

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**Vliv endotoxinu lipopolysacharidu na cirkadiánní systém
potkana**

Bc. Petra Štěřbová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Zdeňka Bendová, PhD.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne 01.05. 2015

Petra Štěrbová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za její cenné rady, odborné vedení, ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během studia.

ABSTRAKT

Biologické hodiny jsou zodpovědné za řízení cirkadiánních rytmů v řadě fyziologických a behaviorálních funkcí, včetně aktivity imunitního systému. U savců jsou tyto hodiny uloženy v suprachiasmatických jádrech hypothalamu a vyskytují se také na periférii. Hlavní oscilátor v SCN synchronizuje fáze periferních oscilátorů v tkáních a jiných částech mozku, a řídí také syntézu melatoninu v epifýze. Jeho vnitřní perioda Tau (τ) je v přirozených podmínkách synchronizována s vnějším 24hodinovým dnem, zejména střídáním světla a tmy během dne a noci, ale také nesvětelnými stimuly. Narušení přirozených vnitřních podmínek organismu podáním endotoxinu způsobuje aktivaci imunitní odpovědi, behaviorální změny a fázové změny cirkadiánních rytmů. Tato práce zkoumá vliv akutně podaného endotoxinu lipopolysacharidu na buněčné signální kaskády v buňkách suprachiasmatických jader a epifýzy. Naše výsledky ukazují, že hladiny fosforylovaných forem kináz GSK3 β , a ERK1/2, a hladiny fosforylovaných forem transkripčních faktorů STAT3 jsou po podání LPS výrazně modifikovány jak v suprachiasmatických jádrech, tak zejména v epifýze potkana.

Klíčová slova: Cirkadiánní rytmy, suprachiasmatická jádra, epifýza, lipopolysacharid

ABSTRACT

The biological clock are responsible for entraining of circadian rhythms in many physiological and behavioral functions, including the activity of immune system. In mammals, the biological clock are located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and also on the periphery. The main oscillator in suprachiasmatic nuclei synchronizes the phases of the peripheral oscillators in tissues and the other brain areas and it also drives synthesis of melatonin in the pineal gland. Its endogenous period Tau (τ) is being synchronized with external 24-hour day under normal conditions, mostly by the light-dark cycles during the day and night and also by non-photic stimuli. By the application of endotoxin, disruption of normal endogenous conditions in organism causes activation of the immune response, behavioral changes and phase shifts of the circadian rhythmicity. This work examines effect of acute application endotoxin lipopolysacharid on the cellular signaling cascades in the cells of suprachiasmatic nuclei and pineal gland. Our data indicate, that levels of phosphorylated forms of kinases GSK3 β , ERK1/2 and levels of phosphorylated forms transcription factors STAT3 are substantially modified after administration of lipopolysacharid in the suprachiasmatic nuclei and especially in the pineal gland of the rat.

Key words: circadian rhythms, suprachiasmatic nuclei, pineal gland, lipopolysacharid

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam použitých zkratk | 8 |
| 1 Úvod | 10 |
| 2 Literární přehled | 11 |
| 2.1 Biologické rytmy | 11 |
| 2.1.1 Cirkadiánní rytmy | 11 |
| 2.2 Cirkadiánní systém savců | 12 |
| 2.2.1 Centrální oscilátor | 12 |
| 2.2.2 Periferní oscilátory | 13 |
| 2.2.2.1 Epifýza | 14 |
| 2.2.2.2 Melatonin | 15 |
| 2.3 Molekulární podstata cirkadiánního systému | 17 |
| 2.4 Synchronizace cirkadiánního systému | 19 |
| 2.5 Imunitní systém | 21 |
| 2.5.1 Neadaptivní imunita | 21 |
| 2.5.1.1 Toll-like receptory | 22 |
| 2.5.2 Adaptivní imunita | 24 |
| 2.6 Lipopolysacharid | 25 |
| 2.6.1 Interakce cirkadiánního a imunitního systému | 26 |
| 2.6.2 Kinázy ERK1/2, GSK3 β a transkripční faktory STAT3 | 28 |
| 2.6.2.1 pERK1/2 | 28 |
| 2.6.2.2 pGSK3 β | 29 |
| 2.6.2.3 pSTAT3 | 30 |
| 3 Cíle práce | 32 |
| 4 Materiál a metody | 33 |
| 4.1 Experimentální zvířata | 33 |
| 4.2 Experimentální paradigma | 33 |
| 4.2.1 Experiment 1: Vliv akutního podání LPS na hladiny cytokinů interleukinu 6 a TNF α v krvi potkana. | 34 |
| 4.2.2 Experiment 2: Vliv akutního podání LPS na expresi fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v epifýze potkana. | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.3 Experiment 3: Vliv akutního podání LPS na expresi fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v SCN potkana. | 35 |
| 4.3 Řešení experimentů | 36 |
| 4.3.1 Postup stanovení hladiny interleukinu 6 a tumor nekrosis faktoru α pomocí metody Elisa v krvi potkana | 36 |
| 4.3.1.1 Materiál a vybavení | 36 |
| 4.3.1.2 Postup metody Elisa | 37 |
| 4.3.2 Postup stanovení exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT pomocí metody Imunohistochemie v SCN a epifýze potkana | 38 |
| 4.3.2.1 Materiál a vybavení | 38 |
| 4.3.2.2 Postup metody Imunohistochemie | 40 |
| 5 Výsledky | 44 |
| 5.1 Stanovení hladiny interleukinu 6 a tumor nekrosis faktoru α pomocí metody Elisa v krvi potkana | 44 |
| 5.2 Stanovení exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 pomocí metody Imunohistochemie v epifýze potkana. | 46 |
| 5.3 Stanovení exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů pSTAT3 pomocí metody Imunohistochemie v SCN potkana. | 51 |
| 6 Diskuze | 57 |
| 6.1 Vliv akutního podání LPS na hladiny cytokinů IL-6 a TNF α v krvi potkana | 57 |
| 6.2 Vliv akutního podání LPS na hladiny fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v epifýze potkana | 58 |
| 6.3 Vliv akutního podání LPS na hladiny fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v SCN potkana | 60 |
| 7 Závěr | 64 |
| 8 Seznam použité literatury | 65 |

Seznam použitých zkratek

1°Ab - primární protilátka
2°Ab - sekundární protilátka
AA-NAT - arylkylamin-N-acetyltransferáza
APC - antigen prezentující buňky (antigen-presenting cells)
ASMT - acetylserotonin-methyltransferáza
AVČR - Akademie věd České Republiky
AVP - arginin-vasopressin
BCR - receptor B-lymfocytů
BMAL1 - z angl. brain and muscle Arnt like protein-1
cAMP - cyklický adenosinmonofosfát
CBP - z angl. CREB-binding protein
CKI ϵ - kasein-kináza 1 ϵ
CLOCK - z angl. circadian locomotor output cycles kaput
CNS - centrální nervový systém
CRE - z angl. cAMP responsive element
CREB - z angl. calcium/cAMP responsive element binding protein
Cry - z angl. cryptochrome
DAB - diaminobenzidin
ELISA - z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
dmSCN - dorzomediální suprachiasmatické jádro
ERK 1/2 - extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (extr. signal-regulated kinase 1/2)
G-CSF - z angl. granulocyte colony-stimulating factor
GCS - ganglion cervicali superior
GHT - genikulohypotalamický trakt
GM-CSF - z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR - z angl. G protein-coupled receptor
GRP - gastrin-releasing peptid
GSK3 β - glykogen syntáza kináza 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta)
HEB - hematoencefalická bariéra
ICER - indukovatelný cAMP časný represor
IGL - intergenikulární lístek
I κ B - kináza I-kappa B
IL - interleukin
IFN - interferon
ipRGCs - z angl. intrinsically photoresponsive retinal ganglion cells
IRF3 - regulační faktor pro interferon 3 (interferon regulatory factor 3)
LD - light-dark (režim světlo-tma)
LPS - lipopolysacharid
Mal - MyD88 adaptor like protein

