

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyziologie živočichů



Kateřina Červená

**Buněčné signální dráhy zapojené v synchronizaci savčích  
biologických hodin**

**Cellular signaling pathways engaged in the entrainment of  
mammalian biological clock**

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Zdena Bendová, PhD  
Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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, 9.5.2011

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Zdeně Bendové, PhD. za její ochotný a motivující přístup, inspirativní konzultace a odborné vedení práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu při psaní této práce.

**Abstrakt:**

Biologické hodiny savců jsou založeny na endogenních rytmických oscilacích takzvaných hodinových genů, které ovlivňují načasování vnějších projevů, například rytmické střídání spánku a aktivity. Tento vnitřní mechanismus, jehož vrozená perioda se mírně odchyluje od solárního času, je možno seřizovat různými vnějšími synchronizátory na periodu přesně 24 hodin. Tato práce se zabývá vlivem nejvýraznějšího synchronizátoru, jímž je sluneční světlo, na molekulární podstatu změny dynamiky mechanismu vnitřních oscilací v hlavním savčím cirkadiánním pacemakeru, suprachiasmatických jádrech hypotalamu. Existuje nespočet prací, které prokázaly vliv různých buněčných signálních drah na změny cirkadiánních rytmů. Nejčastějšími metodami posuzování fázových změn oscilací je však měření změn ve výstupních rytmech, které ne vždy musí odrážet i změny v mechanismu molekulárním. Cílem je tedy zhodnotit, které komponenty signálních drah prokazatelně ovlivňují dynamiku rytmické exprese hodinových genů.

**Klíčová slova:** Cirkadiánní systém, biologické rytmy, suprachiasmatická jádra, synchronizace, světlo, buněčná signalizace

**Abstract:**

The mammalian biological clock is based on endogenous rhythmic oscillations of the so-called clock genes which affects the timing of the external manifestations, such as rhythmic alternations of sleep and activity. This endogenous mechanism, of which the innate period slightly deviates from the solar time, can be adjusted by various external synchronizers to the exact 24 hour period. This thesis is focused on the influence of the most prominent synchronizer, the sunlight, on the molecular basis of changes in the dynamics of internal mechanism of the oscillations in the main mammalian circadian pacemaker, the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. There are numerous studies which have demonstrated the effect of various cellular signaling pathways on changes of circadian rhythms. The most common methods of assessing the oscillation phase changes, however, measure changes in output rhythms that may not always reflect the changes in the molecular mechanism itself. The aim is to evaluate which components of signaling pathways have provably shown to affect the dynamics of the rhythmic expression of clock genes.

**Key words:** Circadian system, biological rhythms, suprachiasmatic nuclei, synchronization, light, cellular signaling

## Obsah

1	Seznam použitých zkratek:.....	6
2	Úvod.....	7
3	Molekulární mechanismus endogenních oscilací.....	8
4	Suprachiasmatická jádra jako centrální oscilátor savců.....	9
5	Synchronizace vnitřních hodin – fázový posun.....	11
6	Metodické přístupy k měření cirkadiánní rytmicity.....	12
6.1	Měření lokomoční aktivity.....	13
6.2	Měření elektrofyziologické aktivity neuronů SCN.....	14
6.3	Měření rytmů v transkripci a translaci genů na úrovni <i>mRNA</i> .....	14
7	Světelná synchronizace.....	15
7.1	Buněčná signální dráha zapojená ve světelné synchronizaci.....	15
7.1.1	Glutamátové receptory.....	16
7.1.2	Vápník.....	17
7.1.3	Kinázy zapojené ve fosforylaci CREB.....	17
7.1.3.1	Kalmodulin dependentní kinázy.....	17
7.1.3.2	Dráha mitogen-aktivovaných proteinkináz.....	18
7.1.3.3	cAMP a proteinkináza A.....	19
7.1.3.4	mTOR kináza.....	19
7.1.3.5	NO syntáza a proteinkináza G.....	20
7.1.3.6	Proteinkináza C.....	21
7.1.4	Glykogen syntáza kináza.....	21
7.1.5	Kasein kináza.....	22
8	Shrnutí, možné budoucí směry výzkumu.....	22
9	Použitá literatura.....	23

## 1 Seznam použitých zkratk:

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-hydroxy-methyl-isoxazol-propionát  
**AVP** - arginin-vasopressin  
**CaMKII-IV** – kalmodulin dependentní kináza II-IV  
**cAMP** - cyklický adenosinmonofosfát  
**cGMP** - cyklický guanosinmonofosfát  
**CK1 $\epsilon/\delta$**  - kasein kináza 1-epsilon/delta  
**CRE** - Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element  
**CREB** - Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein  
**Cry** – kryptochrom (cryptochrome)  
**DM-SCN** - dorsomediální suprachiasmatické jádro  
**ERK** - extracelulárním signálem regulované kinázy  
**GC** - guanylátcykláza  
**GSK** - glykogen syntáza kináza  
**ICV** - intracerebroventrikulární  
**IP3** - inositol trifosfát  
**JNK** - c-Jun N-terminal kinases  
**L-NAME** - N-nitro-L-arginin methylester  
**MAPK** – mitogen-aktivované proteinkinázy  
**MKP1** - fosfatáza MAP kinázy 1  
**mTOR** - mammalian target of rapamycin  
**MUA** – multi-unit activity  
**NMDA** - N-metyl D-aspartát  
**NO** – oxid dusnatý (nitric oxide)  
**NOS** - syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)  
**PACAP** - pituitary adenylate cyclase-activating peptide  
**Per** - period  
**PKC** - proteinkináza C  
**PKG** - proteinkináza G  
**RHT** - retinohypotalamický trakt  
**RT-PCR** - reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce  
**RyR** - ryanodinový receptor  
**SCN** - suprachiasmatická jádra (suprachiasmatic nuclei)  
**VIP** - vasoaktivní intestinální peptid  
**VL-SCN** - ventrolaterální suprachiasmatické jádro

## 2 Úvod

V přírodě se periodicky opakuje velká řada jevů. Příliv a odliv, změny roční doby a hlavně střídání dne a noci mají za následek, že se během evoluce v interakci s těmito cykly u organismů vyvinuly vlastní vnitřní mechanismy kontrolující rytmus a načasování jejich životních projevů. Tento mechanismus se nazývá biologické hodiny a zajišťuje rytmické změny fyziologických funkcí, jako jsou tělesná teplota, srdeční tep, trávicí a imunitní funkce, a behaviorálních projevů, jako například pohybové aktivity nebo spánku, s periodou přibližně 24 hodinovou, čili cirkadiánní (circa-, 'přibližně'; -diem, 'den'). Cirkadiánní rytmy přetrvávají i v situaci, kdy jsou vnější podmínky neměnné. Jsou tedy vrozené a nejsou jen pasivní reakcí na změny prostředí. Protože jejich perioda není totožná s 24 hodinovým cyklem rotace Země kolem své osy, v neměnných podmínkách by se vůči vnějšímu dni začaly předcházet či zpožďovat, v závislosti na délce své vnitřní periody. Musí být proto „sladěny“ s přesnou 24 hodinovou periodou působením vnějších synchronizátorů. Nejvýraznějším a nejvíce prostudovaným synchronizátorem je střídání světla a tmy během dne a noci. Vedle toho se uplatňuje také nesvětelná synchronizace, například vlivy sociální, pohybová aktivita, pravidelný příjem potravy, změny okolní teploty a podobně.

