

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

**Fotoperiodická modulace centrálních cirkadiánních
hodin v suprachiasmatických jádrech a periferních
hodin v játrech**

**Photoperiodic modulation of the central circadian clock
in the suprachiasmatic nucleus and in the peripheral
clock in the liver**

Mgr. Daniela Parkanová

Rigorózní práce

V Praze 2012

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, 15. 2. 2012

ABSTRAKT

Většina fyziologických procesů se v organismech opakuje v denních intervalech stále znovu a znovu tak, že vykazují cirkadiánní rytmy. Tyto rytmy jsou u savců řízeny centrálními hodinami uloženými v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu. Signalizace z SCN ovlivňuje periferní hodiny, které se nacházejí ve většině tkání těla. V gastrointestinálním systému je běh periferních hodin úzce propojen s metabolismem. Mechanismus tvorby cirkadiánních oscilací je založen na transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách, díky kterým dochází k rytmické expresi hodinových genů. Cirkadiánní hodiny jsou každodenně seřizovány s vnějším prostředím. Pro synchronizaci centrálních hodin v SCN je důležité především střídání světla a tmy. Periferní hodiny jsou seřizovány jak signály z SCN, tak dalšími faktory, například příjmem potravy. Délka světlé části dne, neboli fotoperioda, se v našich zeměpisných šířkách v průběhu roku mění a cirkadiánní hodiny se tak musí těmto změnám neustále přizpůsobovat. Mechanismus, jakým se cirkadiánní systém přizpůsobuje změně fotoperiody, není dosud přesně znám.

Cílem této práce bylo objasnit vliv změny fotoperiody na centrální hodiny v SCN a na periferní hodiny v játrech. Specifickým cílem bylo zjistit dynamiku s jakou se tyto hodiny přizpůsobují ke změně z dlouhé fotoperiody s 18 hodinami světla na krátkou fotoperiodu s 6 hodinami světla. Dalším cílem bylo odhalit, do jaké míry se na fotoperiodické modulaci periferních hodin podílí přímá signalizace z SCN a nepřímá signalizace spojená s příjmem potravy.

Myši kmene C57Bl/6J byly chovány na dlouhé fotoperiodě. Tři, pět a třináct dní po změně z dlouhé fotoperiody na krátkou byly stanoveny profily exprese hodinových genů v SCN a v játrech. V rostrální, mediální a kaudální části SCN byla sledována exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* pomocí *in situ* hybridizace, v játrech exprese genů *Per2* a *Rev-erba* pomocí real-time RT-PCR. V dalším experimentu byly myši krmeny *ad libitum* a vystaveny změně z krátké fotoperiody na dlouhou, nebo vystaveny podmínkám, kdy krmný režim tuto změnu fotoperiody napodoboval.

Výsledky ukázaly, že po změně dlouhé fotoperiody na krátkou se profily exprese v rostrální, mediální a kaudální části SCN, které jsou na dlouhé fotoperiodě fázově odlišné, vzájemně re-synchronizovaly do stejné fáze. K této synchronizaci docházelo díky postupnému fázovému předbíhání poklesu exprese hodinových genů. V játrech se exprese genu *Per2* a *Rev-erba* přizpůsobila změně na krátkou fotoperiodu rozdílným způsobem. U

genu *Per2* došlo k fázovému předběhnutí poklesu exprese, u genu *Rev-erba* k fázovému předběhnutí nárůstu exprese. Je tedy zřejmé, že mechanismus přizpůsobení změně fotoperiody je v centrálních hodinách v SCN a v periferních hodinách v játrech rozdílný.

Pět dní po změně změně krátké fotoperiody na dlouhou byly profily exprese genů *Per2* a *Rev-erba* v rostrální, mediální a kaudální části SCN desynchronizované a tedy přizpůsobené dlouhé fotoperiodě. Změna režimu příjmu potravy neměla na denní profily exprese hodinových genů v SCN žádný vliv. Periferní hodiny v játrech byly pět dní po změně krátké fotoperiody na dlouhou zcela přizpůsobeny dlouhé fotoperiodě. V případě, kdy myši byly vystaveny krátké fotoperiodě a přitom měly přístup k potravě omezen na 6 hodin, byla fáze rytmu exprese posunuta stejně, jako na dlouhé fotoperiodě, kterou tento režim simuloval, avšak průběh profilu exprese ovlivněn nebyl. V případě změny fotoperiody z krátké na dlouhou při současném omezení přístupu k potravě, které napodobovalo příjem potravy na krátké fotoperiodě, byla výrazně ovlivněna jak fáze, tak průběh profilu exprese denních profilů hodinových genů. Fotoperiodická modulace příjmu potravy tak může přispívat k posunu fáze rytmické exprese hodinových genů, ne však ke změně průběhu těchto profilů.

Fotoperioda tedy ovlivňuje centrální a periferní hodiny rozdílným způsobem, přičemž na fotoperiodické synchronizaci periferních hodin se podílí jak signalizace z fotoperiodou modulovaných centrálních hodin v SCN, tak i signalizace spojená s příjmem potravy.

Klíčová slova: cirkadiánní hodiny, fotoperioda, hodinové geny, suprachiasmatická jádra, játra

ABSTRACT

Most physiological processes in mammals follow daily oscillations. These circadian rhythms are driven by central oscillator located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of hypothalamus. The SCN coordinates rhythmical activity of the subsidiary peripheral oscillators distributed in many different tissues. In gastrointestinal system, the peripheral clocks and metabolism are closely linked. The mechanism of circadian oscillations is based on transcriptional-translational feedback loops, which drive rhythmic expression of the clock genes. The entrainment with external conditions is essential for proper function of the circadian clock. While the SCN is driven mainly by the light-dark cycle, synchronization of the peripheral clocks depend on many factors, such as feeding and fasting. The length of the light part of the day, i.e. photoperiod, changes throughout the year rapidly and circadian system has to adapt to the changes all the time. However, a mechanism of adjustment to the change in the photoperiod has not been fully understood.

The aim of this work was to elucidate the effect of change in the photoperiod on the central SCN clock and on the peripheral clock in the liver. Firstly, we focused on dynamics of adjustment of these clocks to the change from a long photoperiod, with 18 hours of light, to a short photoperiod, with 6 hours of light. The next aim was to elucidate whether photoperiodic modulation of the hepatic clock is mediated by direct SCN signaling, indirectly by changes in feeding, or by both mechanisms.

The C57Bl/6 mice were maintained under a long photoperiod. Three, five and thirteen days after the change from the long to the short photoperiod, clock gene expression profiles in the SCN and in the liver were determined. *Per1*, *Per2* and *Rev-erba* expression in the rostral, middle and caudal part of the SCN was assessed by *in situ* hybridization, the expression of *Per2* and *Rev-erba* in liver was determined by real-time RT-PCR. In the next experiment, mice fed *ad libitum* were subjected to a change from the short to the long photoperiod or to a restricted feeding regime which simulated the change in the photoperiod.

The data demonstrate that the expression profiles, desynchronized in the rostral, middle and caudal parts of the SCN under the long photoperiod, attained synchrony after transition to the short photoperiod. Adjustment to the short photoperiod was achieved mostly by phase-advancing the clock gene expression decline. The expression rhythms of

Per2 and *Rev-erba* in the liver adjusted to the change to the short photoperiod differently; whereas *Per2* expression adjusted by advancing the expression decline, *Rev-erba* expression by advancing the expression rise. These data indicate different mechanisms of adjustment to the change of the photoperiod in the central SCN clock and in the peripheral clock in liver.

Five days after the change from a short to a long photoperiod, *Per2* and *Rev-erba* expression profiles in the rostral, middle and caudal part of the SCN were desynchronized and thus fully adjusted to the long photoperiod. The daily profiles in the SCN were not affected by changes in feeding regime. The peripheral liver clock was entrained to the change from the short to the long photoperiod five days after the transition. In mice maintained under the short photoperiod with 6 hour nighttime feeding regime simulating the long photoperiod, the expression profiles were shifted to the same phase as under the long photoperiod, however, their waveforms were not modulated accordingly. In case of the change from the short to the long photoperiod with food provided twice a day simulating the short photoperiod, both phase and waveforms of the clock gene expression were affected. Therefore, these data demonstrate that photoperiodic modulation of food intake might shift the phase of clock gene expression profiles, but does not affect their waveforms.

These results indicate that the central SCN and the peripheral liver clock are affected by photoperiod in a different way. Apparently, direct signals from the photoperiod-modulated SCN as well as the feeding related signals are likely involved in photoperiodic entrainment of the peripheral clock in the liver.

Keywords: circadian clock, photoperiod, clock gene, suprachiasmatic nucleus, liver

SEZNAM ZKRATEK

AA-NAT.....	arylalkyl-N-acetyltransferáza
AVP.....	arginin vasopresin
cAMP.....	cyklický adenosin monofosfát
cGMP.....	cyklický guanosin monofosfát
CREB.....	cAMP response element-binding protein
CT.....	circadian time, cirkadiánní čas
Dbp.....	albumin D-element binding protein
FBXL3.....	ubiquitin E3 ligáza z F-box rodiny
GABA.....	kyselina γ -aminomáselná
GHT.....	genikulohypotalamický trakt
IGL.....	intergenikulární lístek
LD (18:6).....	light-dark, světelný režim světlo-tma (18 hodin světla, 6 hodin tmy)
miR-.....	microRNA
NMDA.....	N-metyl-D-aspartátový receptor
NPY.....	neuropeptid Y
PACAP.....	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
RHT.....	retinohypotalamický trakt
SCN.....	suprachiasmatic nucleus, suprachiasmatická jádra
SIRT1.....	sirtuin 1
UTR.....	untranslated region of mRNA
VIP.....	vasoaktivní intestinální peptid

OBSAH

1. ÚVOD	8
1.1. CIRKADIÁNNÍ RYTMY	8
1.2. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM	9
1.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ	10
1.4. PERIFERNÍ OSCILÁTORY	13
1.5. HODINAMI KONTROLOVANÉ GENY	14
1.6. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU	16
1.6.1. Vliv fotoperiody na cirkadiánní rytmicitu	17
1.6.2. Vliv fotoperiody na expresi hodinových genů	18
1.6.3. Odlišný vliv fotoperiody na jednotlivé části SCN.....	19
1.6.4. Vliv fotoperiody na periferní hodiny	20
2. CÍLE	22
3. PŘEHLED POUŽITÝCH METOD	23
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1. VLIV FOTOPERIODY NA SUPRACHIASMATICKÁ JÁDRA	24
4.2. VLIV FOTOPERIODY NA PERIFERNÍ HODINY V JÁTRECH.....	27
4.3. ROLE PŘÍJMU POTRAVY A SVĚTELNÉHO REŽIMU V SYNCHRONIZACI HODIN V JÁTRECH	29
5. ZÁVĚRY	32
6. SEZNAM LITERATURY	33
7. PŘÍLOHY: PUBLIKACE	45

1. ÚVOD

1.1. CIRKADIÁNNÍ RYTMY

Všechn život na zemi je vystaven neustále se měnícím podmínkám, mezi něž patří i periodické střídání dne a noci. Vzhledem k míře, s jakou jsou organismy schopny přizpůsobit se okolním podmínkám, není divu, že si postupně vyvinuly mechanismy, pomocí nichž tyto změny dokáží předvídat. Pravidelné cykly ve spánku a bdění, fyziologii i metabolismu jsou řízeny vnitřním oscilátorem, biologickými hodinami. Ty ve všech organismech, nejjednoduššími prokaryotickými počínaje a člověkem konče, vytváří cirkadiánní rytmy. Perioda těchto rytmů (τ), jež trvá přibližně 24 hodin, je dána geneticky a lehce se liší se i mezi jednotlivci uvnitř druhu. Charakteristikou cirkadiánních rytmů je, že přetrvávají i v naprosto neperiodickém prostředí, např. ve stále tmě. V tom případě však dochází k jejich předbírání či naopak opožďování, v závislosti na tom, zda je vnitřní perioda kratší nebo delší než 24 hodin. V přírodě jsou cirkadiánní hodiny každodenně seřizovány, především pomocí střídání světla a tmy, kdy vliv má hlavně světlá část dne. Důležitými synchronizátory (tzv. Zeitgeber) jsou však i příjem potravy, teplota okolního prostředí a sociální faktory. Vnitřní subjektivní čas organismu, který je držen v neperiodickém prostředí, se označuje jako čas cirkadiánní (CT). CT0 – CT12 značí subjektivní den, CT12 – CT24 subjektivní noc.