MHC - hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MyD88 - Myeloid differentiation primary response protein 88
mRNA - messenger RNA
NAS - N-acetylserotonin
NF- κ B - jaderný faktor kappa B (nuclear faktor kappa B)
NGS - normal goat serum
NE - noradrenalin
NOD - nucleotid-vázající oligomerizační doména
p90RSK - p90 ribosomální s6 kináza
PAC1 - hypofyzární adenylátcyklázu aktivující peptidový receptor typu 1
PACAP - hypofyzární adenylátcykl. akt. peptid (pituitary adenylate cyclase-activating peptide)
PAMPs - mol. struktury asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PBS - fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
Per - z angl. period
PFA - paraformaldehyd
PKC - proteinkináza C
PRC - fázově responsní křivka (phase response curve)
PRR - patogeny rozpoznávající receptory (pathogen recognition receptors)
PVN - paraventrikulární jádro
RHT - retinohypotalamický trakt
RoR α - z angl. retinoic acid-related orphan receptor α
RTK - receptory s vnitřní tyrosin kinázovou aktivitou
SARM - z angl. sterile α and Heat-armorillo motifs
SCN - suprachiasmatická jádra (suprachiasmatic nuclei)
SOCS - supresory cytokinové signalizace
SRE - sérum responsní element
STAT3 - signální transduktory a aktivátory transkripce 3 (signal transd. and activ. of transcr.)
 τ - engogenní perioda Tau
Tc- cytotoxický T-lymfocyt
TCR - receptor T-lymfocytů
Th- pomocný T-lymfocyt
TIRAP/Mal TIRAP - z angl. Toll/interleukin-1 domain-containing adaptor protein
TLR 4 - toll-like receptor 4
TRAM - z angl. TRIF-related adaptor molecule
TRIF - z angl. TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β
TNF α - tumor nekrosis faktor α
VIP - vasoaktivní intestinální peptid (vasoactive intestinal peptide)
VPAC2 - vasoaktivní intestinální peptidový receptor typu 2
vlSCN - ventrolaterální suprachiasmatické jádro
ZT - z angl. zeitgeber time; experimentální čas

1 Úvod

Životní podmínky ve vnějším prostředí jsou velmi nestálé a rytmicky se mění v důsledku otáčení Země kolem vlastní osy. V organismech probíhají mnohé fyziologické a behaviorální procesy s periodickým opakováním, které se v průběhu evoluce vyvinulo jako biologická adaptace na proměnlivé abiotické faktory. Cirkadiánní rytmy, endogenní rytmické oscilace s přibližně 24 hodinovou periodou, jsou řízeny komplexním cirkadiánním systémem, který se u savců skládá z hlavního oscilátoru, sídlícího v suprachiasmatických jádrech (SCN, z angl. suprachiasmatic nuclei) hypothalamu a mnoha vedlejších, periferních oscilátorů. Molekulární podstatou cirkadiánních rytmů jsou transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky složené ze sady hodinových genů a jejich produktů. Hlavní oscilátor je citlivý k synchronizátorům z vnějšího prostředí tzv. „Zeitgeberům“, které modulují jeho funkci. V přirozených podmínkách je dominantním synchronizátorem světlo, přesněji střídání světlé a tmavé části dne během dne a noci, které synchronizuje vnitřní cirkadiánní periodu s 24 hodinovým solárním dnem. Informace o světle přichází z retiny a prochází přímým retinohypotalamickým traktem (RHT) do světloreceptivní části SCN, kde dochází prostřednictvím glutamátových receptorů k aktivaci buněčné signalizační kaskády, což vede v konečném důsledku k posunům fáze cirkadiánních rytmů. Kromě světla působí na cirkadiánní systém také nesvětelné stimuly jako například behaviorální vlivy, alkohol, farmaka či drogy, které taktéž modulují cirkadiánní rytmy. Nevhodným působením světla či nesvětelných stimulů může docházet k narušení fáze rytmů a k jejich negativnímu působení na cirkadiánní systém. Narušení cirkadiánního systému provází celá řada chorob a onemocnění, včetně rakoviny, diabetu, kardiovaskulárních poruch a oslabení imunity.

2 Literární přehled

2.1 BIOLOGICKÉ RYTMY

Většina biologických dějů, probíhajících v organismech, se opakuje v různě dlouhých časových intervalech. Tento interval neboli perioda může být velmi rozdílný, existují rytmy s délkou několika málo milisekund, rytmy cirkadiánní s přibližnou periodou 24 hodin a také mnohem delší rytmy, ovlivňované sezónními změnami klimatu, s délkou periody zhruba rok. Biologické rytmy se kromě délky periody liší také původem; exogenní rytmy jsou odrazem změn v prostředí, zatímco rytmy endogenní vyplývají z vnitřních procesů v organismu, a mají genetický základ.

V důsledku otáčení Země kolem vlastní osy dochází na planetě ke střídání světlé a tmavé části dne. Evoluční odpovědí na tuto skutečnost byl vznik cirkadiánních rytmů, jež se vyvinuly jako adaptace na cyklické změny světla v prostředí. Řízení cirkadiánních rytmů zajišťují biologické hodiny, které regulují životní funkce nejen u savců a člověka, ale také u bezobratlých, rostlin a prokaryot. Podle exogenních faktorů seřizují endogenní cykly organismu, čímž mu pomáhají připravit se a koordinovat své životní strategie v neustále se měnících podmínkách okolního prostředí. Mezi cirkadiánní rytmy patří zejména rytmus spánku a bdění, pohybové aktivity, tělesné teploty, tvorby a uvolňování hormonů, aktivity enzymů a spínání a vypínání určitých sad genů (Foster et Kreitzman, 2004).

2.1.1 CIRKADIÁNNÍ RYTMY

Cirkadiánní rytmy savců jsou endogenní povahy. Mají geneticky danou periodu Tau (τ), jejíž délka se pohybuje v rozmezí 20-28 hodin (z toho název „cirkadiánní“). Její přesná délka se u jednotlivých druhů specificky liší. Průměrná délka τ se u člověka podobně jako u potkana pohybuje okolo 24,2 hodin (Dunlap et al., 2004). V prostředí periodickém, např. při pravidelném střídání světla a tmy během dne a noci, se cirkadiánní systém přizpůsobuje okolnímu prostředí a jeho perioda τ se rovná 24 hodinám. V neperiodickém prostředí např. za stálé tmy, běží cirkadiánní rytmy podle periody τ volně v čase. Cirkadiánní systém je tedy

citlivý k synchronizátorům (tzv. Zeitgeberům) z vnějšího prostředí, které fungují jako udavatelé času (Golombek et Rosenstein, 2010). Synchronizátory vyvolávají fázové posuny endogenních cirkadiánních rytmů a tím přizpůsobují délku jejich periody periodě vnějšího prostředí. Cirkadiánní rytmicitu můžeme pozorovat na několika různých úrovních, vyskytuje se v jednotlivých buňkách, ale i v celých systémech z buněk složených, tedy v tkáních, orgánech a organismu samotném.

2.2 CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM SAVCŮ

Cirkadiánní systém savců se skládá z jednoho hlavního oscilátoru, umístěného v SCN hypothalamu a mnoha periferních oscilátorů, umístěných v dalších oblastech mozku a v periferních orgánech. Hlavní oscilátor stojí na vrcholku hierarchie, řídí behaviorální a neurohumorální rytmy a synchronizuje funkce periferních oscilátorů (Herzog et al., 2004).

2.2.1 CENTRÁLNÍ OSCILÁTOR

Hlavním pacemakerem, který řídí cirkadiánní rytmy u savců a generuje oscilace, byla stanovena párová struktura SCN. Tato funkce SCN byla postulována na základě série pokusů na hlodavcích (Stephan et Zucker, 1972; Lehman et al., 1987; Inouye et Kawamura, 1979), kterým se lézí SCN zcela zrušila jejich cirkadiánní rytmicitu měřená rytmem v pohybové aktivitě. Transplantace SCN takto poškozenému zvířeti cirkadiánní rytmicitu obnovila a cirkadiánní rytmus hostitele pak nově běžel s periodou dárce (Ralph et al., 1990).

SCN se nacházejí v anteroventrální části hypothalamu, těsně nad křížením optických nervů. Jelikož optické nervy vedou informaci o světle a světlo je hlavním exogenním synchronátorem, umístění SCN právě zde usnadňuje přenos světelných signalů z retiny. Obě jádra jsou složená asi z 10 000 autonomních buněk, z nichž každá dokáže generovat rytmy sama o sobě (Abrahamson et Moore et, 2001). Jednotlivé neurony řízeně exprimují hodinové geny a to i v konstantních podmínkách (Liu et al., 2007). Teprve mnohočetné propojení těchto individuálních neuronů v síť je nezbytným předpokladem k vytvoření cirkadiánního rytmu celého SCN, který je pak přenášen k orgánům celého těla (Mohawk et al., 2012). Poškození SCN či narušení integrity rytmů jednotlivých neuronů (způsobené např. mutacemi

hodinových genů, stárnutím, nebo působením světla během noci) může být příčinou závažných patologických změn v organismu (Penev et al., 1998; Okada et al., 2008; Karatsoreos et al., 2012).