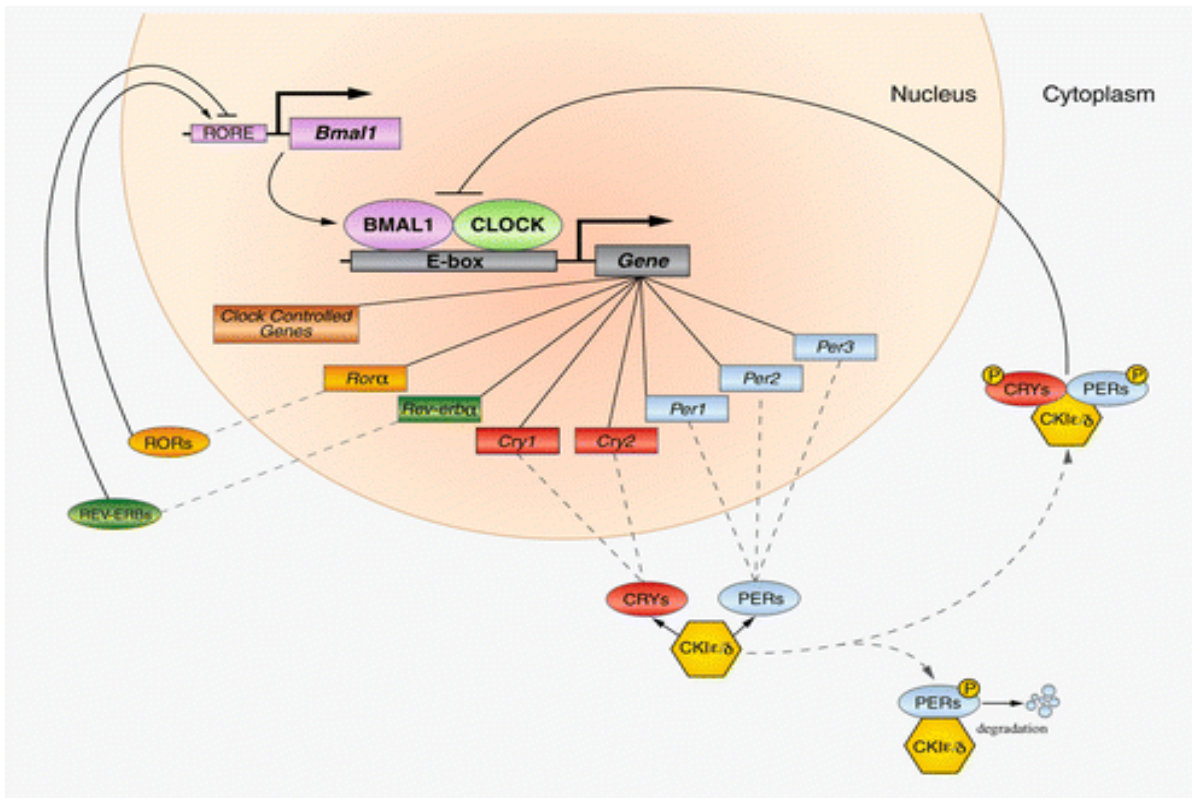
Biologické hodiny, hlavní cirkadiánní oscilátor, jsou u savců uloženy v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN) odkud řídí rytmicitu mnoha dalších oscilátorů uložených v periferních orgánech. Při ztrátě SCN dochází k porušení integrity rytmů organismu a jejich synchronizace světlem. Podle převažujícího názoru tedy SCN fungují jako „dirigent“ rytmů periferních oscilátorů a nastavují jejich fázi podle vnějšího osvětlení. Působení světla zvečera a na začátku noci vede k fázovému zpoždění vnitřního rytmu biologických hodin, působení světla koncem noci a zrána způsobuje fázové předběhnutí. Endogenní oscilace jsou zajištěny zpětnovazebnými smyčkami exprese tzv. hodinových genů uvnitř jednotlivých buněk. Hlavním cílem této práce je popsat mechanismus interakce světla s molekulárním mechanismem fungování biologických hodin. Snahou bude roztřídit dosavadní informace získané různými metodami výzkumu a objasnit, které komponenty signálních drah hrají prokazatelně roli v procesu seřizování vnitřního oscilátoru. Hlubší poznání těchto mechanismů může vést k účinnější terapii dnes stále častějších poruch způsobených rychlým životním tempem. Desynchronizace cirkadiánních funkcí organismu například prací na směny nebo tzv. syndromem jet-lag, který vzniká při přeletech několika časových pásem, prokazatelně vede například k větší náchylnosti k metabolickým a nádorovým onemocněním.

### 3 Molekulární mechanismus endogenních oscilací

Podstatou vzniku a udržení vnitřních cirkadiálních rytmů jsou molekulární oscilace v expresi tzv. hodinových genů, založené na transkripčně-translačních zpětnovazebných regulačních smyčkách. Hodinové geny se nacházejí jak v neuronech SCN, tak v buňkách periferních orgánů. Jejich mutace nebo odstranění způsobí vážné narušení až ztrátu cirkadiální rytmicity. Doposud byly savců jako hodinové označeny geny: *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput), *Bmal1* (brain and muscle Arnt-like protein 1), *Period1* (*Per1*), *Period2* (*Per2*) a *Period3* (*Per3*), *Cryptochrome1* (*Cry1*), *Cryptochrome2* (*Cry2*), *Rev-erba*, *Rora* (retinoic acid-related orphan receptor a) a *kasein-kinasa1ε/δ* (*CK1ε/δ*) (přehled viz (Ko & Takahashi 2006). Heterodimer proteinů BMAL a CLOCK nasedá na E-box v oblasti promotoru skupiny genů *Per* a *Cry* a promotoru genů *Rev-erba* a *Rora* a aktivuje tak jejich transkripci. mRNA těchto genů putují do cytoplazmy, kde se tvoří jejich proteiny. Proteiny PER1, 2, 3 a CRY1 a 2 se spojují v dimery a jsou transportovány do jádra. Vzniklý komplex PER:CRY narušuje vazby na CLOCK:BMAL1 komplexu a tím negativně ovlivňuje vlastní transkripci. Protein REV-ERBα je rovněž transportován do jádra, kde se váže na regulační místo RORE v promotoru genu BMAL1 a potlačuje jeho transkripci. Tato represe snižuje množství proteinu BMAL1, což negativně ovlivňuje transkripci regulovanou komplexem CLOCK:BMAL1. Na regulační místo RORE se váže také protein RORA, který ale naopak působí jako pozitivní regulátor exprese *Bmal1* (Akashi & Takumi 2005; Guillaumond et al 2005).

Na posttranslační úrovni hrají důležitou roli kinázy, hlavně CK1ε/δ. Tato kináza fosforyluje proteiny PER a CRY a umožňuje tak jejich translokaci do jádra. Fosforylované proteiny jsou později ubiquitinylovány a degradovány proteasomy. Délka vnitřní periody savců se zdá být závislá právě na fosforylaci hodinových genů kinázou CK1ε/δ. Mutace způsobená záměnou fosforylovatelného serinu za nefosforylovatelný glycin v proteinu PER2 má za následek zkrácení vrozené cirkadiální periody (Toh et al 2001). Naproti tomu inhibice fosforylace kinázou CK1ε/δ prodlužuje periodu savčích hodin z 24 na 48 hodin (Isojima et al 2009).



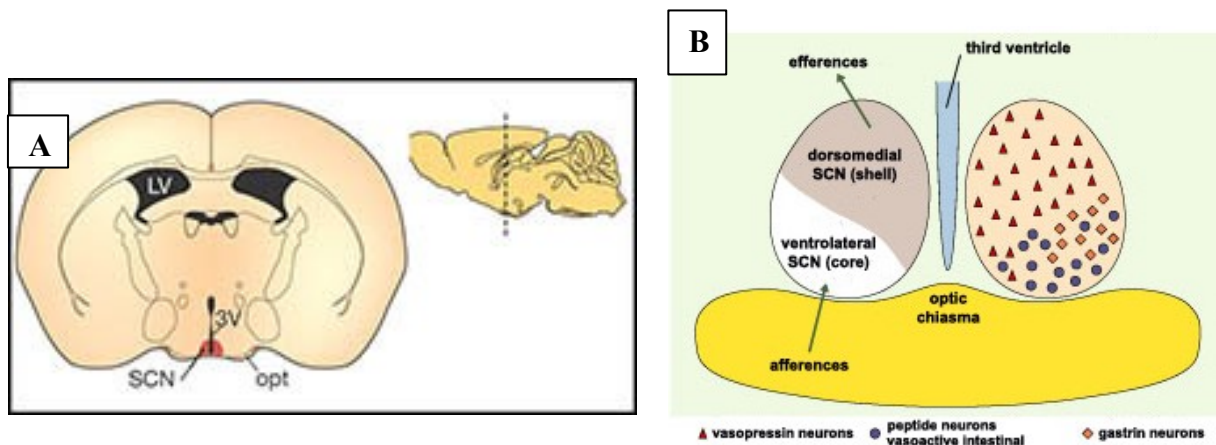


**Obr.1:** Schéma molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin v buňkách SCN. Podle (Ramsey et al 2007). Proteiny BMAL1 a CLOCK tvoří heterodimery a na začátku dne aktivují transkripci hodinových genů *Per*, *Cry*, *Rora*, *Rev-erba* a také CCG (clock controlled genes, genů kontrovaných hodinami). Proteiny PER a CRY jsou transportovány do jádra, kde negativně ovlivňují transkripci aktivovanou komplexem CLOCK:BMAL1. Zároveň jsou fosforylací CKIε/δ (kasein-kinasou 1ε/δ) označeny pro degradaci. Protein REV-ERBα slouží jako negativní a RORA jako pozitivní regulátor transkripce *Bmal1*. Snižování množství proteinu BMAL1 v průběhu subjektivního dne vede postupně ke snižování transkripce *Per*, *Cry*, *Rev-erba* a *Rora*, čímž dojde k přerušení negativní zpětné vazby a transkripce *Bmal1* se během noci opět zvýší.