Výzkumy z poslední doby ukazují úzké propojení cirkadiánního systému s regulací buněčného cyklu a metabolismem. Až 10% mRNA transkribované v buňkách je pod cirkadiánní kontrolou (Akhtar *et al.* 2002, Storch *et al.* 2002, Panda *et al.* 2002). Ukazuje se, že nesprávná funkce cirkadiánního systému souvisí s celou řadou onemocnění - se spánkovými poruchami, ale také s rakovinným bujením, cukrovkou nebo bipolární poruchou. Proto je důležitá správná funkce a synchronizace cirkadiánního systému. Tu zajišťuje jeho hierarchické uspořádání, kdy centrální oscilátor uložený v mozku v hypotalamu přímo přijímá světelné informace ze sítnice a tím se přizpůsobuje periodě vnějšího prostředí. Tuto informaci pak předává dále periferním oscilátorům, které zajišťují správnou synchronizaci jednotlivých orgánů.

1.2. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM

U savců je centrální oscilátor řídící cirkadiánní rytmy uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu. Prokázaly to studie na hlodavcích, kdy léze SCN zcela vyrušily cirkadiánní rytmicitu (Stephan et Zucker 1972). Naopak transplantace SCN arytmiickým jedincům obnoví cirkadiánní rytmy a to s periodou odpovídající periodě dárce, nikoliv příjemce (Ralph *et al.* 1990, Sujino *et al.* 2003).

Suprachiasmatická jádra se nacházejí po stranách třetí mozkové komory nad optickým chiasma. U hlodavců je každé z jader je složeno z přibližně 10 000 neuronů a každá buňka je samostatným oscilátorem. Funkčně i morfologicky lze suprachiasmatická jádra rozdělit do dvou částí, dorsomediální a ventrolaterální. Zatímco část ventrolaterální je přímo propojena se sítnicí, odkud získává světelné informace řídící její rytmicitu, část dorsomediální vykazuje spontánní rytmicitu, která je řízena signály z části ventrolaterální. Obě části se liší i produkcí neurotransmiterů, v části dorsomediální jde hlavně o arginin vasopresin (AVP), v části ventrolaterální o vasoaktivní intestinální peptid (VIP). Většina neuronů se vyznačuje také produkcí kyseliny γ -aminomáselné (GABA) (Moore et Speh 1993).

I když SCN produkují navenek jednotný rytmický signál, jednotlivé buňky jsou samostatnými oscilátory. Měřením elektrické aktivity neuronů v *in vitro* disperzní kultuře bylo zjištěno, že každá buňka osciluje nejen ve své vlastní fázi, ale že se liší i délkou periody. Vzájemné propojení a synchronizace jsou tudíž nezbytné pro jednotný výstupní rytmus z SCN (Welsh *et al.* 1995, Schaap *et al.* 2003). Mechanismus, pomocí něhož jsou neurony vzájemně synchronizovány, však dosud nebyl přesně objasněn. V úvahu připadá propojení pomocí jejich elektrické aktivity (Anton *et al.* 2005) či pomocí neurotransmiterů VIP nebo GABA (Harmar *et al.* 2002, Anton *et al.* 2005, Albus *et al.* 2005). Výhodou tohoto multioscilačního systému je větší přesnost výstupního rytmického signálu a zároveň menší pravděpodobnost odchýlení fáze v porovnání s rytmem tvořeným pouze jediným neuronem (Liu *et al.* 1997). Pro správnou funkci SCN je tedy nezbytná jak intracelulární tvorba rytmicity, tak intercelulární komunikace mezi buňkami (Liu et Reppert, 2000).

Kromě centrálního oscilátoru v SCN jsou nedílnou součástí cirkadiánního systému také dráhy vstupní a výstupní. Vstupní dráhy přinášejí do SCN informaci z vnějšího prostředí, zatímco dráhy výstupní rozesílají příslušné signály do celého těla. SCN jsou ovlivňovány především třemi hlavními drahami: retinohypotalamickým traktem (RHT),

genikulohypotalamickým traktem (GHT) a drahou z raphe nuclei. Informace světelného charakteru jsou přenášeny RHT (Moore et Lenn 1972). Signál je zachycen speciálními fotosenzitivními gangliovými buňkami sítnice a odeslán přímo do ventrolaterální části SCN. Tam způsobuje vylití glutamátu a PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) a jejich vazbu na NMDA receptory (N-methyl-D-aspartátové receptory) (Castel *et al.* 1993, Hannibal *et al.* 1997). GHT jsou do SCN přiváděny informace nepřímo, a to přes intergenikulární lístek (IGL) v talamu. Zde se integrují informace jak světelné tak nesvětelné, což umožňuje větší plasticitu výsledného signálu přenášeného do SCN především neuropeptidem Y (NPY) (Harrington *et al.* 1985). Serotonergní dráha z raphe nuclei ovlivňuje SCN na základě nesvětelných podnětů, například pohybové aktivity (Moga *et al.* 1997).

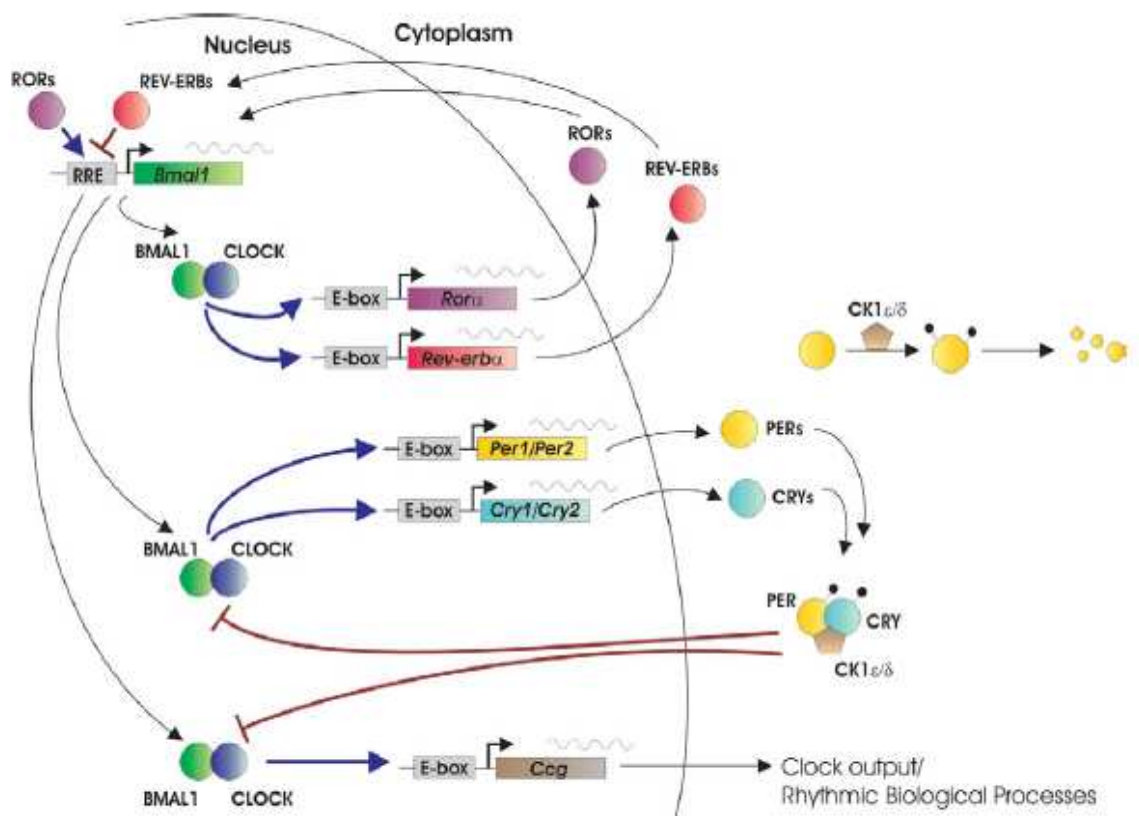
Cirkadiánní rytmy vytvářené centrálním oscilátorem v SCN jsou výstupními drahami rozesílány do ostatních částí mozku, míchy a periferních orgánů, které synchronizují. Dráhy, pomocí nichž k synchronizaci dochází, nebyly ještě zcela objasněny, pravděpodobně se jedná o kombinaci neuronálních a humorálních signálů (Kalsbeek *et al.* 2006).

1.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ

Dlouhou dobu nebylo jasné, na jakém principu cirkadiánní oscilace v suprachiasmatických jádrech vznikají. První modely navrhovaly systémy založené na synaptické aktivitě neuronů, avšak studie s blokátorem Na⁺ kanálů, tetrodotoxinem, tuto teorii vyvrátily. Až později byly identifikovány takzvané hodinové geny, jejichž rytmická exprese je podstatou vzniku cirkadiánních oscilací. Mutace či delece těchto genů vede k poruchám cirkadiánní rytmicity, od zkrácení či prodloužení periody až po úplnou ztrátu rytmicity (Bae *et al.* 2001, van der Horst *et al.* 1999). Podstatou vzniku cirkadiánních oscilací jsou dvě vzájemně propojené transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky, díky nimž dochází k rytmické expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Rora* a *Bmal1* (Reppert et Weaver 2001, Takahashi *et al.* 2008). Na principu zpětnovazebných smyček je založena tvorba rytmických oscilací u všech organismů, s evolucí však stoupá složitost tohoto mechanismu. Základem první smyčky jsou u savců transkripční aktivátory, proteiny CLOCK a BMAL1 tvořící pomocí dimerizační domény

PAS (Per-Arnt-Sim) heterodimery. Ty se po vstupu do jádra vážou pomocí basic helix-loop-helix DNA-vazebné domény na E-box sekvence (CACGTG) v enhancerech genů *Per* a *Cry*, které tím aktivují. Produkty těchto genů tvoří v cytoplasmě heterodimery, které vstupují zpět do jádra, kde inhibují svoji vlastní transkripci (interakcí s CLOCK/BMAL1 dimerem). Ve druhé zpětnovazebné smyčce aktivuje dimer CLOCK/BMAL1 transkripci jaderných sirotčích receptorů *Rev-erba* a *Rora*. Proteinové produkty těchto genů se vážou na RORE elementy (Ror-response elements) v promotoru genu *Bmal1*, přičemž REV-ERB α jeho transkripci inhibuje, naopak ROR α ji aktivuje (Reppert *et al.* 2001, Fu *et al.* 2003, Takahashi *et al.* 2008).