Neurony SCN jsou heterogenní, liší se velikostí, tvarem, funkcí, aferentními i eferentními spoji či neuropeptidy (Abrahamson et Moore, 2001; Yan et al., 2008). Kromě neuronů se v SCN nacházejí také gliové buňky, především astrocyty (Prolo et al., 2005). Navzájem komunikují a podporují funkci hlavního oscilátoru. Funkčně a morfologicky je SCN rozděleno na dvě podoblasti, slupku a jádro. Dorzomediální (dmSCN) slupka a ventrolaterální (vlSCN) jádro zastávají odlišné funkce. vlSCN je umístěno nad optickým chiasmem a je retinorecipientní, to znamená že přijímá světelné informace posílané RHT ze sítnice. vlSCN přijímá signály také nepřímou drahou, tzv. genikulohypothalamickým traktem (GHT) z intergenikulárního lístku (IGL) thalamu. Tato nepřímá dráha vede informace o integrovaných světelných a nesvětelných stimulech a reguluje funkci SCN zejména prostřednictvím neurotransmiteru neuropeptidu Y (Challet et al. 1998). vlSCN je charakterizováno neurony, které syntetizují vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP) a gastrin-releasing peptid (GRP). DmSCN nepřijímá přímo informaci o světle, je zodpovědné zejména za udržování endogenních oscilací a organizaci výstupních signálů do dalších oblastí mozku a periferních orgánů (Leak et Moore 2001). Obsahuje neurony syntetizující arginin-vasopresin (AVP) a calretinin (Golombek et Rosenstein, 2010).

2.2.2 PERIFERNÍ OSCILÁTORY

Centrální biologické hodiny v SCN hypothalamu synchronizují všechny rytmické děje probíhající v našem těle. Ty jsou řízeny tzv. suboscilátory, které řídí rytmické procesy v plicích, srdci, ledvinách, játrech i ostatních orgánech a ovlivňují expresi genů nutných pro jejich funkci (Sakamoto et al., 1998). Od centrálního oscilátoru v SCN se liší tím, že nezbytně potřebují signály z vnějšího prostředí k udržení svých oscilací. Tyto signály jim poskytuje právě hlavní pacemaker v SCN, mohou však být synchronizované i signály typickými pro jejich fyziologické funkce (Damiola et al., 2000). Např. oscilátor v játrech může být synchronizován řízeným příjmem potravy (Lamia et al., 2008). Výstupní signály z SCN jsou přenášeny buďto neuronálními, nebo humorálními drahami a zásadně ovlivňují spánek,

příjem potravy, pozornost, učení, paměť a další kognitivní funkce (Kalsbeek et al., 2006). Nejdůležitějším humorálním výstupem z SCN je melatonin syntetizovaný epifýzou.

2.2.2.1 EPIFÝZA

Pineální žláza neboli epifýza je drobná, nepárová, endokrinní žláza v mozku, podílející se na sekreci hormonů, tvorbě biorytmů, funkci pohlavních žláz a imunitního systému. Nachází se na hranici mezi mesencephalonem a diencephalonem, tvoří převážnou část struktury diencephalonu zvanou epithalamus (Møller et Baeres, 2002). Má kulovitý tvar a její parenchym je tvořen pinealocyty, které slouží k produkci hormonů a intersticiálními (podpůrnými) gliovými buňkami. Parenchymatické buňky pineální žlázy místy oddělují kapiláry a v poměrně velkých perivaskulárních prostorech se nacházejí fagocytující buňky, které se účastní důležitých imunologických dějů. Mimo jiné slouží jako antigen prezentující buňky (APC, z angl. antigen presenting cells), díky svým imunoreaktivním vlastnostem exprimují hlavní histokompatibilní komplex glykoproteiny II. třídy (MHC, z ang. major histocompatibility complex) (Pedersen et al. 1993; Sato et al. 1996).

Vnitřní prostředí mozku je od vnějšího odděleno hematoencefalickou bariérou (HEB), která má za úkol kontrolovat transport látek mezi mozkiem a krví. HEB je tvořena z krevní strany souvislou vrstvou endotelových kapilár, které obsahují velmi těsné spoje a bazální laminou, ke které se z mozkové strany připojují výběžky astrocytů a mikroglíí. HEB tedy významně omezuje průchod látek do mozku a astrocyty navíc vylučují regulační signální proteiny. V epifýze se však těsná vrstva HEB chybí a je namísto toho přítomna vrstva endotelu s fenestrovanými kapilárami, které mají ve stěnách řadu otvorů a umožňují tak téměř volný průchod látek mezi tkání a krví.

U nižších živočichů může mít epifýza zachovanou fotosenzitivní funkci a může přímo transdukovat informace o světle (Korf et al., 1992). U vyšších živočichů a člověka se specializovala převážně na neuroendokrinní funkce. U všech savců je nejdůležitější funkcí epifýzy tvorba hormonu melatoninu (Lerner et al. 1959; Ganguly et al. 2002; Stehle et al. 2002).

2.2.2.2 MELATONIN

Melatonin je hormon syntetizovaný epifýzou na základě signalů z SCN. Z chemického hlediska je melatonin N-acetyl-5 methoxytryptamin, vzniká z esenciální aminokyseliny tryptofanu. Tryptofan je hydroxylací a následnou dekarboxylací přeměněn na serotonin (5-hydroxytryptamin), který je konvertován enzymem arylkylamin-N-acetyltransferázou (AA-NAT) na N-acetylserotonin (NAS) a ten je poté enzymem acetylserotonin-methyltransferázou (ASMT) přeměněn na melatonin (Simmonneaux et Ribelayga, 2003). Syntéza melatoninu je řízena přímou multisynaptickou dráhou z SCN. Dráha spojující SCN s epifýzou začíná v dmSCN, odkud vedou eferentní vlákna do paraventriculárního jádra (PVN) hypothalamu a dále přes fasciculus medialis prosencefali a hrudní míchu do ganglion cervicali superior (GCS) (Swanson et al., 1980). Z GCS vycházejí sympatická nervová vlákna, která inervují epifýzu (Klein et al., 1991). V noci je ze sympatických nervových zakončení v epifýze uvolňován noradrenalin (NE), který aktivuje β -adrenergní receptory na pinealocytech (Brownstein et al., 1974). Stimulace těchto receptorů vede k aktivaci adenylátcyklázy, zvýšení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v pinealocytech má za následek aktivaci proteinkinázy A (PKA). Dochází k fosforylaci CRE vazebné sekvence pro protein CREB (Roseboom et Klein, 1995; Maronde et al., 1997). Fosforylovaný CREB se váže na CRE sekvenci v promotoru genu *aanat* (Baller et al. 1997) a iniciuje transkripci, poté vzniká protein AA-NAT (Klein et al., 1997). AA-NAT je limitujícím enzymem při syntéze epifyzálního hormonu melatoninu a CRE reguluje expresi AA-NAT (Klein et al., 1991; Rosenboom et al., 1996; Baler et al., 1997; Ganguly et al., 2001). Syntetizovaný melatonin se uvolňuje přímo do krve a váže se na své receptory v mnoha orgánech a mozkových strukturách (Klein et al., 1991; Pevet et. Challet, 2011). Produkce melatoninu je okamžitě blokována světlem v noci, ale i řadou látek, především chemickými léčivy, ale také betablokátory, kofeinem, kortikosteroidy, tabákem a dalšími (Lewy et al., 2006). Degradace melatoninu probíhá převážně v játrech, v minimálním množství se nezměněn vylučuje také v moči (Claustrat et al., 2005).

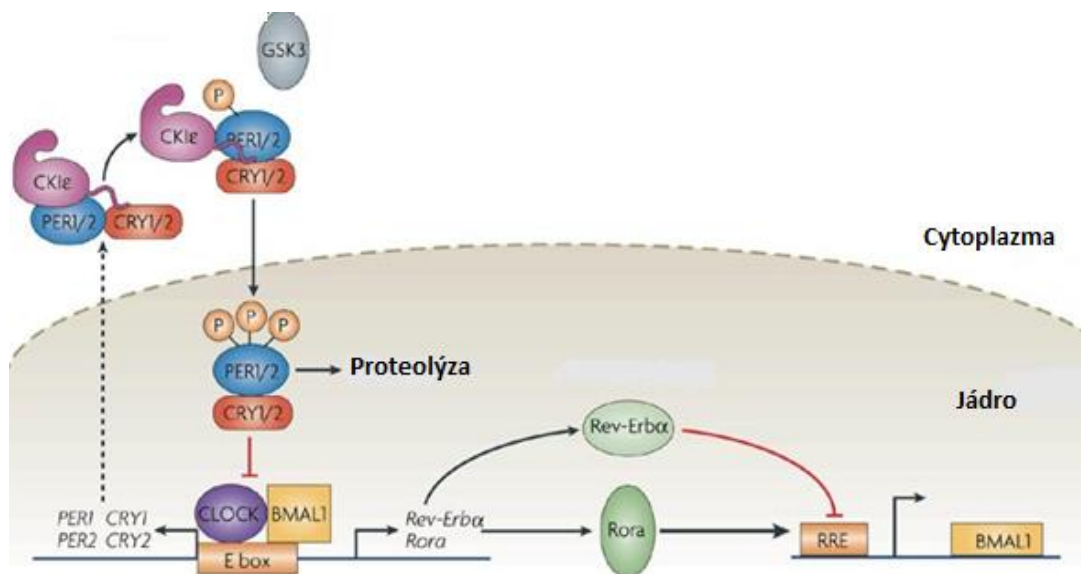
Hladina melatoninu je tedy závislá na střídání světla a tmy. K jeho produkci a uvolňování dochází pouze v noci, nezávisle na tom, v jaké části dne je živočich běžně aktivní. Množství uvolněného melatoninu je přímo úměrné délce noci, melatonin tedy přenáší informaci nejen o denní době, ale také o celkové délce dne, která se liší v jednotlivých částech roku a je