Pozoruhodná evoluční konzervace tohoto mechanismu v rámci různých druhů organismů, často evolučně velmi vzdálených, od jednobuněčných až po člověka, naznačuje jeho možný monofyletický původ (Dunlap 1999; Dunlap et al 1999).

## 4 Suprachiasmatická jádra jako centrální oscilátor savců

Suprachiasmatická jádra (SCN) jsou dva drobné shluky neuronů oválného tvaru situované v zadní části hypotalamu nad křížením optických nervů po obou stranách třetí mozkové komory.



**Obr.2:** **A)** Umístění SCN v hypothalamu hlodavce<sup>1</sup>. 3V – třetí mozková komora (third ventricle), opt – optický nerv. **B)** Dělení SCN<sup>2</sup>. Funkčně a morfologicky se jádra dělí na dvě hlavní části: ventrolaterální (VL-SCN, „jádro“, core) a dorsomediální (DM-SCN, „slupka“, shell). Z neurochemického hlediska je VL-SCN charakterizováno syntézou převážně vasoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP), neurony DM-SCN syntetizují hlavně arginin-vasopressin (AVP). VL-SCN je tzv. retinorecipientní, získává přímé vstupy z retiny prostřednictvím retinohypotalamického traktu (RHT) a působením světla zde dochází k indukci exprese některých hodinových genů.

Další vstupy do SCN přicházejí kromě RHT též z *raphe nuclei* a z thalamu, oblasti zvané IGL (intergeniculate leaflet). Dorsomediální jádro není retinorecipientní ale většina jeho neuronů vykazuje autonomní oscilace, jejichž synchronizace silně závisí na synapsích z VL-SCN (Antle & Silver 2005; Meijer & Schwartz 2003; Moga & Moore 1997).

Jednotlivé buňky SCN vykazují rytmy, které vznikají činností molekulárního mechanismu (viz kapitola 3). Pokud jsou tyto buňky v disociované kultuře, rytmují s odlišnými periodami (Welsh et al 1995). In vivo nebo v organotypických kulturách, kde jsou zachovány jejich vzájemné synapse, jsou jejich oscilace synchronizovány (Honma et al 1998; Liu et al 1997; Shirakawa et al 2000). Mechanismus, jakým způsobem mezi sebou jednotlivé buňky a oddíly SCN komunikují, je předmětem současného intenzivního zkoumání. Většina výstupů ze SCN míří do subparaventrikulární oblasti hypothalamu a paraventrikulárních jader, odkud jsou signály přenášeny do centrálních jader sympatiku a parasympatiku. Sympatická inervace dřeně nadledvin vede k výlevu glukokortikoidů a hraje důležitou roli v přenosu signálů ze SCN k periferním orgánům. Glukokortikoidy se váží na specifické sekvence přítomné v promotoru genu *Per1*, ovlivňují jeho transkripci a tak i fázi endogenních oscilací v buňkách periferních orgánů (Okamura et al 2010). Subparaventrikulární jádro zprostředkovává

<sup>1</sup> Převzato z <http://sciencematters.berkeley.edu/archives/volume4/issue29/story2.php> dne 7.5.2011

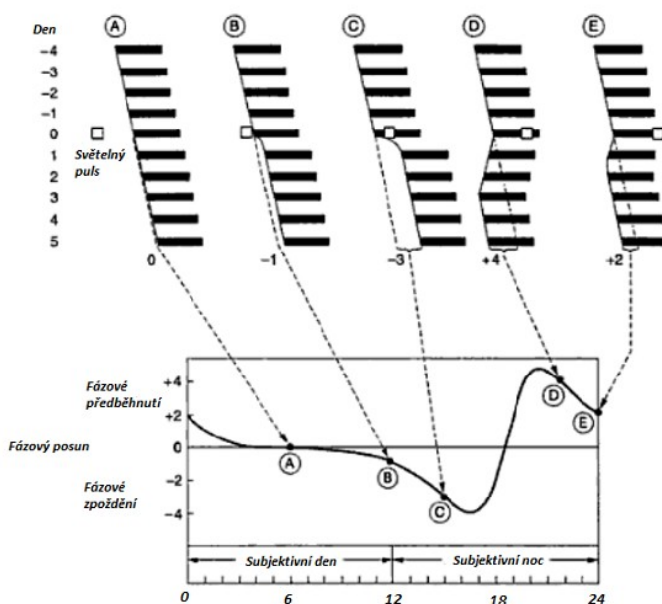
<sup>2</sup> Převzato z <http://people.usd.edu/~cliff/Courses/Behavioral%20Neuroscience/Biorhythm/BRfigs/BRAfferent%20SCN%20figures.html> dne 7.5.2011

komunikaci s dorsomediálním jádrem hypotalamu, zapojeným v regulaci mnoha fyziologických výstupních rytmů. Bylo prokázáno, že poškození dorsomediálního hypotalamického jádra způsobuje ztrátu cirkadiálních rytmů v cyklu spánek-bdění, potravního chování, lokomoční aktivitě a sekreci kortikosteroidů ale neovlivňuje denní rytmus tělesné teploty (Chou et al 2003). Paraventriculární jádro hypotalamu také zajišťuje, přes *ganglion cervicale superior* ve spinální míše, cirkadiální výlev melatoninu z epifyzy (Moore & Klein 1974).

## 5 Synchronizace vnitřních hodin – fázový posun

K synchronizaci endogenního pacemakeru s fází vnějšího prostředí dochází prostřednictvím fázových posunů jeho endogenních oscilací, tj. zpomalením nebo zrychlením mechanismu exprese hodinových genů. Tyto posuny jsou vyvolány rytmicky se opakujícími stimuly vnějšího prostředí, tzv. Zeitgebery neboli synchronizátory.

Hlavním synchronizátorem je světlo. Působení světla zvečera a na začátku noci vede k fázovému zpoždění vnitřního rytmu biologických hodin, působení světla koncem noci a zrána způsobuje fázové předběhnutí. Působení světla během dne nevyvolá žádný posun. Grafickým vyjádřením velikosti fázových posunů v závislosti na čase působení synchronizátoru je tzv. fázově responsní křivka (Golombek & Rosenstein 2010).



**Obr.3:** Fázově responsní křivka (upraveno podle Jill B Becker et al., 2002). Křivka znázorňuje účinek stejného stimulu (zde světelného pulzu) na změnu fáze v různých částech dne. Osa x znázorňuje část dne, osa y sílu fázového posunu v hodinách. Podle konvence se fázové předběhnutí značí v pozitivních hodnotách a fázové zpoždění v hodnotách negativních. V časovém úseku A, uprostřed subjektivního dne, nezpůsobí aplikace světla žádný fázový posun. V úseku B a C, na počátku subjektivní noci, je patrný nárůst fázového zpoždění, zatímco největší fázové předběhnutí bylo naměřeno v úseku D a v úseku E

je již patrný pokles fázové změny. Fázově responsní křivka může být konstruována pro řadu výstupních rytmů (například lokomoční aktivita, tělesná teplota, hladina kortizolu či melatoninu), v závislosti na zvolené metodice.