Tyto autoregulační zpětnovazebné smyčky se v organismu opakují v přibližně 24-hodinových cyklech. Jsou dané rytmickou expresí hodinových genů, přičemž maximální hladiny mRNA jednotlivých genů jsou oproti sobě fázově posunuté. Exprese genů *Per1*, *Per2* a *Cry1*, *Cry2* vrcholí během dne, kdy se jejich proteinové produkty hromadí v cytoplasmě. Proteiny PER1 a PER2 jsou zde však fosforylovány kasein kinázou (CK1 ϵ , CK1 δ), což jednak zakrývá jejich jaderný lokalizační signál a jednak urychluje jejich degradaci v proteasomu. Tím dochází k opožďování vstupu PER/CRY dimerů do jádra. To prodlužuje celkovou délku periody (Lowrey *et al.* 2000, Lee *et al.* 2001) a je možné, že právě tento krok je v udržování rytmicity s cirkadiánní periodou klíčový. V jádře inhibují proteiny PER/CRY svoji vlastní transkripci vazbou na CLOCK/BMAL1 a pravděpodobně přímo modifikacemi chromatinu, především deacetylací histonů. Kromě aktivace transkripce genů *Per* a *Cry* aktivuje dimer BMAL1/CLOCK i transkripci genu *Rev-erba*, pravděpodobně díky vnitřní histon acetyl-transferázové funkci proteinu CLOCK (Doi *et al.* 2006). Protein genu *Rev-erba* inhibuje transkripci genu *Bmal1*, takže hladina jeho mRNA během dne klesá a jeho proteinový produkt již nemůže spolu s CLOCK aktivovat transkripci *Per* a *Cry*. Jejich snížená hladina spolu s proteinem ROR α umožní opětovnou transkripci genu *Bmal1*, hladina jehož proteinů dosáhne maxima během noci. Tím je celý cyklus uzavřen (Takahashi *et al.* 2008).



Obr. 1: Schéma tvorby cirkadiálních oscilací – transkripčně-translační zpětnovazební smyčky (Ko et Takahashi, 2006)

Ještě v nedávné době byl právě popsán mechanismus vzniku oscilací založený na transkripčně-translačních smyčkách považován za kompletní. Výzkumy z poslední doby však naznačují, že jde pravděpodobně o mnohem komplexnější souhrn více mechanismů. Kromě již zmíněné přesné buněčné lokalizace jednotlivých elementů a modifikací histonů se zdá být nepostradatelnou i cílená degradace proteinů. FBXL3 je ubiquitin E3 ligáza z F-box rodiny, která se účastní ubiquitinace CRY proteinů, což je směruje k rychlé degradaci. Mutace genu FBXL3 nazvaná *Overtime* (Siepka *et al.* 2007) či *After hours* (Godinho *et al.* 2007) zasahuje vazebné místo pro CRY proteiny a způsobuje prodloužení cirkadiální periody. FBXL3 totiž nemůže vázat CRY, které proto nejsou degradovány a tím mohou déle inhibovat transkripci dalších hodinových genů.

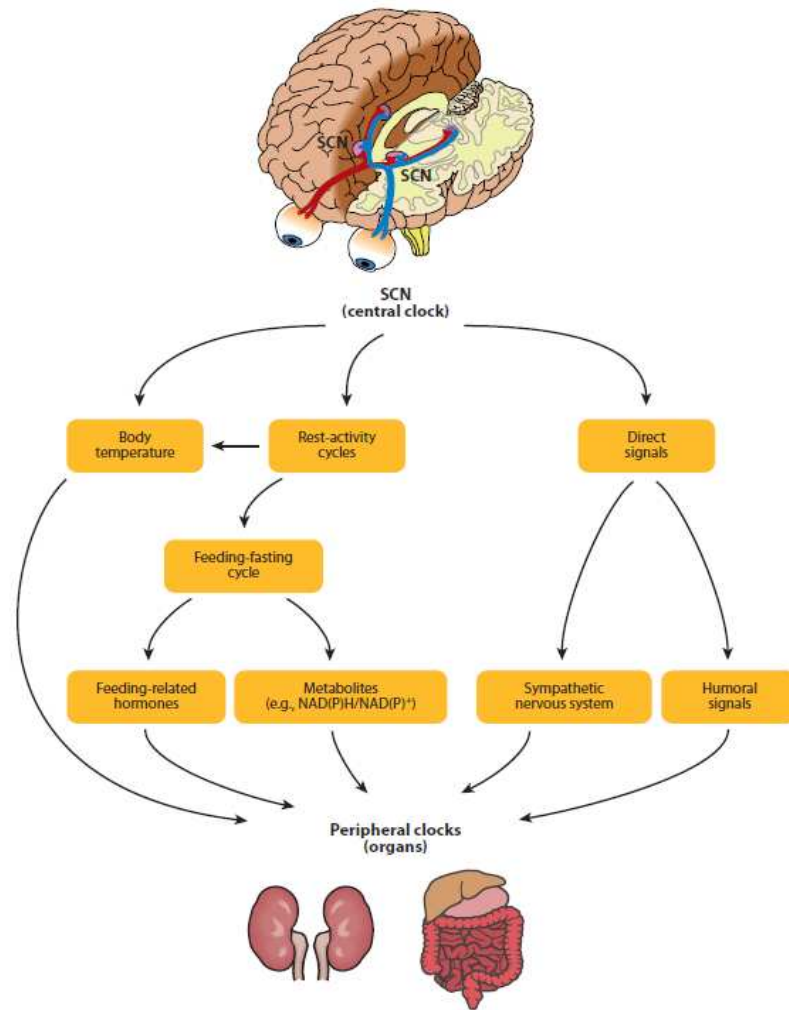
Poslední výzkumy ukazují, že neméně důležitou roli hrají i microRNA. Ty se podílejí na posttranskripční regulaci genů navázáním ve 3'UTR oblasti mRNA a tím buď zabraňují translaci nebo zapříchňují degradaci mRNA. V SCN myši byly nalezeny dvě

miRNA, které ovlivňují přímo centrální oscilátor, miR-219 a miR-132. miR-219 je exprimována rytmicky a váže se na dimer CLOCK/BMAL1. Knock-down miR-219 způsobuje u myši výrazné prodloužení cirkadiánní periody. miR-132 ovlivňuje transkripci genu *Per1* a stabilitu proteinu PER2 a zároveň zeslabuje světlem indukovaný posun fáze rytmu (Cheng *et al.* 2007). miR-192 a miR-194 snižují hladiny PER proteinů a jejich zvýšená exprese vede ke zkrácení periody (Nagel *et al.* 2009).

Další, nedávno objevenou složkou cirkadiánního oscilátoru je cyklický AMP (cAMP). Hladiny cAMP vykazují v průběhu dne výrazný rytmus, jeho koncentrace je řízena centrálním oscilátorem. Zároveň však cAMP pomáhá udržovat zpětnovazebnou transkripční smyčku a její fázi, periodu i amplitudu (O'Neill *et al.* 2008).

1.4. PERIFERNÍ OSCILÁTORY

Nedlouho po objevení prvních hodinových genů bylo zjištěno, že cirkadiánní hodiny nejsou výsadou pouze neuronů v SCN, ale že ke tvorbě rytmů dochází i ve většině periferních orgánů, např. v játrech, srdci či kosterních svalech (Balsalobre *et al.* 2002). Mechanismus tvorby oscilací v periferních hodinách je podobný mechanismu centrálních hodin v SCN – je také založený na transkripčně-translačních smyčkách se stejnými hodinovými geny jako základními prvky. Původně se předpokládalo, že SCN přímo řídí periferní oscilátory a po jejich lézi dojde k postupnému vymizení rytmů (Reppert *et al.* 2001). Později však bylo zjištěno, že jednotlivé periferní oscilátory jsou schopny tvorby rytmů i v nepřítomnosti centrálních hodin v SCN (Yoo *et al.* 2004, Guo *et al.* 2006). V takovém případě však dochází k posunu fáze mezi jednotlivými oscilátory a jejich vzájemné desynchronizaci. SCN tudíž zajišťují vzájemnou souhru cirkadiánních hodin v jednotlivých tkáních a zároveň i v orgánech mezi sebou (Yoo *et al.* 2004). Signál je přenášen několika způsoby. Buď přímo pomocí autonomních nervových spojů (Vujovic *et al.* 2008) a hormonů (Balsalobre *et al.* 2000), nebo nepřímo pomocí změn v tělesné teplotě (Brown *et al.* 2002) a chováním spojeným s příjmem potravy (Damiola *et al.* 2000).