součástí řízení denních i ročních savčích rytmů (Schulz et Steimer, 2009). Rytmus v sekreci melatoninu jsou robustní a poskytují dobře hodnotitelné informace o fázi rytmu a o celkovém fungování biologických hodin, čehož se hojně využívá při klinických výzkumech (Arendt et al., 2005). Funkce melatoninu jsou zprostředkovány melatoninovými receptory, které se nacházejí hojně v SCN a oblasti mozku zvané pars tuberalis, ale i v mnoha orgánech na periférii, např. ve slezině, ledvinách a cévách (Masson-Pevet et al., 1994). Melatoninové receptory se nacházejí také v retině, kde se rovněž melatonin tvoří (Meyer et al., 2002; Baba et al., 2009). V SCN se volně cirkulující melatonin může vázat na melatoninové receptory a ovlivňovat cirkadiánní regulaci (Schromerus et Korf, 2005). Melatonin má také velmi silné antioxidační účinky, snižuje riziko vzniku mnoha chorob, mimo jiné artritidy, rakoviny, kardiovaskulárních chorob, cukrovky, snižuje hladinu cholesterolu a krevního tlaku, zlepšuje kvalitu spánku a zpomaluje stárnutí (Karlson et al. 2003; Shernhammer et al. 2006; Dochi et al. 2009; Reiter et al. 2010a). Se zvyšujícím se věkem klesá amplituda melatoninového rytmu, což přispívá k nespavosti a depresi u starých lidí (Iguchi et al., 1982). Má také četné imunologické funkce, které jsou popsány dále v textu.

2.3 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

V současnosti známe již mnoho skutečností o obecných principech fungování biologických hodin, o jejich vlastnostech a synchronizaci. Vlastní podstata cirkadiánních oscilací, probíhající na molekulární úrovni, však dosud tolik probádaná není a proto se jí zejména v posledním desetiletí věnuje stále více pozornosti.

Uvnitř každé buňky centrálního či periferního oscilátoru existuje jednotný molekulární mechanismus, který zajišťuje genovou expresi různých hodinových genů, klíčových pro vznik a udržení oscilací (Nagoshi et al., 2004). Oscilace v buňkách jsou zajištěny periodickým spínáním a vypínáním sady hodinových genů. Mezi hlavní hodinové geny savců patří *Clock* (Circadian locomotor output cycles kaput), *Bmal1* (Brain and muscle Arnt-like protein 1), *Per1*, *Per2* (Period), *Cry1*, *Cry2* (Cryptochrome), *CK1ε* (Casein kinaza 1 epsilon), *Rev-erb α* (Retinoic acid-related orphan receptor alfa) a *Rora* (Reppert et Weaver, 2001).



Obr.1: Zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka (upraveno z Gallego et Virshup, 2007).

Transkripční faktory a proteinové produkty těchto genů tvoří vzájemně propojené zpětnovazebné smyčky, které zajišťují transkripci a translaci hodinových genů (Shearman et al., 2000). Autoregulační transkripčně-translační smyčky obsahují pozitivní část, tzv.

transkripční aktivátory BMAL1 a CLOCK a RORA a část negativní, složenou z transkripčních represorů CRY1, CRY2, PER1, PER2 a REV-ERB alfa.

Princip zpětnovazebných smyček spočívá v tom, že pozitivní elementy aktivují expresi negativních elementů, které následně tlumí aktivitu pozitivních částí smyčky. U savců pohání biologické hodiny dvě hlavní autoregulační zpětnovazebné smyčky. V první z nich spolu transkripční aktivátory BMAL1 a CLOCK tvoří na začátku dne heterodimer CLOCK/BMAL1, který přechází do jádra, kde je navázán svou doménou na aktivační komplex E-box na promotorech hodinových genů *Per* a *Cry*, čímž dochází k aktivaci jejich exprese. V důsledku toho vznikají v cytoplasmě proteiny PER a CRY. Hladiny proteinů PER a CRY se v cytoplasmě během dne zvyšují a jakmile dosáhnou dostatečně vysoké koncentrace, vytáří komplexy, které večer vstupují do jádra, kde se váží na heterodimer CLOCK/BMAL1, čímž blokují jeho schopnost aktivovat transkripci genů *Per* a *Cry* a působí tedy jako negativní element zpětnovazebné smyčky (Ko et Takahashi, 2006). V druhé smyčce se tentýž heterodimer CLOCK/BMAL1 váže v jádře na E-boxy promotorů genů *Rev-erba* a *Rora*, aktivuje jejich transkripci a vznikuvší proteiny kompetují o vazbu na sekvenci RORE na promotoru *Bmal1*, přičemž proteinový produkt ROR α aktivuje transkripci genu *Bmal1* a REV-ERB α naopak vazbou na promotor *Bmal1* jeho transkripci inhibuje (Guillaumond et al., 2005). V důsledku transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček jsou geny *Per* a *Cry* přepisovány hlavně ve dne, *Bmal1* v noci a hladina transkriptu genu *Clock* je během dne konstantní. Tento cyklus vytváří cirkadiánní oscilace s přibližně 24 hodinovou periodou, která je dále stabilizována posttranslačními modifikacemi proteinů hodinových genů a jejich řízenou degradací. Stabilita proteinů je nejčastěji regulována fosforylací či defosforylací daného proteinu. Proteiny PER a CRY v cytoplasmě jsou posttranslačně modifikovány kasein kinázou 1 epsilon (CK1 ϵ), která řídí jejich degradaci, a kinázou GSK3 β , která v noci fosforyluje hodinový protein PER2 a umožňuje tím jeho vstup do jádra (Eide et al., 2005). Degradace v cytoplasmě odblokuje represi komplexu CLOCK/BMAL1 a cyklus začíná znovu (Gallego et Virshup, 2007). Je-li kasein kináza CK1 ϵ mutována, dochází ke změnám v délce cirkadiánní periody (Lowrey et al., 2000). CRY proteiny jsou také fosforylovány CK1 ϵ a CK1 δ , navíc jsou ještě regulovány proteinem Fbx13, který je součástí savčího degradačního ubiquitin-ligazového komplexu (Gatfield et Schibler, 2007).

K dokonalé rovnováze celého systému je zapotřebí synchronizovat jednotlivé oscilátory vzájemně mezi sebou a současně také s vnějším 24 hodinovým dnem (Balsalobre et al., 2002). Nejsilnějším z exogenních faktorů, působícím na cirkadiánní systém je světlo. Světlo nastavuje fázi centrálních hodin, které tuto informaci šíří dále na periférii. Informace o světle přichází z retiny a putuje přímou monosynaptickou dráhou do vlSCN. Výstupní signál je nervově či humorálně přenášen na periferní členy cirkadiánního systému (Leak et Moore, 2001). Kromě světla působí na SCN také mnohé nesvětelné stimuly, např. složky aktivovaného imunitního systému (Dibner et al., 2010).