Nesvětelné synchronizátory, např. vynucená pohybová aktivita, mohou také ovlivňovat endogenní pacemaker buď samostatně nebo interakcí se světelnou synchronizací. Nesvětelné stimuly jsou schopny blokovat světlem indukované fázové posuny a opačně (Biello et al 1997; Maywood et al 2002; Yannielli & Harrington 2001). Například aktivace inhibičních serotoninergních synapsí v SCN může zeslabovat glutátem indukované fázové změny v rytmu elektrické aktivity, které jsou dobře patrné *in vitro* (Mizoro, Yamaguchi et al. 2010). Inhibice nesvětelných signálů může naopak zvyšovat cirkadiánní odpověď na světlo (Biello et al 1997). Každý typ synchronizátoru má v rámci dne časově omezený interval, ve kterém může fázový posun endogenních oscilací vyvolat. Tomuto intervalu se říká „gate“ neboli „vrátka“ a jeho velikost i časové rozložení lze vyčíst z fázově responsní křivky pro daný stimul (Golombek & Rosenstein 2010).

Význam exprese hodinových genů a jejich translace pro fázové posuny byla dokázána v pokusech s inhibitory proteosyntézy, jako je anisomycin či cykloheximid (Khalsa et al 1992; Takahashi & Turek 1987). Např. aplikací cykloheximidu před a po vystavení světelnému pulsu bylo dokázáno, že syntéza proteinů je důležitá pro fázové předběhnutí v následujícím cyklu ještě 4 hodiny po vystavení světlu (Zhang et al 1996). Blokování translace *Per* genů intracerebroventrikulární (ICV) injekcí řetězců oligonukleotidů komplementárních k jejich mRNA mělo za následek oslabení světlem indukovaného fázového zpoždění u myši, což dále dokládá důležitost aktivace hodinových genů *Per1* a *Per2* pro světlem indukovaný fázový posun (Akiyama et al 1999; Shearman et al 1997; Wakamatsu et al 2001).

## **6 Metodické přístupy k měření cirkadiánní rytmicity**

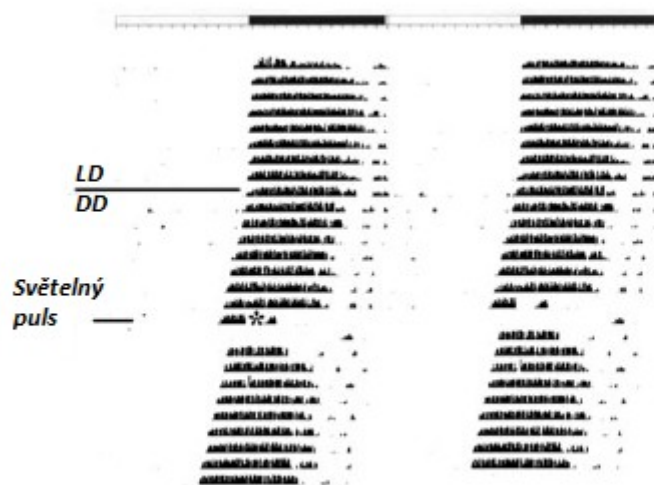
Změna fáze cirkadiánních rytmů může být posuzována na základě změn různých proměnných, detekovaných různými metodami. Například měření lokomoční aktivity, jako výstupního rytmu a přímé měření rytmů v transkripci genů zapojených v oscilačním mechanismu. Tyto rozdílné ukazatele změny cirkadiánních rytmů nemusí být všechny stejně „přesné“, resp. nemusí mít stejnou vypovídací hodnotu, jak se budu snažit dokázat v následujících kapitolách.

## 6.1 Měření lokomoční aktivity

Měření lokomoční aktivity je neinvazivní metoda často užívaná k měření cirkadiální rytmicity. Měří se například infračerveným detektorem pohybu či pomocí záznamu „běhacího kola“ (Vasicek et al 2005). Získaná data se nedají porovnávat v rámci absolutních hodnot, porovnávají se relativní rozdíly ve frekvenci aktivity.

K měření aktivity živočichů v čase se užívá aktograf, výstupem je graf, tzv. aktogram.

(Obrázek 4.)



**Obr.4:** Ilustrativní aktogram znázorňující lokomoční aktivitu myši v čase (upraveno podle Butcher et al., 2002). Světlé části horní lišty představují počáteční světlou periodu dne, tmavé části tmavou periodu dne. V počáteční fázi záznamu bylo zvíře nejprve synchronizováno standardním cyklem 12 hodin světla a 12 hodin tmy, což se projevuje nástupem aktivity ve stejný čas každý den. Po přesunutí myši do prostředí konstantní tmy (DD) začalo docházet k fázovému předbíhání cyklu v závislosti na délce vrozené cirkadiální periody. Po aplikaci světelného pulsu na počátku subjektivní noci (označeno hvězdičkou) došlo k fázovému zpoždění cyklu. (Graf je vyneseno dvojité pro lepší odhad délky periody lokomoční aktivity).

Rytmus lokomoce je ze SCN řízen přes dorsomediální hypotalamické jádro. Existuje však více center ovlivňujících lokomoci, zapojených i v jiných fyziologických procesech, na SCN nezávislých. Například lokomoční aktivita spojená s vyhledáváním potravy (Vasicek et al 2005). Vstupní stimuly mohou také ovlivňovat výstupní rytmy přímo, bez změny fáze v molekulárním mechanismu. Tento jev je znám jako tzv. masking (Biello et al 1994; Marques & Waterhouse 1994; Mrosovsky et al 1999).

## 6.2 Měření elektrofyziologické aktivity neuronů SCN

Na rozdíl od měření výstupních rytmů, měření elektrofyziologické aktivity neuronů SCN sleduje procesy přímo v pacemakeru samotném. Elektrofyziologická aktivita jednotlivých neuronů může být monitorována metodou „single-unit activity“ (Prosser & Gillette 1989). Aktivita skupiny neuronů u živých zvířat za plného vědomí se zaznamenává pomocí techniky „Multi-Unit Activity“ (MUA) (Meijer et al 1998). Spontánní neuronální aktivita neuronů SCN vykazuje sinusoidální průběh s nízkou aktivitou v noci a vrcholem aktivity uprostřed subjektivního dne (Tischkau et al 2003b). To je dáno rozdílem v klidovém membránovém potenciálu, který souvisí s iontovými kanály a exprese některých iontových kanálů podléhá cirkadiánní regulaci (Ko et al 2009). Například exprese vápníkem-aktivovaného  $K^+$  kanálu (Meredith et al 2006). Cirkadiánní regulaci podléhá též intracelulární výlev vápníku (Pfeffer et al 2009), který zvyšuje elektrofyziologickou aktivitu neuronů SCN (Aguilar-Roblero et al 2007). Během dne dochází k řízenému zavírání draslíkových kanálů, což vede ke zvýraznění sodíkového proudu a k depolarizačnímu efektu spontánní aktivity během dne. Tento efekt může být přímo řízen cirkadiánními hodinami, ale ovlivňován také iontovým složením prostředí, takže nemusí vždy přesně odrážet posun v mechanismu endogenní oscilace hodinových genů (Brown & Piggins 2007).

## 6.3 Měření rytmů v transkripci a translaci genů na úrovni mRNA

K přímé detekci rytmické exprese mRNA a proteinů zapojených v molekulárním mechanismu řízení cirkadiánních hodin a jejich změn působením synchronizátorů se používají metody, jako je například in-situ hybridizace, reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time RT-PCR, real time reverse transcription-polymerase chain reaction), imunocytochemie, sledování transgenních organismů s bioluminiscenčním enzymem luciferázou zapojeným za promotor zvoleného hodinového genu, a další.

Pomocí radioaktivně značené komplementární polynukleotidové sondy je při in-situ hybridizaci možno detekovat sekvence nukleotidů mRNA konkrétního genu, například *mPer1*, a vizualizovat tak buňky, které tento gen exprimují (Tischkau et al 2000). Metoda RT-PCR umožňuje přesně kvantifikovat hledanou komplementární DNA (cDNA) ve vzorku, například při detekci cirkadiánního rytmu v expresi ryanodinových receptorů (Pfeffer et al 2009). Imunocytochemické metody se používají k rozpoznání specifické peptidové sekvence,

kteřá slouží jako antigen pro výrobu protilátky. Značená protilátka je pak schopná nalézt tento antigen ve tkáni a označit tak buňky, které ho exprimují (Ding et al 1997).

## 7 Světelná synchronizace

Jak již bylo naznačeno v úvodu, hlavním a nejvíce prostudovaným synchronizátorem endogenních cirkadiálních hodin je střídání světla a tmy během dne a noci.