Obr. 2: Synchronizace periferních hodin (Dibner *et al.*, 2010)

1.5. HODINAMI KONTROLOVANÉ GENY

Výše popsanými mechanismy vznikají v cirkadiálních hodinách rytmické oscilace. Tento signál je třeba šířit do celého těla, což zajišťují hodinami kontrolované geny (clock-controlled genes, CCG). Tyto geny jsou pod přímou kontrolou cirkadiálních hodin, takže mají výrazný rytmus v expresi a mohou hodiny i zpětně ovlivňovat. Pro samotnou tvorbu oscilací v SCN však nejsou nezbytné. Bylo zjištěno, že transkripce většiny hodinami kontrolovaných genů je regulována proteinem CLOCK, který se přímo účastní cirkadiální remodelace chromatinu v jejich promotorech. Jak již bylo zmíněno, CLOCK má histon acetyltransferázovou aktivitu, díky které aktivuje jejich transkripci. Opačně působí SIRT1 (NAD⁺-dependentí histon deacetyláza sirtuin 1), který se váže na

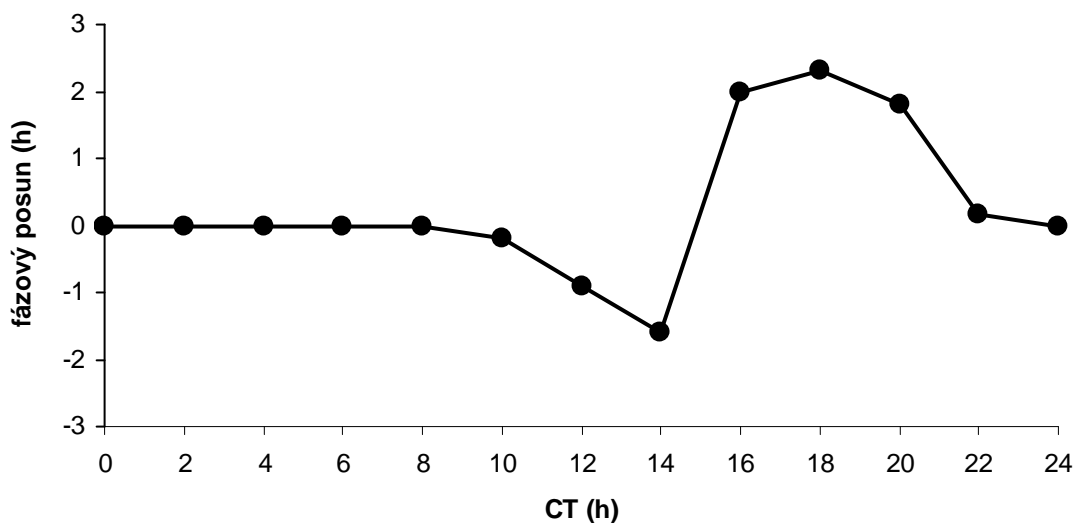
komplex CLOCK/BMAL1 a transkripci hodinami kontrolovaných genů zabraňuje. Jeho deacetylázová aktivita vykazuje cirkadiální rytmus (Asher *et al.* 2008, Nakahata *et al.* 2008). Skutečnost, že SIRT1 potřebuje pro svou funkci NAD⁺ jako kofaktor, ukazuje na úzkou propojenost cirkadiálního systému s metabolismem. Navíc mnoho hodinami kontrolovaných genů kóduje proteiny klíčové v regulaci buněčného cyklu a metabolismu, například v játrech ovlivňují enzymy metabolických drah, energetické rovnováhy a detoxifikace (Gachon *et al.* 2006). Jednou z hlavních funkcí cirkadiálních hodin je tak časové oddělení chemicky nekompatibilních metabolických procesů (například současná vysoká exprese glykogen syntázy a glykogen fosforylázy) a do jisté míry i předpověď těchto změn v metabolických drahách (Schibler *et al.* 2007).

Mezi hodinami kontrolované geny s nejlépe prostudovanou funkcí patří Dbp (D-albumin element-binding protein), AVP (arginin vasopresin) a AA-NAT (arylalkyl-N-acetyltransferáza). Dbp je transkripčním faktorem, který mimo jiné ovlivňuje pohybovou aktivitu či expresi jaterních enzymů (Yamaguchi *et al.* 2000). Avp je exprimován především v dorsomediální části SCN, má mnoho funkcí jako neurotransmitter a v organismu se podílí na udržování rovnováhy vody a solí (Ingram *et al.* 1998).

AA-NAT je klíčový enzym v dráze syntézy melatoninu. Ten je tvořen z tryptofanu v epifyze a funguje především jako převodník ze signálu neuronálního na humorální. Aktivita AA-NAT má výrazný cirkadiální rytmus s maximem během subjektivní noci, kdy jsou tudíž vysoké i hladiny melatoninu, naopak přes den jsou jeho hladiny nízké (Illnerová et Vaněček 1988). Hlavní úlohou melatoninu, který je z epifyzy uvolňován do krve, je informovat tělo o vnitřním čase biologických hodin. U všech živočichů se, nehledě na to zda jsou denní či noční, tvoří výhradně ve tmě a je tedy jakýmsi signálem noci. Pokles jeho hladin úzce souvisí s koncem subjektivní noci. Doba, po kterou je jeho hladina zvýšená, navíc poskytuje organismu informaci o ročním období. V zimě, kdy jsou noci dlouhé, je melatoninový signál dlouhý, v létě, kdy jsou krátké, je naopak krátký (Illnerová *et al.* 1984, Illnerová *et al.* 1991). S tím pochopitelně souvisí i signalizace pro počátek nebo konec reprodukční aktivity (Hastings *et al.* 1987).

1.6. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Klíčovou vlastností cirkadiánního systému je jeho schopnost přizpůsobovat se vnějšímu prostředí. Hlavním synchronizátorem je bezesporu světlo, které hodiny každodenně seřizuje na 24-hodinovou periodu. V závislosti na vnějších světelných podmínkách se mění také fáze, ve které cirkadiánní hodiny běží. Pro posun jejich fáze však není potřeba vystavení celému cyklu světla a tmy, což bylo prokázáno mnoha pokusy. Zvířata držena ve stálé tmě byla vystavena krátkému světelnému pulzu v různé denní době a porovnáním jeho účinku na cirkadiánní hodiny byla sestavena tzv. fázově responzní křivka (phase response curve, PRC). Světelný pulz aplikovaný během subjektivního dne nemá na běh hodin žádný vliv, pulz aplikovaný v první polovině subjektivní noci způsobí fázové zpoždění hodin, pulz aplikovaný ve druhé polovině subjektivní noci naopak fázové předběhnutí (Daan et Pittendrigh 1976).



Obr. 3: Fázově responzní křivka – velikost fázového posunu (+ fázové předběhnutí, - fázové zpoždění) závisí na době aplikace světelného pulzu. CT – circadiánní čas (CT 0 značí počátek dne, CT 12 počátek noci). (upraveno dle Illnerová et Vaněček 1988)

Signál o světelném stimulu je zachycen buňkami sítnice a putuje retinohypotalamickým traktem do SCN, kde způsobuje vylíčení glutamátu. Další odpověď se liší v závislosti na čase, kdy ke stimulu dojde. V první polovině subjektivní noci se

glutamát váže na N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA), což zprostředkuje uvolnění vápenatých iontů a aktivaci kalmodulinu, MAP kinázy a dalších kináz. Následná fosforylace CREB (cAMP response element binding protein), jeho vstup do jádra a vazba v CRE oblasti promotoru genů aktivuje jejich transkripci (Ding *et al.* 1998). Signál ve druhé polovině noci způsobí glutamátem zprostředkovaný nárůst produkce oxidu dusného. Ten aktivuje guanylyl cyklázu, zvýší se hladina cGMP, což aktivuje cGMP – dependentní protein kinázy, které fosforylují CREB. Tak dochází opět k aktivaci transkripce. (Ding *et al.* 1998). Je však třeba zdůraznit, že fosforylace CREB je pod cirkadiánní kontrolou a dochází k ní pouze během subjektivní noci (Ginty *et al.* 1993).

Fosforylovaný CREB se váže v CRE oblasti promotoru genů *Per1* a *Per2* a tím aktivuje jejich expresi. K této světelným pulzem zapříčiněné iniciaci transkripce, která souvisí s fázovým posunem rytmu, dochází především ve ventrolaterální části SCN a je nezávislá na CLOCK/BMAL1 zprostředkované aktivaci (Trávníčková-Bendová *et al.* 2002). Zatímco k expresi genu *Per1* dochází po světelném pulzu na začátku i na konci subjektivní noci, k expresi genu *Per2* především po pulzu během první poloviny noci, během druhé poloviny je indukce výrazně snížena. Fázové předběhnutí je tedy spojeno především s indukcí genu *Per1*, fázové zpoždění především s indukcí genu *Per2* (Shearman *et al.* 1997).

1.6.1. Vliv fotoperiody na cirkadiánní rytmicitu

Jak už bylo řečeno, světlo je nejdůležitějším synchronizátorem cirkadiánních hodin. Délka světlé části dne, neboli fotoperioda, se v průběhu roku na většině míst na Zemi velmi výrazně mění. V našich zeměpisných šířkách (50° s.š.) se pohybuje v rozmezí mezi 16 hodinami okolo letního slunovratu (21.6.) a 8 hodinami okolo zimního slunovratu (21.12.). Organismy vnímají nejen její délku, ale i to, zda dochází k jejímu prodloužení či zkrácení, což jim slouží jako ukazatel ročního období. Dle toho regulují své fyziologické funkce, například reprodukční aktivitu, především její načasování tak, aby se potomci rodili na jaře, metabolismus a s tím tvorbu tukových zásob před zimním obdobím nebo změnu zbarvení srsti (Heller et Ruby 2004, Follett et Milette 1982).

Zkoumání intervalu fotosenzitivity SCN prokázalo, že fotoperioda přímo ovlivňuje centrální oscilátor. Během subjektivní noci lze světelným pulzem indukovat expresi časného raného genu *c-Fos* ve ventrolaterální části. Tento interval světelné senzitivity je na krátké fotoperiodě výrazně delší než na fotoperiodě dlouhé (Sumová *et al.* 1995a).

Fotoperioda dále ovlivňuje například rytmus ve spontánní expresi *c-Fos* v dorsomediální části SCN (Sumová *et al.* 1998), rytmus v elektrické aktivitě neuronů SCN (Jagota *et al.* 2000, Shaap *et al.* 2003), expresi arginin vasopresinu (Jáč *et al.* 2000b) a v neposlední řadě i expresi hodinových genů.

Délka fotoperiody ovlivňuje pomocí výstupních drah z SCN i rytmus v pohybové aktivitě (Elliott *et al.* 1994), příjmu potravy (Bartness et Wade 1985) nebo rytmickou produkci melatoninu v epifyze (Illnerová et Vaněček 1980, Rollag *et al.* 1976, Goldman *et al.* 2001).

1.6.2. Vliv fotoperiody na expresi hodinových genů

Hladiny mRNA a proteinů hodinových genů jsou ovlivňovány délkou fotoperiody ve všech částech suprachiasmatických jader. V závislosti na délce fotoperiody se liší fáze, tvar křivky a amplituda rytmické exprese hodinových genů, navíc se mění i vzájemný fázový posun mezi jednotlivými profily. Nejlépe byl dosud zkoumán vliv na geny *Per1* a *Per2*, o kterých je známo, že jsou přímo ovlivnitelné světlem (Shigeyoshi *et al.* 1997). U hlodavců bylo prokázáno, že na krátké fotoperiodě je interval zvýšených hladin *Per1* i *Per2* mRNA výrazně kratší než na fotoperiodě dlouhé a amplituda je větší (Messenger *et al.* 2000, Steinlechner *et al.* 2002, Sumová *et al.* 2003). Podobné výsledky byly zjištěny i pro proteiny PER1 a PER2 (Nuesslein-Hildesheim *et al.* 2000, Sumová *et al.* 2002). Pro gen *Bmal1* platí, že na krátké fotoperiodě je interval zvýšené hladiny jeho mRNA delší než na fotoperiodě dlouhé. I zde je ovlivněna také amplituda rytmu, která je na krátké fotoperiodě větší než na fotoperiodě dlouhé (Sumová *et al.* 2003).