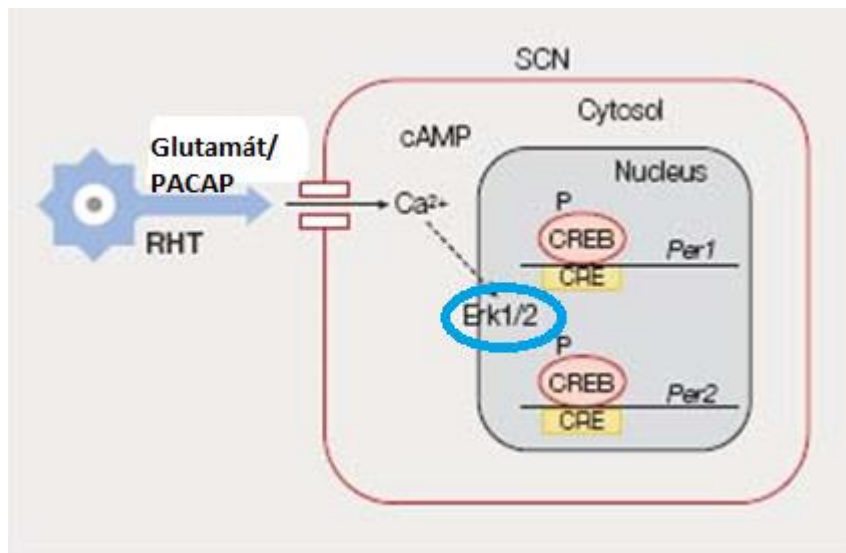
2.4 SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Vnitřní perioda biologických hodin τ je synchronizována s rytmy vnějšího prostředí na základě fázových posunů endogenních rytmů, způsobených urychlením či zpomalením exprese hodinových genů v molekulárním mechanismu hodin.

Synchronizátory působící na cirkadiánní systém mohou být světelné i nesvětelné. Nejsilnějším z nich je střídání světla a tmy během dne a noci. Za normálních podmínek jsou biologické hodiny seřizovány světlem každý den, přičemž k seřizování hodin dochází pouze v noci. Osvětlení v této fázi dne vyvolá v závislosti na době vystavení světlu předběhnutí či zpoždění fáze cirkadiánního rytmu. Působení světla v první polovině noci vede ke zpoždění rytmu, osvětlení v druhé půlce noci a nad ránem způsobuje fázové předběhnutí rytmu biologických hodin (Golombek et Rosenstein, 2010). Grafickým vyjádřením fázového posunu cirkadiánních rytmů je tzv. fázově responsní křivka (PRC).

Světlo působí na cirkadiánní systém přímo, skrze retinohypothalamický trakt. RTH je tvořen zejména axony gangliových buněk sítnice označovaných jako ipRGCs (intrinsically photoresponsive retinal ganglion cells), které obsahují fotopigment melanopsin a jsou tedy schopné transdukovat informaci o světle do elektrického signálu bez účasti klasických fotoreceptorů (Hannibal et Fahrenkrug, 2002; Golombek et Rosenstein, 2010).

RHT je glutamátergní, po aktivaci světlem vylučuje na synapsi s neurony SCN glutamát a hypofyzární adenylátcyklázu aktivující neuropeptid (PACAP, z angl. pituitary adenylate cyclase-activating peptide). Dochází k aktivaci glutamátových receptorů a PAC1 (hypofyzární adenylátcyklázu aktivující peptidový receptor typu 1) a VPAC2 (vasoaktivní intestinální peptidový receptor) receptorů v SCN a ke zvýšení intracelulární hladiny vápníku (Ca^{2+}), což vede ke spuštění buněčné signalizační kaskády, ústící ve fázové posuny vnitřní periody a celého cirkadiálního systému. Hlavním členem buněčné signalizační kaskády je kináza ERK1/2, která v jádře indukuje fosforylaci transkripčního faktoru CREB (calcium/cAMP response element binding protein). Fosforylovaný CREB váže protein CBP (CREB-binding protein), nasedají na CRE (cAMP response element) vazebné místo v promotorové oblasti genů *Per1* a *Per2* a aktivují jejich transkripci (Trávníčková-Bendová et al., 2002); (obr. 2).

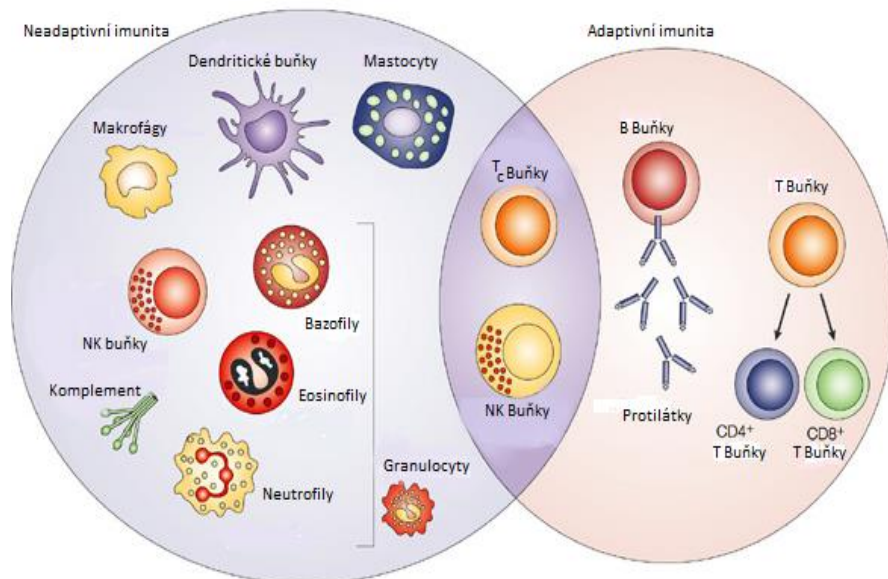


Obr. 2: Dráha světelné signalizace (upraveno z Tardito et al., 2010).

Na cirkadiální systém působí kromě světla řada dalších Zeitgeberů. Mezi přirozené nesvětelné synchronizátory patří dostupnost potravy, vynucená pohybová aktivita, sociální vlivy, stres a mateřské stimuly. Také podávání farmak či hormonů může narušit fázi i amplitudu cirkadiálního rytmu (Challet et Pevet, 2003). Cirkadiální systém je ale k nesvětelným synchronizátorům citlivý zejména v denní fázi dne a reaguje na ně především fázovým předběhnutím (Kosobud et al., 2007; Bilu et Kronfeld-Schor, 2013; Pandi-Perumal et al., 2008). Nesvětelné stimuly mohou modulovat fázové posuny vyvolané světlem a opačně (Biello et al., 1997).

2.5 IMUNITNÍ SYSTÉM

Všechny organismy jsou neustále vystavovány patogenům, bakteriím, virům a jiným potencionálně škodlivým vlivům z okolního prostředí. Také jednotlivé buňky těla, které jsou vlivem mutace nebo infekce fatálně pozměněny mohou způsobovat v organismu velké škody, proto je nutné všechny takové buňky včas rozpoznat a eliminovat. K tomuto účelu slouží imunitní systém, který se významně podílí na zachování homeostázy celého živého systému. Imunitní reakce organismu jsou buď vrozené (neadaptivní), nebo získané (adaptivní). Imunitní systém je tvořen lymfatickými orgány produkujícími bílé krevní buňky neboli leukocyty, jež vznikají z totožné kmenové buňky a jsou základem všech imunitních reakcí.



Obr. 3: Buňky imunitního systému (upraveno z Dranoff, 2004).

2.5.1 NEADAPTIVNÍ IMUNITA

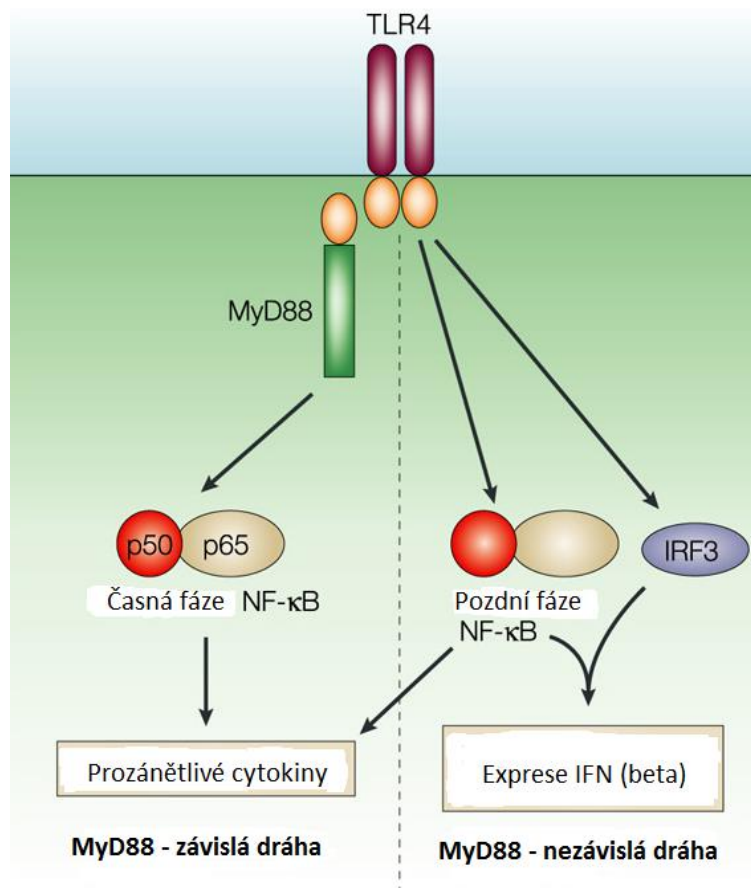
Neadaptivní imunita je vrozená schopnost organismu reagovat na cizorodé látky. Rozpoznává převážně ty, které jsou společné mnoha patogenům a reaguje na ně vždy stejným způsobem. Představuje první obranou linii v boji s patogeny (Hoffmann et al., 1999). Patří k ní fyzické bariéry savčího těla, jako je například epitelová vrstva kůže, dále komplementový systém sérových a membránových proteinů a nespécifické obranné buňky,