Informace o světle putuje retinohypotalamickým traktem (RHT) do ventrolaterální části SCN. RHT je tvořen axony gangliových buněk sítnice, z nichž některé obsahují pigment melanopsin, který dokáže absorbovat fotony, podobně jako opsiny klasických fotoreceptorů. V noci je po světelném pulsu uvolňován z nervových zakončení RHT glutamát, který se váže na glutamátové receptory a spouští tak kaskádu signálních drah vedoucí k aktivaci transkripce *Per* genů. Světelný puls v časně a pozdní noci indukuje *Per1*, *Per2* je indukován po pulsu pouze v první polovině noci (Nagano et al 2009).

Promotor hodinových genů *Per1* a *Per2* obsahuje regulační sekvenci CRE ( $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP Response Element), na kterou se váže transkripční faktor, protein CREB ( $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP Response Element Binding protein) (Tischkau et al 2003a). CREB je fosforylován řadou kináz, které jsou součástí signalizačních kaskád vnitrobuněčných druhých posílů spouštěných aktivovanými receptory (Golombek & Rosenstein 2010).

Indukce *Per* genů po světelném pulsu je tedy řízena jiným mechanismem než jejich indukce endogenním cirkadiálním mechanismem prostřednictvím CLOCK/BMAL1 heterodimeru. Zvýšená hladina PER proteinů po světelném pulsu tak zřejmě ovlivňuje dynamiku zpětnovazebné smyčky a způsobuje tak fázové posuny cirkadiálního systému.

### 7.1 Buněčná signální dráha zapojená ve světelné synchronizaci

Po světelném pulsu v noci je ze zakončení RHT vyléván primárně glutamát, který se může vázat na několik typů glutamátových receptorů (Golombek & Rosenstein 2010). Role glutamátu jako hlavního mediátoru zprostředkovávajícího světelnou signalizaci do SCN byla prokázána zjištěním, že aplikace glutamátu a agonistů glutamátových receptorů (např. N-methyl-D-aspartát) simuluje světlem indukované fázové změny oscilací v subjektivní noci. Aplikace glutamátových antagonistů vede naopak k blokaci těchto fázových posunů (Hannibal 2002).

Část gangliových buněk tvořících RHT produkuje také PACAP („pituitary adenylate cyclase-activating peptide“). PACAP je neuropeptid, který se váže na receptor spřažený s G-proteinem. PACAP v nanomolárních koncentracích vyvolá stejnou fázově-responsní reakci jako světlo a glutamát, zatímco v mikromolárních koncentracích moduluje glutamátem indukované fázové posuny (Hannibal 2002) a může se tak podílet na světelné indukci *Per* genů.

### **7.1.1 Glutamátové receptory**

V současnosti je známo několik typů glutamátových receptorů. AMPA ( $\alpha$ -amino-hydroxymethyl-isoxazol-propionátové) receptory, kainátové, NMDA (N-metyl D-aspartátové) a metabotropní receptory. Metodou in-situ hybridizace byla v SCN jednoznačně prokázána přítomnost několika typů NMDA receptorů (NMDAR1, NMDAR2C), non-NMDA receptorů (GluR1, GluR2, GluR4) a metabotropního receptoru mGluR1 (Ebling 1996). Elektrofyzilogicky byla prokázána také přítomnost NMDAR2B (Wang et al 2008). Zásadní role ve světelné synchronizaci byla prokázána zejména NMDA receptorům. Mikroinjekce NMDA do 3. mozkové komory vedla k fázovým změnám podobným těm indukovaným světelnými pulsy (Mintz et al 1999). Později byla objevena důležitá úloha receptorů AMPA. Aktivace AMPA receptorů v neuronech hippocampu je podmínkou pro následnou aktivaci NMDA receptorů, která vede k excitaci neuronů a následným změnám na synapsi, jako je například long-term potenciace (Cooke & Bliss 2006). Mikroinjekce AMPA do organotypických tkáňových kultur SCN v časně noci způsobila fázové zpoždění rytmů lokomoční aktivity a fázové změny v oscilacích hodinových genů. Aktivace AMPA receptorů in vitro sama o sobě ovšem nebyla dostačující k vyvolání fázového předběhnutí v pozdní subjektivní noci (Mizoro et al 2010). Zdá se tedy, že v buňkách SCN může být úloha AMPA receptorů závislá na cirkadiánní době jejich aktivace. Metabotropní glutamátové receptory (mGluR) ovlivňují excitabilitu membrány SCN působením přes G-protein a dráhu fosfolipázy C (Haak 1999). Podáváním specifických agonistů a antagonistů byla zjištěna modulační úloha metabotropních receptorů mGluR5 a mGluR2/3 na změny rytmů cirkadiánní aktivity (Gannon & Millan 2011).

Aktivace jak glutamátových, tak i receptorů vázajících PACAP vede ke zvýšenému vstupu  $Ca^{2+}$  iontů do buněk SCN (Dziema & Obrietan 2002).



### **7.1.2 Vápník**

Vápník, jako univerzální signální molekula, má v buňce mnoho různých funkcí. Ionty vápníku jsou pouze přemísťovány, nejsou vyráběny ani ničeny. Molekuly, s nimiž ionty vápníku interagují, registrují relativní rozdíly v koncentraci těchto iontů. (Hancock 2005). Glutamátem indukovaný influx vápenatých iontů do buňky vede ke zvýšení jeho koncentrace uvnitř buňky a prostřednictvím interakce s IP3 a ryanodinovými receptory (RyR) přes signální dráhu fosfolipázy C otevírá vnitrobuněčné zásobárny vápníku, což vede k ještě většímu zvýšení jeho intracelulární koncentrace. Vnitrobuněčné rytmy vápníku závislé na vnitřních zásobárnách přetrvávají i po zablokování akčních potenciálů (Ikeda 2004). Zvýšená hladina vápníku v buňce vede k jeho navázání na přenašečové proteiny. Nejčastějším vazným proteinem  $Ca^{2+}$  v SCN je kalmodulin. Imunohistochemicky byly v organotypických tkáňových řezech SCN prokázány také proteiny kalbindin a kalretinin (Ikeda et al 2003).

Transkripční pokusy ve standardní linii myších fibroblastů (NIH3T3) prokázaly, že RyR jsou pozitivně transkripčně regulovány heterodimerem CLOCK/BMAL1 s hladinou mRNA dosahující vrcholu na počátku subjektivního dne a hladinou proteinů vrcholící o asi 10 hodin později, kolem soumraku (Pfeffer et al 2009).

Kalmodulin s navázaným  $Ca^{2+}$  aktivuje kalmodulin dependentní kinázy (CaMK) (Shibata & Moore 1994). CaMK fosforylují v buňce řadu dalších kináz, ale také fosforylují v jádře transkripční faktor CREB (Sun et al 1994).

### **7.1.3 Kinázy zapojené ve fosforylaci CREB**

Jak už bylo nastíněno v úvodu kapitoly, CREB je transkripční faktor, který se váže na specifické sekvence v promotoru genů *Per1* a *Per2* a iniciuje tak jejich transkripci. Protože fosforylace proteinů obecně může ovlivnit jejich stabilitu nebo lokalizaci v buňce (Barnard & Nolan 2008), i CREB potřebuje být ke své aktivaci fosforylován. CREB je společným cílem mnoha různých kináz (Johannessen & Moens 2007) a místem konvergence různých signálních drah (von Gall et al 1998).

#### **7.1.3.1 Kalmodulin dependentní kinázy**

V SCN byly prokázány dva typy kalmodulin dependentních kináz. CaMKII (Nomura et al 2003), imunohistochemicky byla v SCN prokázána CaMKIV (Nakamura et al 1995). CaMKIV je lokalizována v jádře, kde fosforyluje transkripční faktor CREB na fosforylačním

místě Ser<sup>133</sup> (Bito et al 1996). In vitro testy odhalily, že CaMKIV fosforyluje CREB pouze na Ser<sup>133</sup>, zatímco CaMKII na dvou místech, Ser<sup>133</sup> a Ser<sup>142</sup>. Fosforylace na Ser<sup>142</sup> blokuje aktivaci CREB, ke které dochází při fosforylaci na Ser<sup>133</sup>. Mutace Ser<sup>142</sup> za alanin zvyšuje schopnost Ca<sup>2+</sup> influxu aktivovat CREB (Sun et al 1994). To bylo později prokázáno imunohistochemickými metodami i v organotypických řezech SCN, kdy byla pomocí značených protilátek anti-p142 a anti-p133 po aplikaci glutamátu v cirkadiálním čase 14 (CT 14) detekována fosforylace CREB na Ser<sup>133</sup> i Ser<sup>142</sup>. U myši s bodovou mutací Ser<sup>142</sup> za alanin došlo po světelném pulzu k výraznému oslabení fázových změn nejen v lokomoční aktivitě ale i v expresi genů *Per1* a *Per2*, což bylo detekováno pomocí in-situ hybridizace (Gau et al 2002).