Rytmus exprese genu *Bmal1* je na dlouhé i krátké fotoperiodě v antifázi k rytmu exprese genů *Per1* a *Per2*. Subjektivní den je charakterizován vzestupem hladin mRNA genů *Per*, zatímco subjektivní noc nárůstem hladin *Bmal1* mRNA. Je zřejmé, že během dlouhých letních dnů trvá subjektivní den výrazně déle než za krátkých zimních dnů. Informace o délce fotoperiody je tedy zakódována přímo v centrálním oscilátoru v SCN. Cirkadiální hodiny tak živočichům neslouží pouze pro měření času v rámci jednotlivých dnů, ale podávají jim i informaci o aktuálním ročním období. To jim umožňuje jednak správně načasovat dobu probuzení a jednak předvídat nadcházející roční období (Sumová *et al.* 2004).

1.6.3. Odlišný vliv fotoperiody na jednotlivé části SCN

Porovnáním vlivu krátké a dlouhé fotoperiody na centrální oscilátor bylo zjištěno, že se exprese hodinových genů v různých částech SCN liší. V závislosti na délce fotoperiody se mění fáze rytmické exprese v rostrální, mediální a kaudální části. Pokusy u křečků ukázaly, že na dlouhé fotoperiodě je rytmus exprese genů *Per2*, *Rev-erba* a *Dbp* v kaudální části SCN fázově předběhnut před rytmem exprese v části rostrální. Na fotoperiodě krátké však rozdíl mezi jednotlivými částmi SCN nalezen nebyl (Hazlerigg *et al.* 2005, Johnston *et al.* 2005). Také u myši bylo prokázáno, že zatímco na krátké fotoperiodě je exprese genů *Per1*, *Per2* a *Bmal1* v rostrální i kaudální části SCN synchronní, dlouhá fotoperioda způsobí fázové předběhnutí profilů v kaudální části před profily v části rostrální (Naito *et al.* 2008, Sosniyenko *et al.* 2009). *In vitro* studie, kdy byl sledován rytmus *Per1*-luciferázové aktivity, potvrdily existenci samostatně oscilujících skupin buněk uvnitř SCN. Ty se vzájemně lišily jak fází svého rytmu, tak svou reakcí na délku fotoperiody. Cirkadiánní oscilace v těchto místně specifických skupinách buněk jsou fázově spřaženy buď s počátkem nebo koncem pohybové aktivity (Inagaki *et al.* 2007).

Tyto výsledky naznačují, že vliv fotoperiody na SCN je přenášen také pomocí oddělení fáze exprese hodinových genů v jeho jednotlivých částech. Zatímco na krátké fotoperiodě jsou rytmy cirkadiánních oscilací v rostrální, mediální a kaudální části synchronní, na fotoperiodě dlouhé je fáze kaudální části předběhnuta před fází v části mediální a ještě více oproti fázi v části rostrální. Díky tomu je prodloužen interval, kdy je SCN jako celek v ‚aktivním‘ denním stavu. Synchronizace na délku fotoperiody tedy pravděpodobně úzce souvisí s rozdílnou fází cirkadiánních oscilací v jednotlivých částech SCN a tím také živočichům slouží jako ukazatel ročního období (Sosniyenko *et al.* 2009).

Přestože vlivu dlouhé a krátké fotoperiody na centrální hodiny bylo věnováno mnoho studií, dynamika přizpůsobení hodin změně fotoperiody byla objasněna pouze částečně. První výzkumy se věnovaly sledování hladin melatoninu a enzymu klíčového v dráze jeho syntézy AA-NAT (arylalkyl-N-acetyltransferáza) při změně dlouhé fotoperiody na krátkou. Doba, po kterou je zvýšená hladina melatoninu i AA-NAT se postupně prodlužuje, avšak interval přizpůsobování se zdá být druhově specifický. Zatímco u potkanů došlo k synchronizaci na krátkou fotoperiodu během 2 týdnů (Illnerová *et al.* 1986), u křečků byl tento interval výrazně delší a to 6 týdnů (Illnerová *et al.* 1984) až 8 týdnů (Hastings *et al.* 1987). Vzhledem k tomu, že ve většině kmenů laboratorních myši není melatonin syntetizován (Goto *et al.* 1989), bylo jako ukazatel

přizpůsobení změně fotoperiody použito sledování jejich pohybové aktivity. Bylo zjištěno, že po změně fotoperiody na dlouhou či naopak krátkou, dojde k výraznému zkrácení respektive prodloužení intervalu pohybové aktivity (Inagaki *et al.* 2007).

Přizpůsobení cirkadiálních hodin na změnu délky fotoperiody bylo dále zkoumáno sledováním intervalu fotosenzitivity SCN a to měřením doby, kdy je světlem indukovatelná exprese genu *c-Fos*. Zatímco při změně dlouhé fotoperiody na krátkou trvalo přizpůsobení intervalu 2 týdny, přizpůsobení změně z krátké fotoperiody na dlouhou proběhlo během 3 dnů a bylo tedy podstatně rychlejší (Sumová *et al.* 1995a). Na úrovni hodinových genů bylo přizpůsobení se změně fotoperiody zkoumáno pouze při asymetrické změně dlouhé fotoperiody na krátkou. Rytmy exprese genů *Per1* a *Bmal1* nebyly přizpůsobeny krátké fotoperiodě ani po 13 dnech (Sumová *et al.* 2007). Dynamika vzájemné synchronizace mezi jednotlivými částmi SCN při změně fotoperiody byla poprvé zkoumána až v rámci předkládané studie (viz níže).

1.6.4. Vliv fotoperiody na periferní hodiny

Skutečnost, že fotoperioda má vliv i na rytmickou expresi genů v periferních oscilátorech, potvrdilo již několik studií. Nejprve to bylo prokázáno u zlatých křečků, kdy se profily exprese hodinového genu *Per1* a hodinami kontrolovaného genu *Dbp* v srdci a plicích lišily v závislosti na délce fotoperiody (Carr *et al.* 2003). Také v játrech byl u křečků prokázán vliv fotoperiody na expresi genů *Per*, *Cry*, *Clock* a *Bmal1* (Maronde *et al.* 2007). U ovcí byla v játrech zjištěna fotoperiodou ovlivněná regulace genu *Per2* (Andersson *et al.* 2005). Na úrovni proteinů, konkrétně proteinů PER1 a PER2, byl vliv fotoperiody potvrzen v játrech, srdci a plicích u potkanů (Bendová *et al.* 2006). Z těchto výsledků je zřejmé, že informace o aktuálních světelných podmínkách je periferními oscilátory zpracovávána, avšak přesný mechanismus znám není. Světlem jsou přímo synchronizované totiž pouze centrální hodiny v SCN díky jejich propojení se síticí. Informace o vnější fotoperiodě je z nich rozesílána do periferních oscilátorů pomocí zatím ne zcela objasněných neuronálních a humorálních signálů (Kalsbeek *et al.* 2006, Schibler *et al.* 2009). Zdá se však, že na většinu periferních hodin má stěžejní vliv především doba příjmu potravy. Její načasování je za normálních okolností pod kontrolou centrálních hodin v SCN. Pokud je však potrava dostupná pouze v určitý omezený časový úsek, fáze rytmu exprese hodinových genů v játrech se okamžitě přizpůsobuje tomuto intervalu nezávisle na fázi rytmu v SCN (Damiola *et al.* 2000). V případě, že je tento interval

v rozporu se signály z SCN, například je-li potrava dostupná pouze v době, kdy jsou zvířata neaktivní, dojde k odpražení centrálních a periferních hodin. Hodiny v SCN pak běží v souladu s vnějšími světelnými podmínkami, zatímco pro periferní hodiny je rozhodující čas příjmu potravy (Damiola *et al.* 2000, Stokkan *et al.* 2001, Hara *et al.* 2001). To znamená, že za normálních okolností nemá doba příjmu potravy na centrální hodiny v SCN vliv. Pouze za zvláštních podmínek, například když jsou stálým světlem jednotlivé buňky SCN vzájemně desynchronizované (Nováková *et al.* 2011) nebo v případě hypokalorické diety (Mendoza *et al.* 2005), je příjem potravy schopen suprachiasmatická jádra synchronizovat. Jak už bylo řečeno, nejsou mechanismy, pomocí nichž je informace o vnější fotoperiodě předávána periferním oscilátorům, zatím známy. V úvahu přichází buď přímá signalizace z SCN nebo signalizace nepřímá prostřednictvím časového ovlivňování chování spojeného s příjmem potravy nebo kombinace obou možností.

2. CÍLE

1. Naším prvním cílem bylo objasnit mechanismus přizpůsobení změně fotoperiody v centrálních hodinách v SCN.
2. Dále jsme chtěli zjistit, jak na změnu fotoperiody reagují periferní hodiny.
3. Dalším cílem bylo objasnit, zda fotoperioda ovlivňuje periferní oscilátory, konkrétně játra, skrze přímou signalizaci z SCN nebo zda je důležitější synchronizace spojená s příjmem potravy.

3. PŘEHLED POUŽITÝCH METOD

Experimentální zvířata

K experimentům byly použity samci myši inbredního kmene C57Bl/6J (Velaz, Praha). Zvířata byla chována při teplotě 23 ± 2 °C s volným přístupem k vodě a potravě. Osvětlení bylo zajištěno 40-W zářivkami a intenzita osvětlení se pohybovala mezi 50 a 200 lux dle umístění chovných klecí. Světelné režimy, jejich změny a změny krmných režimů jsou detailně popsány v příložených článcích. Všechny pokusy byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 42084/2003-1020).

In situ hybridizace

Ke stanovení exprese hodinových genů v SCN byla použita metoda *in situ* hybridizace s radioaktivně značenou RNA sondou. K přípravě sond pomocí *in vitro* transkripce bylo použito α -³⁵S-UTP (MP-Biomedicals, CA, USA). Metoda je popsána v příložených článcích. Hybridizační signál byl stanoven na autoradiografickém filmu a relativní množství RNA měřeno jako relativní optická densita.

Real-time RT-PCR

Pro stanovení profilů exprese hodinových genů v játrech byla použita metoda real-time RT-PCR. Z tkání byla izolována celková RNA (Rneasy Mini Kit, Qiagen) a následně provedena reverzní transkripce. cDNA byla amplifikována na přístroji LightCycler 480 (Roche) a relativní kvantifikace stanovena pomocí normalizace k housekeeping genu β -2-mikroglobulin. Podrobnější popis metody je v příložených článcích.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. VLIV FOTOPERIODY NA SUPRACHIASMATICKÁ JÁDRA

(Sosniyenko S. *, Parkanová D. *, Illnerová H., Sládek M., Sumová A. (2010): Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, R959-971)

* Oba autoři přispěli k práci stejným dílem.

Naším prvním cílem bylo objasnit dynamiku přizpůsobení exprese hodinových genů v centrálních a periferních hodinách ke změně fotoperiody. Vzhledem k nedávno zjištěné heterogenitě exprese hodinových genů v rámci subpopulací buněk v SCN v závislosti na délce fotoperiody, jsme sledovali expresi hodinových genů v rostrální, mediální a kaudální části SCN u myši během změny dlouhé fotoperiody na krátkou. Myši synchronizované na dlouhou fotoperiodu s 18 hodinami světla a 6 hodinami tmy (LD 18:6) byly přemístěny na krátkou fotoperiodu s 6 h světla a 18 h tmy (LD 6:18). Tři, pět a třináct dní po změně fotoperiody byly stanoveny denní profily exprese genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba*. Zároveň byla sledována pohybová aktivita myši. To nám umožnilo porovnat změny v expresi hodinových genů se změnami v chování a pohybové aktivitě.