kteře produkují cytokiny. Nejdůležitějším nástrojem neadaptivní imunity jsou fagocytující buňky. Mezi hlavní buňky neadaptivní imunity patří mastocyty, makrofágy, dendritické buňky, eosinofily, neutrofilny a také přirození zabíječi neboli NK buňky (natural killer) (Medzhitov et Janeway, 1997). K aktivaci těchto buněk dochází vznikem zánětu při infikování patogenními mikroby (Janeway et Medzhitov, 2002). Zánětlivá reakce je důležitým nespecifickým obranným mechanismem vrozené imunity, zahrnuje několik důležitých kroků. Buňky poškozené tkáň v okolí zánětu uvolňují chemické mediátory (hlavně histamin a prostaglandiny), dojde k dilataci krevní cévy a tím zvýšení její permeability. Na místo infekce jsou z krevní cévy za pomoci chemokinů přitahovány granulocyty, které jsou v dalším průběhu reakce nahrazeny makrofágy. Na povrchu buněk imunitního systému, zejména makrofágů a dendritických buněk jsou exprimovány tzv. pattern recognition receptors (PRR) (Medzhitov et al. 2001), což jsou speciální receptory, které slouží k rozeznávání patogeních molekulárních struktur tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), nacházejících se na povrchu mikroorganismů. Mezi hlavní PRR receptory patří toll-like receptory (TLR) a NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) obsahující proteiny (Eckmann et al., 2006). Savčí TLR receptory (označovány jako TLR4) po aktivaci indukují expresi genů účastnících se zánětlivé reakce (Medzhitov et al., 1997).

2.5.1.1 TOLL-LIKE 4 RECEPTORY

TLR4 receptory jsou exprimovány v řadě buněk, zejména na monocytech periferní krve, granulocytech a nezralých dendritických buňkách. Rozeznávají struktury bakteriálního LPS (O'Neill et Bowie, 2007) a současně slouží jako signální molekuly, zapojené do mechanismů rozvoje přirozené imunity a vzniku zánětu. TLR4 obsahují 2 domény; intracelulární Toll/IL-1 receptor (TIR) doménu a extracelulární doménu, na kterou se váže ligand (Saitoh et al. 2004). Kromě ligandů vážících se na extracelulární doménu ovlivňují TLR4 také pomocné molekuly. TLR4 se váže s myeloidním diferenciacním proteinem 2 (MD-2) a spolu s pomocnou molekulou CD14 a vytváří komplex, který je zodpovědný za výše zmíněné vlastnosti (Shimazu et al. 1999). Po navázání cizorodé látky na TLR4 dochází k aktivaci signální kaskády, která aktivuje transkripční faktory jako např. jaderný faktor kappa B (NF-κB) a indukuje expresi genů důležitých pro imunitní reakci (Miguel et al. 2007). NF-κB signalizační dráha ovlivňuje expresi cytokinů (hlavně tumor nekrosis faktoru α; TNFα) prostřednictvím

adaptorových molekul jako jsou MyD88 (Myeloid differentiation primery response protein 88); TIRAP/Mal TIRAP (Toll/interleukin-1 domain-containing adaptor protein) nazývaný také Mal (MyD88 adaptor like protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) a SARM (sterile α and Heat-armadillo motifs) (Miguel et al. 2007; Belinda et al. 2008). TLR signalizace zahrnuje dvě hlavní dráhy - MyD88 závislou dráhu, vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů a MyD88-nezávislou dráhu, kterou spouští TRIF a TRAM. TRAM slouží jako adaptorový protein pro signalizační dráhu TLR4 a TRIF stimuluje tvorbu regulačního faktoru pro interferon (interferon regulatory factor; IRF3), což vede k indukci exprese IFN- β a maturaci dendritických buněk (Yamamoto et al., 2003; Akira and Takeda, 2004; Miguel et al. 2007). Signalizace pomocí TRIF může být inhibována interakcí s adaptorovým proteinem SARM (Belinda et al. 2008).



Obr.4: Signální dráha TLR; MyD88-závislá a nezávislá (upraveno z Akira and Takeda, 2004).

MyD88-závislou dráhu spouští adaptorový protein MAL navázaný na plazmatické membráně, TLR4 se naváže na MAL protein a s jeho pomocí aktivují MyD88 (Miguel et al. 2007). MyD88

aktivuje kinázu I-KappaB (I κ B) (Baeuerle and Baltimore 1988), fosforylací této kinázy dojde k degradaci inhibitoru NF- κ B a k jeho translokaci do jádra, kde je zahájena exprese různých složek zánětlivé odpovědi, hlavně cytokinů TNF- α , IL-6, IL-12, NOS, imunoglobulinů, I κ B, neurotransmiterů a množství genů (Beg et al., 1993; Verma et al., 1995; Nomura, 2001; Marpegan et al., 2004; Yamamoto et al., 2003).

První odpověď na infekci je vždy neadaptivní, je stejně silná a nemá imunologickou paměť. Není-li plně účinná, dochází ke spuštění mechanismů adaptivní imunity.

2.5.2. ADAPTIVNÍ IMUNITA

Adaptivní imunita je fylogeneticky mladší a vyskytuje se pouze u obratlovců. K jejímu rozvoji dochází až po narození a vždy kooperuje s imunitou neadaptivní. Je tzv. antigenně-specifická a představuje druhou obranu linii v boji proti patogenům, založenou na B-lymfocytech, které tvoří protilátky a na několika typech antigenně specifických T-lymfocytů. T lymfocyty jsou buďto pomocné (Th), nebo cytotoxické (Tc). Pomocné lymfocyty mají na povrchu svého receptoru navázán glykoprotein CD-4, který funguje jako koreceptor, jenž se váže na antigeny vystavované na komplexech MHC II. třídy, čímž zvyšuje stabilitu vazby mezi lymfocylem a antigen prezentující buňkou. Na povrchu B a T lymfocytů se nacházejí receptory (BCR a TCR) rozeznávající tělu cizí antigeny. Tyto specifické receptory vznikají při vývoji B a T lymfocytů rekombinací úseků genů VDJ a mutací, což zajišťuje jejich obrovskou variabilitu.

Důležitou složku imunitních reakcí představují APC buňky mezi které patří makrofágy, B lymfocyty a obzvláště dendritické buňky. Časné dendritické buňky nejprve pohltní antigenní částice mikroorganismů a následně jsou prostřednictvím TLR receptorů a prozánětlivých cytokinů stimulovány k migraci do lymfatické uzliny, kde se přeměňují na zralé dendritické buňky s vlastnostmi APC, jsou tedy schopny na svém povrchu vystavovat komplexy MHC glykoproteinů s krátkými úseky cizorodých antigenů a současně kostimulační molekuly (CD80, CD86, CD40). Tyto komplexy rozeznávají antigenně specifické receptory na povrchu T lymfocytů (TCR). Po interakci mezi TCR a patogenním fragmentem APC buňky dochází k proliferaci a diferenciaci T-lymfocytu na efektorovou buňku (Tc či Th).

Po aktivaci T lymfocyty sekretují cytokiny, které stimulují další buňky imunitního systému. Podle produkovaných cytokinů se Th lymfocyty dále dělí na Th₁ a Th₂ lymfocyty. Th₁ slouží k aktivaci makrofágů a Th₂ kooperují s B lymfocyty a podílí se na tvorbě protilátek. Cytotoxické lymfocyty slouží primárně k rozpoznávání a přímé likvidaci infikovaných buněk. Mají na svém receptoru navázaný glykoprotein CD-8, který se váže na antigeny vystavované na komplexech MHC I. třídy. B lymfocyty představují humorální složku adaptivní imunity. Patří do skupiny APC buněk, ale narozdíl od ostatních APC nejsou schopny fagocytózy. Po rozpoznání cizího antigenu na komplexu MHC II. receptory Th₂ buněk, dochází k vylučování cytokinů Th receptory a následně k aktivaci B lymfocytů a produkci protilátek. Hlavní funkcí humorální imunitní odpovědi je likvidace extracelulárních mikroorganismů a potlačení šíření infekce (See in review Delves et Roitt, 2000).