CAMKII je v SCN rytmicky fosforylována s vrcholem během dne, jak v podmínkách světelné synchronizace, tak v podmínkách konstantní tmy (Agostino et al 2004).

Kromě fosforylace transkripčního faktoru CREB působí CaMK jako vyšší regulační bod aktivující dráhu tzv. mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPK), které následně také fosforylují CREB (Butcher et al 2002).

### **7.1.3.2 Dráha mitogen-aktivovaných proteinkináz**

Mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK), nazývané extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK), tvoří rodinu serin/threoninových kinázových kaskád, jejichž jednotlivé kinázy v postupných krocích podléhají vzájemné „štafetové“ fosforylaci a defosforylaci fosfatázami a jejich koncové články fosforylují v jádře transkripční faktory (Butcher et al 2003). Jednotlivé podskupiny MAPK jsou obecně v organismech zapojeny v mnoha různých procesech, jako je buněčné dělení a růst, apoptóza a další (de Paula et al 2008).

V SCN byly identifikovány tři podskupiny MAPK. Imunohistochemicky bylo prokázáno, že krátká expozice světlu během noci, avšak nikoli během dne, vyvolá v SCN rychlou a výraznou aktivaci p42/44 (též známé jako ERK1/2) MAPK kaskády. Farmakologické narušení světlem indukované aktivace p42/44 MAPK dráhy odpojilo světelný signál od synchronizace cirkadiálních rytmů, což bylo posuzováno na fázi lokomoční aktivity (Butcher et al 2002). Dále byly v SCN prokázány ještě další dvě podskupiny, JNK a p38. Měřením jejich fosforylované formy během cirkadiálního cyklu byl zjištěn cirkadiální rytmus jejich aktivace se spontánní fosforylací v noci (Nakaya et al 2003; Pizzio et al 2003). ERK1/2 a JNK reagují na noční světelné pulzy, p38 na noční světelné pulzy nereaguje (Golombek &

Rosenstein 2010). Zajímavé je, že fosfatáza MAP kinázy 1 (MKP1) obsahuje v promotoru své mRNA E-box pro navázání heterodimeru CLOCK/BMAL1 a vazné místo pro transkripční faktor CREB. Její exprese je tedy řízena jak endogenním oscilačním mechanismem, tak světlem (Doi et al 2007) a je tak zřejmě zodpovědná za světlem indukovanou defosforylaci MAPK během subjektivní noci (Nakaya et al 2003).

Kromě transkripčního faktoru CREB jsou substrátem MAPK v SCN i proteinové produkty hodinových genů CLOCK, BMAL, CRY, RORA, kináza RSK (ribosomal S6 kinase) a transkripční faktory spouštějící expresi časných genů *c-fos* a *jun* (Golombek & Rosenstein 2010).

Dráhy MAPK jsou na mnoha stupních modulovatelné dalšími signály, včetně extracelulárních, jako jsou trofické faktory, a drah nesvětelné signalizace (de Paula, Lamb et al. 2008; (Golombek & Rosenstein 2010). Důležitá je také vzájemná interakce s dalšími signálními drahami, např. drahou cyklického adenosinmonofosfátu (Travnickova-Bendova et al 2002) a kinázou mTOR (Cao et al 2011; Cao & Obrietan 2010), jak uvedu dále.

### **7.1.3.3 cAMP a proteinkináza A**

Proteinkináza A je aktivována signalizací cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). cAMP je buněčný druhý posel syntetizovaný z ATP enzymem adenylátcyklázou.

Po aplikaci glutamátu v časně (CT 14) a pozdní (CT 20) subjektivní noci došlo v obou případech k rychlému zvýšení hladiny cAMP (Tischkau et al 2000). Podání cAMP in vitro indukuje fázové změny pouze během dne (Prosser & Gillette 1989), což naznačuje, že signalizace cAMP je zapojena v nesvětelné synchronizaci. In vitro studie ve standardní linii buněk lidského choriokarcinomu ale odhalily, že signalizace dráhy cAMP je nutná pro transkripci *mPer1* aktivovanou transkripčním faktorem CREB fosforylovaným MAPK. Bez současné signalizace cAMP tedy samotná aktivace MAPK dráhy pro CRE-dependentní transkripci nestačí (Travnickova-Bendova et al 2002).

### **7.1.3.4 mTOR kináza**

V SCN byla prokázána další kináza, mTOR (mammalian target of rapamycin) (Cao et al 2011; Cao et al 2008; Cao et al 2010; Cao & Obrietan 2010). mTOR je serin/threoninová proteinkináza, která je v buňkách zapojena v mnoha procesech (Beevers et al 2006; Hay & Sonenberg 2004).

mTOR je v SCN aktivována drahou MAPK a řízena endogenním mechanismem. Aktivita této kinázy vykazuje cirkadiální rytmus, s maximem v subjektivním dni a minimální aktivitou v pozdní noci, což bylo zjištěno pomocí detekce fosforylovaného ribozomálního S6 proteinu (pS6), který byl užit jako marker aktivity mTOR. Užitím transgenických zvířat s označeným genem *Per1* byla detekována významná korelace mezi rytmickou expresí pS6 a *Per1* a současná upregulace mTOR a *Per1* po světelném pulzu. Korelace byla pozorována pouze u *Per1*, nikoli *Per2* ani *c-Fos* (Cao et al 2011).

### 7.1.3.5 NO syntáza a proteinkináza G

NO syntáza (NOS) je enzym, který katalyzuje syntézu oxidu dusného (NO) z L-argininu. NO je důležitá buněčná signální molekula účastnící se mnoha biologických procesů, a také v mezibuněčné signalizaci neuronů (Luo & Zhu 2011).

Enzym NOS je v SCN také fosforylován CaMKII (Agostino et al 2004). Po ICV injekci inhibitoru NOS in vivo došlo k zablokování behaviorálních fázových posunů (Ding et al 1994). N-nitro-L-arginin methylester (L-NAME), inhibitor NO syntázy, selektivně zablokoval pouze fázová předběhnutí lokomoční aktivity, ale neměl vliv na fázová zpoždění (Melo et al 1997), ačkoliv zeslabení světlem indukovaných fázových zpoždění v lokomoční aktivitě po podání L-NAME bylo již předtím prokázáno (Watanabe et al 1995). Dále bylo ale zjištěno, že inhibice NOS blokuje pouze výstupní behaviorální rytmy, nikoli světlem indukovanou expresi časného genu *c-Fos* (Weber et al 1995), což by mohlo naznačovat, že signalizace neovlivňuje genovou expresi.

NO spouští guanylátcyklázu (GC), která aktivuje cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Inhibice GC a cGMP-dependentní kinázy (cGK) sice nezměnila expresi *c-Fos* ale měla vliv na hodinový gen *Per* (Golombek et al 2004). Podle farmakologických studií je dráha cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a proteinkinázy G (PKG) zapojená ve světlem indukovaném fázovém předběhnutí v pozdní subjektivní noci. U SCN v konstantních podmínkách in vitro byla sledována spontánní aktivace této dráhy na konci subjektivní noci. Inhibice endogenního vzrůstu aktivity PKG na konci subjektivní noci pomocí specifických komplementárních deoxynukleotidů způsobila fázové zpoždění cirkadiálních rytmů v lokomoci, excitaci neuronů SCN, množství cGMP a *Per1* mRNA – detekováno pomocí in-situ hybridizace (Tischkau et al 2003b). Co se týká fázových předběhnutí, zatím bylo prokázáno pouze zablokování fázových předběhnutí v rytmu elektrofyziologické aktivity po inhibici PKG (Ding et al 1998).

V SCN byly pomocí specifických antigenů identifikovány 2 isoformy PKG, PKG- $\beta$  a PKG-II. U proteinkinázy G typu II (PKGII) byla zjištěna účast ve fázovém zpoždění. Její inhibice vedla ke zpoždění rytmů elektrické aktivity a nárůstu *Bmal1* mRNA. Jednalo se však o in vitro studii v buňkách NIH-3T3 (Tischkau et al 2004).