Výsledky ukázaly, že rytmus pohybové aktivity se adaptoval změně dlouhé fotoperiody na krátkou během 11 dní. Délka intervalu pohybové aktivity na dlouhé a na krátké fotoperiodě se shodovala s již dříve publikovanými daty (Inagaki *et al.* 2007). K rozšíření intervalu aktivity došlo především postupným posunem počátku aktivity do dřívějších večerních hodin, zatímco konec aktivní fáze nastával přibližně ve stále stejnou dobu (viz Sosniyenko *et al.* 2010, Fig. 1).

K přizpůsobení profilů exprese genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* v SCN při změně z dlouhé na krátkou fotoperiodu došlo ve všech třech případech podobným způsobem, zejména postupným fázovým předbíháním poklesu hladin jejich mRNA. Doba nárůstu hladin mRNA se naproti tomu téměř neměnila. Zdá se proto, že pokles hladin mRNA je vázán na dobu zhasnutí více než nárůst hladin mRNA na dobu rozsvícení. Podobně byl i počátek aktivity (na rozdíl od konce aktivity) vázán na dobu zhasnutí. Lze proto předpokládat, že u myši probíhá přizpůsobení krátké fotoperiodě pomocí předběhnutí

markerů spojených s dobou zhasnutí. Naopak u potkanů byly při přizpůsobení se změně na krátkou fotoperiodu zaznamenány posuny markerů spojených s dobou rozsvícení. Jednalo se o pokles aktivity enzymu AA-NAT v epifýze (Illnerová *et al.* 1986) a fotoindukce genu *c-Fos* v SCN (Sumová *et al.* 1995) a dále o nárůst hladin proteinu PER1 v SCN (Sumová *et al.* 2002). Takto rozdílný mechanismus přizpůsobení se změnám fotoperiody u myši a potkanů by mohla vysvětlovat skutečnost, že zatímco u potkanů je endogenní cirkadiánní perioda delší než 24 hodin, u myši je naopak kratší.

V průběhu přizpůsobování se změně z dlouhé na krátkou fotoperiodu byly zjištěny rozdíly v expresi genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* mezi rostrální, mediální a kaudální částí SCN. Doba nárůstu hladin mRNA se v rostrální části víceméně neměnila, s výjimkou genu *Per1*, u kterého došlo k výraznému fázovému předběhnutí. U poklesu hladin mRNA v rostrální části došlo k výraznému fázovému předběhnutí u všech tří genů. V mediální a kaudální části SCN nebyly zjištěny změny v době nárůstu hladin mRNA během změny fotoperiody, u poklesu hladin mRNA došlo u všech sledovaných genů k výraznému fázovému předběhnutí (viz Sosniyenko *et al.* 2010, Table 1). Z těchto výsledků vyplývá, že přizpůsobení se změně z dlouhé fotoperiody na krátkou probíhá pomocí fázového předběhnutí poklesu exprese hodinových genů.

Výsledky dále ukázaly, že zatímco na dlouhé fotoperiodě byly profily exprese genů *Per1*, *Per2* i *Rev-erba* v jednotlivých částech SCN desynchronizované, po přesunu na krátkou fotoperiodu došlo k jejich vzájemné synchronizaci (viz Sosniyenko *et al.* 2010, Fig. 2, 3, 4). Skutečnost, že na dlouhé fotoperiodě je rytmus hladin mRNA v kaudální části SCN fázově předběhnut před rytmem v rostrální části, je v souladu s nedávno publikovanými daty. Práce několika autorů (Inagaki *et al.* 2007, Naito *et al.* 2008, Yan *et al.* 2008) také dávají fázový posun rytmu exprese hodinových genů v rostro-kaudální ose do souvislosti s mechanismem zakódování délky fotoperiody v SCN. Díky vzájemné desynchronizaci jednotlivých částí je na dlouhé fotoperiodě rozšířen interval, kdy dochází k expresi genů charakteristických pro subjektivní den. Nejdříve stoupají hladiny mRNA hodinových genů v kaudální, poté mediální a až nakonec v rostrální části SCN.

Výsledky získané porovnáním profilů exprese jednotlivých genů za 3, 5 a 13 dní po změně z dlouhé na krátkou fotoperiodu ukázaly, že dynamika přizpůsobení se krátké fotoperiodě je u každého z nich odlišná (viz Sosniyenko *et al.* 2010, Fig. 5). Nejrychleji se adaptoval profil *Rev-erba* mRNA, kde již 5. den po změně fotoperiody byla exprese v rostrální a kaudální části SCN vzájemně synchronizovaná. Exprese genu *Per1* byla přizpůsobena krátké fotoperiodě během 13 dnů. Naproti tomu profily exprese genu *Per2*

nebyly v rostrální a kaudální části SCN synchronizované ani po 13 dnech od změny fotoperiody. Naše výsledky tedy přinesly detailní analýzu dynamiky přizpůsobení cirkadiálních hodin v SCN k přechodu z dlouhé fotoperiody na krátkou, kdy se vzájemně desynchronizované části postupně sladily do jednotné fáze.

4.2. VLIV FOTOPERIODY NA PERIFERNÍ HODINY V JÁTRECH

(Sosniyenko S., Parkanová D., Illnerová H., Sládek M., Sumová A. (2010): Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, R959-971)

Kromě vlivu změny z dlouhé fotoperiody na krátkou na centrální hodiny v SCN jsme sledovali také přizpůsobení genové exprese v periferních hodinách v játrech. Vliv fotoperiody na expresi hodinových genů v některých periferních orgánech byl potvrzen již dříve (Carr *et al.* 2003, Andersson *et al.* 2005), v játrech u myši však zatím studován nebyl. Výsledky prokázaly, že exprese genu *Per2* se přizpůsobila krátké fotoperiodě fázovým předběhnutím jak nárůstu tak poklesu hladin mRNA. Výraznější byl fázový posun poklesu, v důsledku čehož byl interval zvýšených hladin mRNA na krátké fotoperiodě zkrácený. Přizpůsobení ke krátké fotoperiodě trvalo déle než 13 dní. Naproti tomu, exprese genu *Rev-erba* byla po 13 dnech již plně adaptována na krátkou fotoperiodu, a to na rozdíl od *Per2* především díky fázovému předběhnutí nárůstu hladiny mRNA. Čas poklesu hladiny mRNA se po změně fotoperiody neměnil a interval její zvýšené hladiny tak byl na krátké fotoperiodě prodloužen v porovnání s fotoperiodou dlouhou (viz Sosniyenko *et al.* 2010, Fig. 6).

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že se mechanismus přizpůsobení ke změně fotoperiody v centrálních hodinách v SCN a v periferních hodinách v játrech liší. V centrálních hodinách v SCN došlo u všech tří sledovaných genů ke zkrácení intervalu zvýšených hladin mRNA (díky fázovému předběhnutí doby poklesu hladin mRNA), což znamená prodloužení délky subjektivní noci. Zároveň s tím se prodloužil i interval pohybové aktivity, který je SCN řízen. Stejně tak se prodloužil i interval, kdy docházelo k expresi genu *Rev-erba* v játrech. Můžeme tedy usuzovat, že v játrech by přizpůsobení exprese genu *Rev-erba* změně fotoperiody mohlo být řízeno signály z SCN nebo nepřímo pomocí modulace rytmů pohybové aktivity a příjmu potravy. Pro druhou možnost hovoří především to, že v promotoru tohoto genu byla nalezena oblast, na kterou se váží jaderné receptory PPAR α a PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) (Fontaine *et al.* 2003). Jejich exprese vykazuje cirkadiánní rytmus (Yang *et al.* 2006) a jsou aktivovány při hladovění. Další možností by mohla být regulace pomocí glukokortikoidů (Torra *et al.* 2000). Zdá se tedy, že regulace exprese genu *Rev-erba* by mohla být přímo napojena na

rytmus v příjmu potravy a s tím spojeným rytmem pohybové aktivity. Tomu by odpovídal i stejný princip mechanismu přizpůsobení hladin *Rev-erba* mRNA v játrech a rytmu pohybové aktivity změně fotoperiody.

Naproti tomu exprese genu *Per2* v játrech je pravděpodobně řízena signály přímo z SCN. Dynamika přizpůsobení změně fotoperiody totiž přesně odpovídala mechanismu v SCN. Tuto hypotézu o přímém řízení exprese *Per2* signály z SCN také podporuje zjištění, že rytmická exprese *Per2* přetrvává i v případě, že jsou cirkadiální hodiny v játrech podmíněně inaktivované (Kornmann *et al.* 2007).

Můžeme tedy uzavřít, že mechanismus přizpůsobení ke změně fotoperiody v centrálních hodinách je odlišný od mechanismu přizpůsobení periferních hodin. Dále je zřejmé, že přizpůsobení cirkadiálních hodin na změněné vnější fotoperiodické podmínky je velmi komplexní proces a k jeho plnému objasnění je potřeba dalších studií. Správná funkce a chod cirkadiálního systému, jeho synchronizace s vnějším prostředím i mezi jeho jednotlivými komponentami totiž hraje nezastupitelnou roli ve spánkovém režimu, metabolismu a je jedním z faktorů zabraňujícím nádorovému bujení.

4.3. ROLE PŘÍJMU POTRAVY A SVĚTELNÉHO REŽIMU V SYNCHRONIZACI HODIN V JÁTRECH

(Parkanová D., Nováková M., Sosniyenko S., Sumová A. (2012): Photoperiodic modulation of the hepatic clock by the suprachiasmatic nucleus and feeding regime in mice. *Eur J Neurosci*, přijat do tisku)

V následující studii jsem se zabývali mechanismem, kterým fotoperioda ovlivňuje periferní hodiny v játrech, a to především otázkou, jaký podíl na tomto mechanismu má změna v příjmu potravy. Myši byly vystaveny jednak změně fotoperiody a jednak změně krmného režimu, což nám umožnilo sledovat vliv obou těchto faktorů na cirkadiánní hodiny. Cílem bylo určit, zda synchronizace periferních hodin s vnější fotoperiodou je řízena přímou signalizací z SCN nebo nepřímo signály spojenými s pohybovou aktivitou a příjmem potravy.

Sledovali jsme expresi hodinových genů *Per2* a *Rev-erba* v centrálních hodinách v SCN a v periferních hodinách v játrech, a to na několika rozdílných režimech. Zvířata přizpůsobená krátké fotoperiodě (LD 6:18) byla přemístěna buď na fotoperiodu dlouhou (LD 18:6), nebo ponechána na fotoperiodě krátké a vystavena režimu s přístupem k potravě omezeným pouze na 6 hodin, který simuloval podmínky dlouhé fotoperiody. Další skupina zvířat byla opět přemístěna z krátké fotoperiody na dlouhou, přičemž jedna část byla krmena *ad libitum* a druhá krmena pouze dvakrát denně, což simulovalo podmínky fotoperiody krátké. Tento přístup umožnil odlišit vliv fotoperiody a vliv příjmu potravy na expresi hodinových genů.