2.6 LIPOPOLYSACHARID

Lipopolysacharid je endotoxin získaný ze stěn gramnegativních bakterií E. Coli. Po podání LPS dochází v organismu k mnoha fyziologickým změnám, v závislosti na množství podaného LPS. Vysoké dávky způsobují septický šok, který často vede až ke smrti, zatímco nižší dávky LPS stimulují zánětlivou odpověď v mozku i na periférii. Systémové podání LPS indukuje v organismu neadaptivní imunitní reakce, které zahrnují masivní aktivaci makrofágů, vylučování cytokinů TNF α a interleukinů 1 β , 6, 12 (Annane et al., 2005). LPS je rozpoznáván Toll-like 4 (TLR 4) receptory, které spouští molekulární signální kaskádu ústící v aktivaci NF κ B. NF κ B je hlavním regulátorem zánětu a po aktivaci zapíná geny, které kódují cytokiny. Tyto cytokiny vyvolávají zánět, horečku a aktivují adaptivní imunitu. IL-12 podporuje aktivitu T lymfocytů a IL-6 podporuje aktivitu B lymfocytů. Aktivované makrofágy produkují IL-1, TNF α a IL-6, které spouštějí produkci oxidu dusnatého (NO) v makrofázích, indukují horečku a mobilizaci neutrofilů s kostní dřeně do krve. Interleukin 6 (IL-6) je považován za jednoho z hlavních ukazatelů sepse (Bozza et al., 2007). Vzárust jeho hladiny v mozku je spojen s několika závažnými neuronálními a behaviorálními poškozeními, které vedou ke smrti neuronů a z dlouhodobého hlediska mají fatální vliv na funkci mozku (Semmler et al., 2007). Mezi další účinek LPS patří snižování krevního tlaku a v důsledku toho se uvolňuje oxid dusnatý (NO), který ve vysokých dávkách podporuje rozvoj septického šoku (Beasley et Eldridge, 1994; Kadoi, 2007).

2.6.1 INTERAKCE IMUNITNÍHO A CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Aktivace imunitního systému zasahuje do generování i synchronizace cirkadiánních rytmů. Behaviorální a fyziologické změny, které provázejí zánětlivou imunitní odpověď se souhrně označují jako "sickness behaviour" (Dantzer et al., 2006). Mezi "sickness behaviour" vykazující cirkadiánní rytmicitu patří letargie, malátnost, snížená chuť k jídlu a také deprese (Wirz-Justice et al., 2006). Také režim spánku a bdění, jeden z nejběžnějších modelů cirkadiánní aktivity, může být vlivem prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů modifikován (Krueger et al., 2001).

Imunitní systém reaguje na hladiny melatoninu, který je považován za jednoho z nejdůležitějších členů komplexu neuro-endokrinně-imunitního systému. Syntéza melatoninu probíhá pouze za tmy a je řízena signály z SCN. Bylo zjištěno, že denní a roční rytmy se vyskytují také u buněk, které tvoří imunitní systém např. v buňkách kostní dřeně, u lymfocytů a byly objeveny v aktivitě NK a v produkci cytokinů (Carillo-Vico et al., 2005). Navíc bylo zjištěno, že s imunitou souvisejí transkripční faktory CREB. Jsou přítomny v SCN a jejich aktivita důležitá pro světlem-indukované fázové posuny (Marpegan et al., 2004). První práce ze sedmdesátých let minulého století pojednávaly o tom, že fotoperioda má přímý vliv na imunitní systém. Bylo prokázáno, že jsou-li dny kratší a světla je méně, imunitní funkce se zesilují (Nelson et al., 2004). Také u ptáků byl popsán vztah mezi nespecifickými imunitními funkcemi a melatoninem. Noční vzestup hladin melatoninu byl v souladu s vzestupem activity ptačích fagocytů (Terron et al., 2004). Mimo jiné melatonin reguluje syntézu NO a tím inhibuje sepsi (Maestroni, 2001), čímž pozitivně reguluje imunitní odpověď. Melatonin zabraňuje také oběhovému selhání, které je důsledkem snižování krevního tlaku, tím že redukuje hladinu TNF- α a IL-6 v krvi (Wu et al., 2001).

Výzkumy v posledních deseti letech prokázaly, že melatonin není syntetizován pouze v epifýze, ale také v množství dalších struktur (např. v retině a střevech) včetně mononukleárních a polynukleárních buněk imunitního systému (Jaworek et al., 2005). Také krevní mononukleární buňky se podílejí na syntéze melatoninu, což ukazuje na možnou kooperaci v regulaci imunitní odpovědi (Carillo-Vico et al., 2004). Tento předpoklad potvrzuje také fakt, že T i B lymfocyty obsahují na svých buněčných membránách receptory pro

melatonin (Garcia-Maurino et al., 1997). Melatonin indukuje produkci cytokinů mononukleárními krevními buňkami skrze jaderné melatoninové receptory (Garcia-Maurino et al., 1998). Kromě stimulace produkce cytokinů také podporuje fagocytózu a zvyšuje aktivitu NK buněk. V epifýze hraje melatonin významnou roli při inhibici imunitní odpovědi jako protizánětlivý faktor. Hlavní regulátor zánětu, nukleární faktor kappa B (NFκB) po aktivaci zapíná geny, které kódují zánětlivé cytokiny a je důležitý také pro indukci prostaglandinů a COX reaktivních částic podílejících se na tvorbě zánětu (Hayden et al., 2006). Melatonin inhibuje vazbu NFκB na DNA tím, že brání translokaci NFκB do jádra, což vede k inhibici produkce zánětlivých cytokinů (Chuang et al., 1996). Epifýza je mimo jiného cílem pro PAMPs, které má např. lipopolysacharid či prozánětlivý cytokin TNF. LPS i TNF umějí indukovat translokaci transkripčního faktoru NFκB do jádra. LPS ovlivňuje syntézu melatoninu skrze aktivaci NFκB dráhy (da Silveira Cruz-Machado et al., 2010; Carvalho-Sousa et al., 2011; da Silveira Cruz-Machado et al., 2012). Po aktivaci této dráhy zánětlivými mediátory či PAMPs dochází obecně k dimerizaci proteinů NFκB a jejich translokaci do jádra, kde se váží na DNA-κB části což ústí v represi či aktivaci transkripce. Aktivace NFκB dráhy v makrofázích má opačný efekt než aktivace v epifýze. Zatímco v epifýze dochází během zánětlivé odpovědi aktivací NFκB dráhy k inhibici produkce melatoninu, u makrofágů indukuje LPS aktivací NFκB dráhy expresi AA-NAT, což vede k syntéze melatoninu, který se poté účastní přeměny makrofágů v profesionální fagocyty (Muxel et al., 2012). Při zánětu dochází k vzestupu prozánětlivých cytokinů, které mají synchronizační účinky na cirkadiánní systém a vyvolávají fázové posuny cirkadiánních rytmů (Marpegan et al., 2005). Bylo prokázáno, že LPS indukuje expresi hodinového genu Per 1 v PVN hypothalamu (Takahashi et al., 2001) a genu Per 2 (Okada et al., 2008), jednoho z nejdůležitějších komponentů molekulární zpětnovazebné smyčky. LPS se podílí také na vzestupu produkce AVP, čímž dochází k modifikaci neuroendokrinního výstupu z SCN (Nava et. al, 2000), proto se modely využívající LPS s oblibou využívají při zkoumání imunologických dějů v souvislosti s cirkadiánním systémem.

