. 1997. GABA(A)-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 78, 2217-2220.
- TAKAHASHI, K. & DEGUCHI, T. 1983. Entrainment of the circadian-rhythms of blinded infant rats by nursing mothers. *Physiology & Behavior*, 31, 373-378.
- THOMAS, L., DREW, J. E., ABRAMOVICH, D. R. & WILLIAMS, L. M. 1998. The role of melatonin in the human fetus (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 1, 539-543.
- TOSINI, G., DAVIDSON, A. J., FUKUHARA, C., KASAMATSU, M. & CASTAMON-CERVANTES, O. 2007. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *Faseb Journal*, 21, 3866-3871.
- TOSINI, G. & MENAKER, M. 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272, 419-421.
- UNGER, J., MCNEILL, T. H., MOXLEY, R. T., WHITE, M., MOSS, A. & LIVINGSTON, J. N. 1989. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forbrain. *Neuroscience*, 31, 143-157.
- USDIN, T. B., BONNER, T. I. & MEZEY, E. 1994. 2 receptors for vasoactive intestina polypeptid with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology*, 135, 2662-2680.
- VAN ESSEVELDT, L. K. E., LEHMAN, M. N. & BOER, G. J. 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews*, 33, 34-77.
- VANECEK, J. & ILLNEROVA, H. 1985. Effect of short and long photoperiods on pineal N-acetyltransferase rhythm and on growth of testes and brown adipose-tissue in developing rats. *Neuroendocrinology*, 41, 186-191.
- VISWANATHAN, N. 1999. Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J). *Physiology & Behavior*, 68, 157-162.
- VISWANATHAN, N. & DAVIS, F. C. 1997. Single prenatal injections of melatonin or the D1-dopamine receptor agonist SKF 38393 to pregnant hamsters sets the offsprings' circadian rhythms to phases 180 degrees apart. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 180, 339-346.
- VISWANATHAN, N., WEAVER, D. R., REPPERT, S. M. & DAVIS, F. C. 1994. Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF-38393. *Journal of Neuroscience*, 14, 5393-5398.

- WEAVER, D. R. & REPPERT, S. M. 1989a. Direct in utero perception of light by the mammalian fetus. *Developmental Brain Research*, 47, 151-155.
- WEAVER, D. R. & REPPERT, S. M. 1989b. Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Developmental Brain Research*, 46, 291-296.
- WEAVER, D. R. & REPPERT, S. M. 1995. Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene-expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*, 33, 136-148.
- WEAVER, D. R., RIVKES, S. A. & REPPERT, S. M. 1992. D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9201-9204.
- WEINERT, D., SITKA, U., MINORS, D. S. & WATERHOUSE, J. M. 1994. The development of circadian rhythmicity in neonates. *Early Human Development*, 36, 117-126.
- WELSH, D. K., LOGOTHETIS, D. E., MEISTER, M. & REPPERT, S. M. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian forint rhythms. *Neuron*, 14, 697-706.
- 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.
- YAMAMOTO, T., NAKAHATA, Y., SOMA, H., AKASHI, M., MAMINE, T. & TAKUMI, T. 2004. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *Bmc Molecular Biology*, 5.
- 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.
- YAMAZAKI, S., YOSHIKAWA, T., BISCOE, E. W., NUMANO, R., GALLASPY, L. M., SOULSBY, S., PAPADIMAS, E., PEZUK, P., DOYLE, S. E., TEI, H., SAKAKI, Y., BLOCK, G. D. & MENAKER, M. 2009. Ontogeny of Circadian Organization in the Rat. *Journal of Biological Rhythms*, 24, 55-63.
- YELLON, S. M. & LONGO, L. D. 1987. Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in sheep. *American Journal of Physiology*, 252, E799-E802.
- ZIGMAN, J. M., JONES, J. E., LEE, C. E., SAPER, C. B. & ELMQUIST, J. K. 2006. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 494, 528-548.