Výsledky ukázaly, že za pět dní po změně z krátké fotoperiody na dlouhou, byly profily hladin *Per2* a *Rev-erba* mRNA v rostrální, mediální a kaudální části SCN desynchronizované, což bylo potvrzením, že centrální hodiny již byly přizpůsobeny dlouhé fotoperiodě (viz Parkanová *et al.* 2012, Fig. 2, 3). Porovnáme-li tato data s výsledky z naší předchozí studie (Sosniyenko *et al.* 2010), kdy bylo sledováno přizpůsobení opačné změně, z dlouhé fotoperiody na krátkou, je zřejmé, že adaptace nastala mnohem rychleji. Zatímco přizpůsobování na krátkou fotoperiodu trvalo kolem 14 dnů, přizpůsobení na dlouhou fotoperiodu proběhlo během 5 dnů. Změnou z krátké na dlouhou fotoperiodu se dříve zabývala pouze jediná studie, která sledovala přizpůsobení rytmu fotoindukce genu *c-Fos* v SCN. I v tomto případě bylo zjištěno, že přizpůsobení k

přechodu z krátké fotoperiody na dlouhou je rychlejší než v opačném směru (Sumová *et al.* 1995a).

Experimenty, kdy byla zvířata držena na režimech s časově omezeným přístupem k potravě, neprokázaly vliv doby krmení na centrální hodiny v SCN. Profily exprese u zvířat na krátké fotoperiodě s 6hodinovým přístupem k potravě simulujícím změnu krátké fotoperiody na dlouhou byly v jednotlivých částech SCN synchronizované, což značí přizpůsobení ke krátké fotoperiodě. Stejně tak u zvířat, kterým byla krátká fotoperioda změněna na dlouhou, avšak se dvěma krmnými dávkami denně simulujícími fotoperiodu krátkou, zůstaly profily exprese v rostro-kaudální ose SCN desynchronizované (viz Parkanová *et al.* 2012, Fig. 2, 3). Znamená to tedy, že centrální hodiny nejsou příjmem potravy ovlivněny, a to ani za podmínek, kdy se přizpůsobují změněným vnějším fotoperiodickým podmínkám. Zdá se, že centrální hodiny jsou ovlivňovány dobou příjmu potravy pouze v případě, že jsou desynchronizované (např. na stálém světle) (Nováková *et al.* 2011) nebo v případě hypokalorické diety (Mendoza *et al.* 2005).

V játrech přineslo sledování exprese hodinových genů *Per2* a *Rev-erba* v porovnání s SCN odlišné výsledky. Pět dní po změně fotoperiody z krátké na dlouhou byly profily hladin mRNA již přizpůsobeny novým světelným podmínkám. V případě, kdy se neměnila délka fotoperiody, ale změnil se krmný režim na 6hodinový interval, došlo k posunu fáze exprese hodinových genů stejně jako v předchozím případě. Tvar profilu exprese se však po změně krmného režimu nezměnil a zůstal stejný jako na krátké fotoperiodě.

Po změně fotoperiody z krátké na dlouhou a současné změně režimu krmení na dvě dávky denně (které napodobovalo podmínky krátké fotoperiody) vykazovala exprese hodinových genů v játrech podobné znaky přizpůsobení jako v předchozím experimentu. Zatímco fáze rytmu exprese odpovídala přizpůsobení krátké fotoperiodě, tvar profilu exprese naopak odpovídal přizpůsobení dlouhé fotoperiodě (viz Parkanová *et al.* 2012, Fig. 4, 5).

Z těchto výsledků vyplývá, že synchronizace periferních hodin v játrech je ovlivněna jak fotoperiodou, tak příjmem potravy. Fotoperioda měla v obou experimentech rozhodující vliv na průběh profilu exprese hodinových genů. Informace o její délce je proto pravděpodobně zprostředkována přímou signalizací z SCN, jehož funkce je vnějšími světelnými podmínkami výrazně modulována. Změna příjmu potravy mění fázi rytmu exprese hodinových genů. Z profilů exprese získaných na režimu se dvěma krmnými dávkami lze navíc usuzovat, že na fázi periferních hodin nemá zásadní vliv doba příjmu

potravy, ale spíše interval hladovění nebo naopak nasycení. Přenos informace o příjmu potravy na úroveň periferních hodin v hepatocytech by tak mohl být zprostředkován glukokortikoidy. Byla totiž prokázána jejich schopnost synchronizovat periferní hodiny (Balsalobre *et al.* 2000, Oishi *et al.* 2005). Signál jimi zprostředkovaný však odráží spíše aktuální dostupnost potravy než informaci o skutečné délce dne.

Prokázali jsme, že fotoperioda má zásadní vliv na synchronizaci periferních hodin v játrech myši a že se na této synchronizaci pravděpodobně podílí přímá signalizace z SCN. Informace o vnějších světelných podmínkách je přenášena zatím ne zcela objasněnými signalizačními dráhami. Nejpravděpodobnější se zdá být synchronizace pomocí autonomního nervového systému, konkrétně adrenergní signalizace. Odstranění autonomní inervace jater totiž prokázalo její podíl na regulaci exprese hodinových genů (Terazono *et al.* 2003, Cailotto *et al.* 2009).

Závěrem lze říci, že fotoperioda ovlivňuje periferní hodiny v játrech především přímou signalizací z SCN. Nezanedbatelnou roli však hraje i příjem potravy. V případě, kdy byla doba krmení přibližně uprostřed subjektivního dne (u nočních organismů), rytmus exprese hodinových genů v játrech okamžitě „přeskočil“ do zcela opačné fáze. Výsledky tak naznačují, že změna v režimu příjmu potravy na nesprávnou denní dobu může způsobit vzájemnou desynchronizaci mezi jednotlivými cirkadiálními hodinami uvnitř organismu, což je považováno za rizikový faktor v rozvoji metabolických onemocnění.

5. ZÁVĚRY

1. Mechanismus přizpůsobení ke změně fotoperiody se v centrálních hodinách v SCN a v periferních hodinách v játrech liší. Po změně z dlouhé fotoperiody na krátkou se exprese hodinových genů v SCN adaptuje pomocí fázového předběhnutí poklesu hladin jejich mRNA. Zatímco na dlouhé fotoperiodě jsou profily exprese hodinových genů v jednotlivých částech SCN vzájemně fázově posunuté, po změně na krátkou fotoperiodu dojde k postupné synchronizaci na jednotnou fázi. Rychlost, s jakou se exprese genů přizpůsobí nové délce fotoperiody, je u jednotlivých genů rozdílná.
2. V játrech se exprese hodinových genů *Per2* a *Rev-erba* přizpůsobila změně fotoperiody rozdílným způsobem - zatímco u genu *Per2* došlo k fázovému předběhnutí poklesu hladin mRNA, u genu *Rev-erba* k fázovému předběhnutí nárůstu hladin mRNA.
3. Expese hodinových genů *Per2* a *Rev-erba* se v SCN přizpůsobí změně krátké fotoperiody na dlouhou během 5 dnů a není ovlivněna změnami v příjmu potravy. V periferních hodinách v játrech působí na expresi hodinových genů jak signalizace z SCN, tak signály spojené s příjmem potravy, které jsou ovlivňovány fotoperiodou. Zatímco fotoperioda má vliv na průběh profilu, příjem potravy posunuje fázi rytmické exprese. Příjem potravy v „nevhodnou“ dobu tak může způsobit abnormální posun fáze rytmu exprese a tím desynchronizaci jednotlivých oscilátorů v těle.

6. SEZNAM LITERATURY

- Albrecht U., Zheng B., Larkin D., Sun Z.S., Lee C.C. (2001): mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms*, 16 (2), 100-104
- Albus H., Vansteensel M.J., Michel S., Block G.D., Meijer J.H. (2005): A GABAergic Mechanism Is Necessary for Coupling Dissociable Ventral and Dorsal Regional Oscillators within the Circadian Clock. *Current Biology*, 15, 886-893
- Akhtar R.A., Reddy A.B., Maywood E.S., Clayton J.D., King V.M., Smith A.G., Gant T.W., Hastings M.H., Kyriacou C.P. (2002): Circadian cycling of mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 12 (7), 540-550
- Andersson H., Johnston J.D., Messenger S., Hazlerigg D., Lincoln D. (2005): Photoperiod regulates clock gene rhythms in the ovine liver. *Gen Comp Endocrinol*, 142(3), 357-63
- Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppel F., Mostoslavsky R., Alt F.W., Schibler U. (2008): SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 134, 317-328
- Aton S.J., Herzog E.D. (2005): Come together, right ... now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock, *Neuron*, 48, 531-534
- Bae K., Weaver D.R. (2003): Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. *J Biol Rhythms*, 18(2), 123-33
- Balsalobre A. (2002): Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, 309, 193-199

Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H.M., Schutz G., Schibler U. (2000): Ressetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344-2347

Bartness T.J., Wade G.N. (1985): Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci Behav Rev*, 9, 599-612

Bendová Z., Sumová A. (2006): Photoperiodic regulation of PER1 and PER2 protein expression in rat peripheral tissues. *Physiol Res*, 55, 623-632

Brown S.A. Zimbrunn G., Fleury-Olela F., Preitner N., Schibler U. (2002): Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*, 12, 1574-1583

Cailotto C., Lei J., van der Vliet J., van Heijningen C., van Eden C.G., Kalsbeek A., Pévet P., Buijs R.M. (2009): Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS One*, 4 (5), e5650

Carr A.J., Johnston J.D., Semikhodskii A.G., Nolan T., Caqampanq F.R., Stirland, J.A., Loudon, A.S. (2003): Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr Biol*, 13(17), 1543-8

Castel M., Belenky M., Cohen S., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. (1993): Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 5, 368-381

Cheng H.Y., Papp J.W., Varlamova O., Dziema H., Russell B., Curfman, J.P., Nakazawa T., Shimizu K., Okamura H., Impey S., Obrietan K.H. (2007): microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, 54, 813-829

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 Dev*, 14, 2950-2961

- Dibner C., Schibler U., Albrecht U. (2010): The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 72, 517-549
- Ding J.M., Buchanan G.F., Tischkau S.A., Chen D., Kuriashkina L., Faiman L.E., Alster J.M., McPherson P.S., Campbell K.P., Gillette M.U. (1998): A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, 394(6691), 381-4
- Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. (2006): Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125, 497-508
- Elliot J.A., Tamarkin L. (1994): Complex circadian regulation of pineal melatonin and wheel-running in Syrian hamsters. *J Comp Physiol*, 174, 469-484
- Follett B.K., Milette J.J. (1982): Photoperiodism in quail: testicular growth and maintenance under skeleton photoperiods. *J Endocrinol*, 93(1), 83-90
- Fontaine C., Dubois G., Duguay Y., Helledie T., Vu-Dac N., Gervois P., Soncin F., Mandrup S., Fruchart J.C., Fruchart-Najib J., Staels B. (2003): The orphan nuclear receptor *Rev-erba* is a peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) γ target gene and promotes PPAR γ -induced adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 278, 37672-37680
- Fu L., Lee C.C. (2003): The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*, 3, 350-361
- Gachon F., Olela F.F., Schaad O., Descombes P., Schibler U. (2006): The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab*, 4, 25-36
- 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 circadian clock. *Science*, 260 (5105), 238-241