### **7.1.3.6 Proteinkináza C**

Proteinkináza C (PKC) je označení pro celou skupinu serin/threoninových kináz, která v současnosti čítá 10 isoenzymů spadajících do 3 skupin v závislosti na struktuře, funkci a potřebě kofaktorů. Klasické isoformy (a, b a c) potřebují jako kofaktory vápník a diacylglycerol, nové isoformy (d, e, g, h) potřebují diacylglycerol a atypické isoformy (f, i, k) k aktivaci nepotřebují diacylglycerol nebo vápník (Dempsey et al 2000; Newton 1997). Kromě regulace kofaktory je pro katalytickou aktivitu a vnitrobuněčnou lokalizaci PKC nezbytný také sled fosforylací (Newton 2001; 2003). V centrálním nervovém systému je PKC dávána do souvislosti s procesy jako je long-term potenciace a long-term deprese (Hussain & Carpenter 2005; Zhuo & Hawkins 1995).

Patnáctiminutový světelný pulz vyvolal fosforylaci PKC $\delta$  na Thr<sup>410</sup> a PKC $\epsilon$  na Thr<sup>403</sup> a snížil autofosforylaci proteinkinázy D na Ser<sup>916</sup> (Lee et al 2007). In vivo podání inhibitoru PKC, bisindolylmaleimidu I, významně zvýšilo účinek světla na fázový posun. Toto zjištění naznačuje, že PKC funguje jako negativní regulátor světelné synchronizace. Podáním PKC bez působení světla nedošlo k fázovému posunu molekulárních oscilací, PKC tedy nemá vliv na endogenní oscilační mechanismus. Kombinace testů in vivo a na buněčných kulturách svědčí pro funkci PKC jako inhibitoru degradace proteinu PER1. PKC tedy může ovlivňovat světelnou synchronizaci prostřednictvím posttranslačního mechanismu ovlivňujícího stabilitu proteinu hodinového genu (Lee et al 2007).

### **7.1.4 Glykogen syntáza kináza**

Glykogen syntáza kináza (GSK) je jedním z cílů fosforylace dráhy MAPK. GSK3 $\beta$  fosforyluje mCRY2 na Ser<sup>553</sup>, který je následně degradován proteasomy. Tato aktivita byla prokázána jak v jaterních buňkách, tak v buňkách SCN u myši. GSK3 $\beta$  je tedy důležitá v rytmické degradaci proteinů mCRY2 v centrálním i periferním oscilátoru u myši (Kurabayashi et al 2006)

Ztráta normální aktivity GSK3 $\beta$  u transgenních myši vede ke zvýšení počtu non-REM spánkových epizod a snížení střední doby trvání spánkové epizody. Tyto transgenní myši také

vykazují značně zvýšené hodnoty bazální lokomoční aktivity a tělesné teploty v první části noci, a to jak v prostředí se světlo a tmavou periodou dne, tak i v prostředí konstantní tmy (Ahnaou & Drinkenburg 2011).

### **7.1.5 Kasein kináza**

V současnosti byl prokázán výrazný cirkadiánní rytmus v aktivitě kasein kinázy 1-epsilon (CKI $\epsilon$ ) s vrcholem na počátku noci (CT 12), který pozitivně koreluje s vrcholem aktivity GSK3 $\beta$  a s vrcholem exprese *mPer2* a *mCry2* (Agostino, Plano et al. 2008).

„Tau“ mutace CKI $\epsilon$  způsobuje zvýšenou cirkadiánní citlivost na světlo. CKI $\epsilon$  má tedy úlohu nejen v mechanismu endogenních oscilací ale také ve světelné synchronizaci. Selektivní inhibitor CKI $\epsilon$  a CKI $\delta$  podaný 30 minut před světelným pulsem v čase CT 18 vedl k významnému zvýšení světlem indukovaného fázového posunu (Agostino et al 2009; Agostino et al 2008).

## **8 Shrnutí, možné budoucí směry výzkumu**

Z dostupných informací vyplývá, že vnější vlivy, jako například světlo, jednoznačně ovlivňují endogenní molekulární mechanismus prostřednictvím aktivace glutamátových receptorů a indukce *Per* genů. Světlem/glutamátem indukovaná exprese *Per* genů je prokazatelně iniciována fosforylovaným transkripčním faktorem CREB, který se váže na specifické CRE místo v jejich promotoru. Jedná se tedy o jinou cestu, než při indukci *Per* genů prostřednictvím CLOCK/BMAL1 heterodimeru v endogenním mechanismu. Tímto způsobem zvýšená hladina PER proteinů působí fázové změny zpětnovazebného mechanismu nejspíš prostřednictvím zásahu do jeho dynamiky. CREB je prokazatelně fosforylován CaMK a MAPK, ovšem dráha MAPK ke CRE-dependentní indukci *Per* potřebuje současnou aktivaci dráhy cAMP. Další komponentou ovlivňující endogenní mechanismus by mohla být PKG, jejíž zablokování vedlo k fázovému zpoždění exprese *Per* v pozdní noci. Zajímavá je i zjištěná funkce PKC jako inhibitoru degradace PER1. Další komponenty signálních drah, které by mohly hrát roli v procesu seřizování vnitřního oscilátoru, ji však zatím prokázaly pouze u výstupních rytmů, které mohou být modulovány i jinými vlivy. Výzkum signálních drah zapojených v synchronizaci vnitřního oscilátoru je důležitý k vyvíjení účinné terapie poruch způsobených narušením tohoto mechanismu a v budoucnu by se mohl zaměřit na přesnější metody detekce vlivu signálních drah přímo na endogenní mechanismus.

## 9 Použitá literatura

- Agostino PV, Ferreyra GA, Murad AD, Watanabe Y, Golombek DA. 2004. Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurochem Int* 44:617-25
- Agostino PV, Harrington ME, Ralph MR, Golombek DA. 2009. Casein kinase-1-epsilon (CK1epsilon) and circadian photic responses in hamsters. *Chronobiol Int* 26:126-33
- Agostino PV, Plano SA, Golombek DA. 2008. Circadian and pharmacological regulation of casein kinase I in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Genet* 87:467-71
- Aguilar-Roblero R, Mercado C, Alamilla J, Laville A, Diaz-Munoz M. 2007. Ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup>-release channels are an output pathway for the circadian clock in the rat suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 26:575-82
- Ahnaou A, Drinkenburg WH. 2011. Disruption of glycogen synthase kinase-3-beta activity leads to abnormalities in physiological measures in mice. *Behav Brain Res* 221:246-52
- Akashi M, Takumi T. 2005. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12:441-8
- Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, et al. 1999. Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* 19:1115-21
- Antle MC, Silver R. 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 28:145-51
- Barnard AR, Nolan PM. 2008. When clocks go bad: neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing. *PLoS Genet* 4:e1000040
- Beevers CS, Li F, Liu L, Huang S. 2006. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer* 119:757-64
- Biello SM, Golombek DA, Harrington ME. 1997. Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience* 77:1049-57
- Biello SM, Janik D, Mrosovsky N. 1994. Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience* 62:273-9
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-14
- Brown TM, Piggins HD. 2007. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog Neurobiol* 82:229-55
- Butcher GQ, Doner J, Dziema H, Collamore M, Burgoon PW, Obrietan K. 2002. The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem* 277:29519-25
- Butcher GQ, Lee B, Obrietan K. 2003. Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 90:3854-63
- Cao R, Anderson FE, Jung YJ, Dziema H, Obrietan K. 2011. Circadian regulation of mammalian target of rapamycin signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 181:79-88
- Cao R, Lee B, Cho HY, Saklayen S, Obrietan K. 2008. Photic regulation of the mTOR signaling pathway in the suprachiasmatic circadian clock. *Mol Cell Neurosci* 38:312-24