Godinho S.I., Maywood E.S., Shaw L., Tucci V., Barnard A.R., Busino L., Pagano M., Kendall R., Quwailid M.M., Romero M.R., O'Neill J., Chesham J.E., Brooker D., Lallane Z., Hastings M.H., Nolan P.M. (2007): The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. *Science*, 316, 897-900

Goldman B.D. (2001): Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, 16, 283-301

Goto M., Oshima I., Tomita T., Ebihara S. (1989): Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res*, 7, 195-204

Guo H., 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. *J Neurosci*, 26, 6406-6412

Hannibal J., Ding J.M., Chen D., Fahrenkrug J., Larsen P.J., Gillette M.U., Mikkelsen J.D. (1997): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci*, 17, 2637-2644

Hara R., Wan K., Wakamatsu H., Aida R., Moriya T., Akiyama M., Shibata S. (2001): Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 6 (3), 269-278

Harmar A.J., Marston H.M., Shen S., Spratt C., West K.M., Sheward W.J., Morrison C.F., Dorin J.R., Piggins H.D., Reubi J.C., Kelly J.S., Maywood E.S., Hastings M.H. (2002): The *vpac(2)* receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 109, 497-508

Harrington M.E., Nance D.M., Rusak B. (1985): Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res Bull*, 15, 465-472

Hastings, M.H., Walker, A.P., Herbert, J. (1987): Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J Endocrinol*, 114(2), 221-9

Hazlerigg D.G., Ebling F.J.P., Johnston J.D. (2005): Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr Biol*, 15(12), R455-7

Heller H.C., Ruby N.F. (2004): Sleep and circadian rhythms in mammalian torpor. *Annu Rev Physiol*, 66, 275-89

Illnerová H. (1991): The suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production. In: *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock*, edited by Klein D.C., Moore R.J., Reppert S.M., New York: Oxford University, p. 197-216

Illnerová H., Hoffmann K., Vaněček J. (1984): Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology*, 38(3), 226-31

Illnerová H., Hoffman K., Vaněček J. (1986): Adjustment of the rat pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod depends on the direction of the extension of the dark period. *Brain Res*, 362, 403-408

Illnerová H., Vaněček J. (1980): Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of year. *Neuroendocrinology*, 31(5), 321-6

Illnerová H., Vaněček J. (1988): Entrainment of rat pineal rhythm in melatonin production by light. *Reprod Nutr Dev*, 28(2B), 515-26

Inagaki N., Honma S., Ono D., Tanahashi Y., Honma K. (2007): Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(18), 7664-9

- Ingram C.D., Ciobanu R., Coculescu I.L., Tanasescu R., Coculescu M., Mihai R. (1998): Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*, 119, 351-64
- Jagota A., de la Iglesia H.O., Schwartz W.J. (2002): Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci*, 3 (4), 372-376
- Johnston, J.D. (2005): Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J Neuroendocrinol*, 17(7), 459-65
- Kalsbeek A., Palm I.F., La Fleur S.E., Sheer F.A., Perreau-Lenz S., Ruite M., Kreier F., Cailotto C., Buijs R.M. (2006): SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*, 21, 458-469
- Ko C.H., Takahashi J.S. (2006): Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 15 (2), R271-277
- Kornmann B., Schaad O., Bujard H., Takahashi J.S., Schibler U. (2007): System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, 5, e34
- Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang F.R., Loudon A.S., Reppert S.M. (2001): Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107, 855-867
- Liu C., Reppert S.M. (2000): GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25, 125-128
- Liu C., Weaver D.R., Strogatz S.H., Reppert S.M. (1997): Cellular construction of a circadian determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 91, 855-860
- Lowrey P.L., Shimomura K., Antoch M.P., Yamazaki S., Zemenides P.D., Ralph M.R., Menaker M., Takahashi J.S. (2000): Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288, 483-492

- Maronde E., Pfeffer M., Glass Y., Stehle J.H. (2007): Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res*, 43, 16-24
- Mendoza J., Graff C., Dardente H., Pevet P., Challet E. (2005): Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci*, 25 (6), 1524-1522
- Messenger S., Hazlerigg D.G., Mercer J.G., Morgan P.J. (2000): Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci*, 12, 2865-2870
- Moga M.M., Moore R.Y. (1997): Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 389, 508-534
- Moore R.Y., Lenn N.J. (1972): A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*, 146, 1-14
- Moore R.Y., Speh J.C. (1993): GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*, 150, 112-116
- Nagel R., Clijsters L., Agami R. (2009): The miRNA-192/194 cluster regulates the *Period* gene family and the circadian clock. *FEBS J*, 276, 5447-5455
- Naito E., Watanabe T., Tei H., Yoshimura T., Ebihara, S. (2008): Reorganization of the suprachiasmatic nucleus coding for day length. *J Biol Rhythms*, 23(2), 140-9
- Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi (2008): The NAD⁺ dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 134, 329-340

- Nováková M., Polidarová L., Sládek M., Sumová A. (2011): Restricted feeding affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience*, 197, 65-71
- Nuesslein-Hildesheim B., O'Brien J.A., Ebling F.J., Maywood E.S., Hastings M.H. (2000): The circadian cycle of mPer clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci*, 12(8), 2856-64
- Oishi K., Amagai N., Shirai H., Kadota K., Ohkura N., Ishida N. (2005): Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res*, 12, 191-202
- O'Neill J.S., Maywood E.S., Chesham J.E., Takahashi J.S., Hastings M.H. (2008): cAMP-dependent signalling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320(5878), 879-80
- 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 (3), 307-20
- Ralph M.R., Foster R.G., Davis F.C., Menaker M. (1990): Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-978
- Reppert S.M., Weaver D.R. (2001): Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol*, 63, 647-76
- Rollag M.D., Niswender G.D. (1976): Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lightening regimens. *Endocrinology*, 98, 482-489
- Schibler U. (2007): The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialog Clin Neurosci*, 9, 257-272

Schibler U. (2009): The 2008 Pittendrigh/Aschoff lecture: peripheral phase coordination in the mammalian circadian timing system. *J Biol Rhythms*, 24, 3-15.

Shaap J., Albus H., VanderLeest H.T., Eilers P.H., D  t  ri L., Meier L.H. (2003): Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (26), 15994-9

Shearman L.P., Zylka M.J., Weaver D.R., Kolakowski L.F. Jr, Reppert S.M. (1997): Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261-9

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 mammalian circadian clock is associated with rapid induction of mPer1 transcript. *Cell*, 91, 1043-53

Siepk   S.M., Yoo S.H., Park J., Song W., Kumar V., Hu Y., Lee C., Takahashi J.S. (2007): Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*, 129, 1011-1023

Sosniyenko S., Hut R.A., Daan S., Sumová A. (2009): Influence of photoperiod duration and light-dark transitions on entrainment of Per1 and Per2 gene and protein expression in subdivisions of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 30, 1802-1814

Sosniyenko S., Parkanová D., Illnerová H., Sládek M., Sumová A. (2010): Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, R959-971

Steinlechner S., Jacobmeier B., Scherbarth F., Dernbach H., Kruse F., Albrecht U. (2002): Robust circadian rhythmicity of per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *J Biol Rhythms*, 17(3), 202-9

- Stephan F.K., Zucker I. (1972): Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69, 1583-1586
- 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 (6884), 78-83
- Sujino M., Masumoto K.H., Yamaguchi S., van der Horst G.T., Okamura H., Inouye S.T. (2003): Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol*, 13, 664-68
- Sumová A., Bendová Z., Sládek M., Kovačiková Z., Illnerová H. (2004): Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res*, 53(1), S167-76
- Sumová A., Kováčiková Z., Illnerová H. (2007): Dynamics of the adjustment of clock gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus to an asymmetrical change from a long to a short photoperiod. *J Biol Rhythms*, 22, 259-267
- Sumová A., Jáč M., Sládek M., Sauman I., Illnerová H. (2003): Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms*, 18(2), 134-44
- Sumová A., Sládek M., Jáč M., Illnerová H. (2002): The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res*, 947(2), 260-270
- Sumová A., Trávníčková Z., Illnerová H. (1995): Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 200(3), 191-4

- Sumová A., Trávníčková Z., Mikkelsen J.D., Illnerová H. (1998): Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 801 (1-2), 254-258
- Takahashi J.S., Hong H.K., Ko C.H., Mc Dearmon E.L. (2008): The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*, 9, 764-775
- Terazono H., Mutoh T., Yamaguchi S., Kobayashi M., Akiyama M., Udo R., Ohdo S., Okamura H., Shibata S. (2003): Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6795-6800
- Torra I.P., Tsibulsky V., Delaunay F., Saladin R., Laudet V., Fruchart J.C., Kosykh V., Staels B. (2000): Circadian and glucocorticoid regulation of *Rev-erba* expression in liver. *Endocrinology*, 141, 3799-3806
- Trávníčková-Bendová Z., Cermakian N., Reppert S.M., Sassone-Corsi P. (2002): Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(11), 7728-33
- van der Horst G.T., Muijtjens M., Kobayashi K., Takano R., Kanno S., Takao M., de Wit J., Verkerk A., Eker A.P., van Leenen D., Buijs R., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., Yasui A. (1999): Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms, *Nature*, 398, 627-630
- Vujovic N., Davidson A.J., Menaker M. (2008): Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am J Physiol*, 295, R355-360
- Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M., Reppert S.M. (1995): Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4), 697-706
- Yamaguchi S., Mitsui S., Yan L., Yagita K., Miyake S., Okamura H. (2000): Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, 20(13), 4773-81

Yan L., Silver R. (2008): Day-length encoding through tonic photic effects on the retinorecipient SCN region. *Eur J Neurosci*, 28, 2108-2115

Yang X., Downes M., Yu R.T., Bookout A.L., He W., Straume M., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (2006): Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, 126, 801-810

Yoo S.H., Yamazaki S., Lowrey P.L., Shimomura K., Ko C.H., Buhr E.D., Siepkas S.M., Hong H.K., Oh W.J., Yoo O.J., Menaker M., Takahashi J.S. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillation in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5339-46

7. PŘÍLOHY: PUBLIKACE

1. Sosniyenko S. *, Parkanová D. *, Illnerová H., Sládek M., Sumová A. (2010): Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, R959-971

* Oba autoři přispěli k práci stejným dílem

2. Parkanová D., Nováková M., Sosniyenko S., Sumová A. (2012): Photoperiodic modulation of the hepatic clock by the suprachiasmatic nucleus and feeding regime in mice. *Eur J Neurosci*, přijat do tisku