- Cao R, Li A, Cho HY, Lee B, Obrietan K. 2010. Mammalian target of rapamycin signaling modulates photic entrainment of the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci* 30:6302-14
- Cao R, Obrietan K. 2010. mTOR Signaling and Entrainment of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell Pharmacol* 2:125-30
- Cooke SF, Bliss TV. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129:1659-73
- de Paula RM, Lamb TM, Bennett L, Bell-Pedersen D. 2008. A connection between MAPK pathways and circadian clocks. *Cell Cycle* 7:2630-4
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, et al. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L429-38
- Ding JM, Buchanan GF, Tischkau SA, Chen D, Kuriashkina L, et al. 1998. A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394:381-4
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. 1997. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 17:667-75
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. 1994. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266:1713-7
- Doi M, Cho S, Yujnovsky I, Hirayama J, Cermakian N, et al. 2007. Light-inducible and clock-controlled expression of MAP kinase phosphatase 1 in mouse central pacemaker neurons. *J Biol Rhythms* 22:127-39
- Dunlap JC. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271-90
- Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK. 1999. Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells* 4:1-10
- Dziema H, Obrietan K. 2002. PACAP potentiates L-type calcium channel conductance in suprachiasmatic nucleus neurons by activating the MAPK pathway. *J Neurophysiol* 88:1374-86
- Ebling FJ. 1996. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* 50:109-32
- Gannon RL, Millan MJ. 2011. Positive and negative modulation of circadian activity rhythms by mGluR5 and mGluR2/3 metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 60:209-15
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, et al. 2002. Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34:245-53
- Golombek DA, Agostino PV, Plano SA, Ferreyra GA. 2004. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem Int* 45:929-36
- Golombek DA, Rosenstein RE. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063-102
- Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20:391-403
- Haak LL. 1999. Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 81:1308-17
- Hannibal J. 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309:73-88
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-45



- Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K. 1998. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci Lett* 250:157-60
- Hussain RJ, Carpenter DO. 2005. A comparison of the roles of protein kinase C in long-term potentiation in rat hippocampal areas CA1 and CA3. *Cell Mol Neurobiol* 25:649-61
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23:10691-702
- Ikeda M. 2004. Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscientist* 10:315-24
- Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, et al. 2003. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca<sup>2+</sup> in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38:253-63
- Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, Fujishima H, Yamada RG, et al. 2009. CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15744-9
- Johannessen M, Moens U. 2007. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front Biosci* 12:1814-32
- Khalsa SB, Whitmore D, Block GD. 1992. Stopping the circadian pacemaker with inhibitors of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10862-6
- Ko GY, Shi L, Ko ML. 2009. Circadian regulation of ion channels and their functions. *J Neurochem* 110:1150-69
- Ko CH, Takahashi JS. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R271-7
- Kurabayashi N, Hirota T, Harada Y, Sakai M, Fukada Y. 2006. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiol Int* 23:129-34
- Lee B, Almad A, Butcher GQ, Obrietan K. 2007. Protein kinase C modulates the phase-delaying effects of light in the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 26:451-62
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM. 1997. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91:855-60
- Luo CX, Zhu DY. 2011. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. *Neurosci Bull* 27:23-35
- Marques MD, Waterhouse JM. 1994. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiol Int* 11:146-55
- Maywood ES, Okamura H, Hastings MH. 2002. Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 15:216-20
- Meijer JH, Schwartz WJ. 2003. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 18:235-49
- Meijer JH, Watanabe K, Schaap J, Albus H, Detari L. 1998. Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats. *J Neurosci* 18:9078-87
- Melo L, Golombek DA, Ralph MR. 1997. Regulation of circadian photic responses by nitric oxide. *J Biol Rhythms* 12:319-26
- Meredith AL, Wiler SW, Miller BH, Takahashi JS, Fodor AA, et al. 2006. BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat Neurosci* 9:1041-9
- Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM, Albers HE. 1999. Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* 19:5124-30

- Mizoro Y, Yamaguchi Y, Kitazawa R, Yamada H, Matsuo M, et al. 2010. Activation of AMPA receptors in the suprachiasmatic nucleus phase-shifts the mouse circadian clock in vivo and in vitro. *PLoS ONE* 5:e10951
- Moga MM, Moore RY. 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389:508-34
- Moore RY, Klein DC. 1974. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 71:17-33
- Mrosovsky N, Foster RG, Salmon PA. 1999. Thresholds for masking responses to light in three strains of retinally degenerate mice. *J Comp Physiol A* 184:423-8
- Nagano M, Adachi A, Masumoto K-h, Meyer-Bernstein E, Shigeyoshi Y. 2009. rPer1 and rPer2 induction during phases of the circadian cycle critical for light resetting of the circadian clock. *Brain Research* 1289:37-48
- Nakamura Y, Okuno S, Sato F, Fujisawa H. 1995. An immunohistochemical study of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV in the rat central nervous system: light and electron microscopic observations. *Neuroscience* 68:181-94
- Nakaya M, Sanada K, Fukada Y. 2003. Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 305:494-501
- Newton AC. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9:161-7
- Newton AC. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353-64
- Newton AC. 2003. The ins and outs of protein kinase C. *Methods Mol Biol* 233:3-7
- Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H, Fukunaga K. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. *J Neurosci Res* 72:384-92
- Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M. 2010. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv Rev* 62:876-84
- Pfeffer M, Muller CM, Mordel J, Meissl H, Ansari N, et al. 2009. The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components. *J Neurosci* 29:6114-23
- Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA, Golombek DA. 2003. Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 14:1417-9
- Prosser RA, Gillette MU. 1989. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J Neurosci* 9:1073-81
- Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. 2007. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:219-40
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM. 1997. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261-9
- Shibata S, Moore RY. 1994. Calmodulin inhibitors produce phase shifts of circadian rhythms in vivo and in vitro. *J Biol Rhythms* 9:27-41
- Shirakawa T, Honma S, Katsuno Y, Oguchi H, Honma KI. 2000. Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur J Neurosci* 12:2833-8
- Sun P, Enslen H, Myung PS, Maurer RA. 1994. Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8:2527-39
- Takahashi JS, Turek FW. 1987. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, perturbs the phase of a mammalian circadian pacemaker. *Brain Res* 405:199-203

- Tischkau SA, Gallman EA, Buchanan GF, Gillette MU. 2000. Differential cAMP gating of glutamatergic signaling regulates long-term state changes in the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci* 20:7830-7
- Tischkau SA, Mitchell JW, Pace LA, Barnes JW, Barnes JA, Gillette MU. 2004. Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:539-49
- Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU. 2003a. Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278:718-23
- Tischkau SA, Weber ET, Abbott SM, Mitchell JW, Gillette MU. 2003b. Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain. *J Neurosci* 23:7543-50
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, et al. 2001. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291:1040-3
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7728-33
- Vasicek CA, Oosthuizen MK, Cooper HM, Bennett NC. 2005. Circadian rhythms of locomotor activity in the subterranean Mashona mole rat, *Cryptomys darlingi*. *Physiol Behav* 84:181-91
- von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, et al. 1998. CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J Neurosci* 18:10389-97
- Wakamatsu H, Takahashi S, Moriya T, Inouye ST, Okamura H, et al. 2001. Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12:127-31
- Wang LM, Schroeder A, Loh D, Smith D, Lin K, et al. 2008. Role for the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in mediating light input to the circadian system. *Eur J Neurosci* 27:1771-9
- Watanabe A, Ono M, Shibata S, Watanabe S. 1995. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters. *Neurosci Lett* 192:25-8
- Weber ET, Gannon RL, Michel AM, Gillette MU, Rea MA. 1995. Nitric oxide synthase inhibitor blocks light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm, but not c-fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res* 692:137-42
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697-706
- Yannielli PC, Harrington ME. 2001. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22:547-56
- Zhang Y, Takahashi JS, Turek FW. 1996. Critical period for cycloheximide blockade of light-induced phase advances of the circadian locomotor activity rhythm in golden hamsters. *Brain Res* 740:285-90
- Zhuo M, Hawkins RD. 1995. Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 6:259-77

### **Monografie:**

Becker, Jill B., et al. *Behavioral Endocrinology*. 2nd edition. Massachusetts : MIT Press, 2002. 775 s. ISBN 978-0-26-252321-9.

Hancock, John T. *Cell Signalling*. 2nd edition. New York : Oxford University Press, 2005. 296 s. ISBN 978-0-19-926467-4.

### **Internetové zdroje:**

<http://people.usd.edu/~cliff/Courses/Behavioral%20Neuroscience/Biorhythm/BRfigs/BRafferent%20SCN%20figures.html>

Staženo dne 7.5.2011

<http://sciencematters.berkeley.edu/archives/volume4/issue29/story2.php>

Staženo dne 7.5.2011