2.6.2 KINÁZY ERK 1/2, GSK3 β a TRANSKRIPČNÍ FAKTORY STAT3

2.6.2.1 ERK1/2 - (Extracelulárně responsivní kináza 1/2)

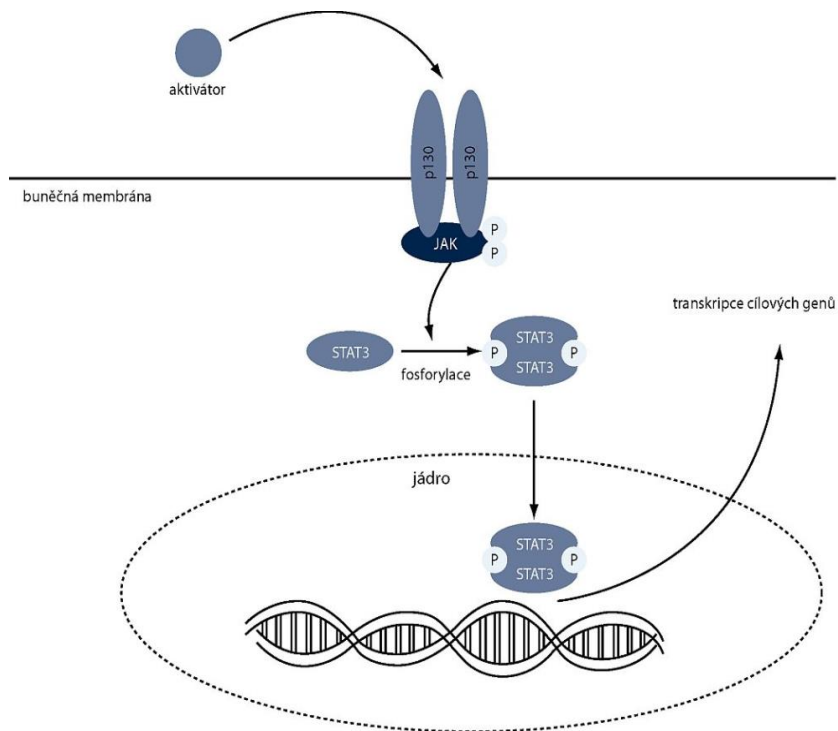
ERK1/2 jsou serin/threoninové proteinové kinázy patřící do rodiny tzv. MAPK kináz (mitogenem-aktivované protein kinázy), které spolu s proteinkinázami Raf a MEK (MAPK/ERK kinase) tvoří signální dráhu převádějící množství extracelulárních podnětů do intracelulárních odpovědí (Seger et Krebs, 1995). Aktivované signalizační dráhy ERK1/2 se účastní zejména odpovědí v regulaci buněčné proliferace, diferenciaci, migrace, adheze, apoptózy, bolesti a jsou zapojeny i v imunitních zánětlivých drahách, ovlivňují expresi prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Werlen et al., 2003; Ji et al., 2009). Receptory, které se podílejí se na přenosu signálu jsou buďto receptory ze skupiny GPCR (z angl. G protein-coupled receptor), receptory s vnitřní tyrosin kinázovou aktivitou (RTK; z ang. receptor tyrosine kinase) a nebo integriny, které interagují s proteiny ECM, protože nemají vlastní kinázovou aktivitu (Brown and Sacks, 2009). ERK 1/2 jsou aktivovány fosforylací na serinovém či threoninovém zbytku a po aktivaci fosforylují další substráty v cytosolu. Fosforylovaná kináza ERK1/2 (pERK1/2) se může také translokovat do jádra, kde napomáhá transkripci mnoha cílových genů (Butcher et al., 2005). V cirkadiálním systému se pERK kináza 1/2 přímo účastní dráhy světelné signalizace v SCN. Světlo, ale také glutamát a PACAP indukuje fosforylaci této kinázy a tím její aktivaci (Doi et al., 2007, Mao et al., 2004; May et al., 2010). Aktivace ERK1/2 je nezbytným předpokladem pro světlem indukované fázové posuny rytmu v pohybové aktivitě a transkripci časných a hodinových genů v SCN (Obrietan et al., 1998; Butcher et al., 2002; Dziema et al., 2003; Coogan et Piggins, 2004). Je známo, že ERK1/2 může být aktivovaná mnoha jinými signály z extracelulárního prostředí, např. hormony, růstovými faktory, Ca²⁺ ionty, G proteiny, neurotransmitery a je proto možné, že v cirkadiálních strukturách se integrují informace z drah světelných i nesvětelných a na základě toho se dynamicky mění hladina pERK1/2.

2.6.2.2 pGSK3 β - Fosforylovaná Glykogen Syntáza Kináza 3 β

Glykogen syntáza kináza 3 (GSK3, z angl. Glycogen synthase kinase 3) je serin-threoninová kináza, která se podílí na řadě buněčných procesů, ovlivňuje molekulární mechanismy cirkadiálního systému, signalizaci a zároveň je klíčovým regulátorem neadaptivních zánětlivých procesů (Martin et al., 2005; Hu et al., 2006). U savců jsou známy dvě izoformy této kinázy - GSK3 α a GSK3 β (Woodgett et al., 1990). Obě vykazují velmi podobné biochemické vlastnosti a vysokou homologii svých genů, zejména v kinázové doméně (Rayasam et al., 2009). Funkce GSK3 kinázy spočívá ve fosforylaci serinových či threoninových N-zbytků cílového proteinu. Aktivita GSK3 je kontrolována mnoha faktory. Fosforylace specifické aminokyseliny zvyšuje nebo naopak snižuje schopnost GSK navázat substrát. Zatímco fosforylace na tyrosinu-216 GSK3 β či tyrosinu-279 GSK3 α zesiluje enzymatickou aktivitu GSK3, fosforylace na serinu-9 GSK3 β zdatelně snižuje vazebné schopnosti kinázy (Jope et al., 2007). GSK3 je narozdíl od jiných kináz přítomna stále v aktivní formě a je inaktivována v odpovědi na buněčnou signalizaci (Harwood et al., 2001; Doble et Woodgett, 2003). GSK3 působí na více než čtyřicet různých proteinů v množství různých drah (Jope et Johnson, 2003). Mimo jiné reguluje buněčný cyklus a proliferaci, metabolismus glykogenu, signalizační dráhu insulínu, ale také neuronální funkce. GSK3 se nachází konstitutivně v mozku a nežádoucí změny v její aktivitě jsou asociovány s množstvím chorob, jako je cukrovka, rakovina, bipolární porucha, schizofrenie, Alzheimerova nemoc, Huntingtonova choroba a další neurodegenerativní onemocnění (Jope and Roth, 2006; Mazanetz et Fischer, 2007). Důležitou roli hraje GSK3 β při řízení cirkadiálního systému. Nachází se přímo v molekulárním mechanismu biologických hodin, kde fosforyluje proteiny hodinových genů PER2, čímž umožňuje jejich vstup do jádra a následnou down-regulaci komplexu CLOCK/BMAL1 (Litaka et al., 2005; Wei et al., 2011). GSK3 β se dále hojně účastní regulace imunitních reakcí. Ovlivňuje neadaptivní imunitní odpovědi zahrnující produkci prozánětlivých cytokinů (IL6, IFN γ , TNF α) a silně podporuje TLR receptory (Martin et al., 2005). TLR aktivují NF- κ B signalizační dráhu která ovlivňuje expresi cytokinů pomocí adaptorových molekul jako jsou MyD88, TIRAP/Mal a TRIF. NF- κ B signalizační dráha zajišťuje propojení mezi neadaptivní a adaptivní složkou imunitní odpovědi. V adaptivní imunitní odpovědi je GSK3 β zapojena do prezentace antigenů imunitním buňkám.

2.6.2.3 pSTAT (fosforylovaní Signální Transdučeři and Aktivátoři of Transkripce)

Proteiny STAT patří do rodiny zahrnující sedm členů (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B a STAT6), jsou to významné transkripční faktory, které mají rovněž funkci při přenosu signálu. Základní stavební struktura všech STAT proteinů je podobná, obsahují doménu vázající DNA, SH2 doménu, která je nezbytná pro dimerizaci a transkripční doménu, která napomáhá navázání dalších proteinů v průběhu transkripce. Liší se svou funkcí, jednotlivé STAT proteiny reagují na různé ligandy. Mohou jimi být cytokiny (např. IL-2, IL-4, IL-12, IFN- α), růstové faktory a také celá řada hormonů. Navázání STATu skrze jeho SH2 doménu (Stahl et al., 1995) na příslušný receptor asociovaný s kinázami Jak či Src vede k fosforylaci a tím k aktivaci STAT proteinu. Aktivovaný STAT protein dimerizuje a přechází do jádra, kde se váže na promotor cílového genu a ovlivňuje jeho expresi (Harrison et al., 2012).



Obr.5: *Jak/STAT Signální dráha* (upraveno z Ševčíková a kol., 2012).

Po navázání aktivátoru na buněčný receptor je aktivována JAK, která následně fosforyluje transkripční faktor STAT. STAT dimerizuje a je translokován do jádra, kde ovlivňuje expresi cílových genů. Kromě přímé vazby na promotory cílových genů, mohou tyto proteiny interagovat s jinými transkripčními faktory jako např. SP1 nebo HSF-1 (Chatterjee-Kishore et al., 2000) či s kinázou ERK1/2 a GSK3 β (Pircher et al., 1999; Beurel and Jope, 2008). Vliv

transkripčních faktorů STAT na cirkadiánní systém savců zatím není zcela objasněn. Proteiny však STAT hrají velkou roli v zánětlivých reakcích, zejména STAT3 je nezbytným regulátorem protizánětlivé imunitní odpovědi v endotelových buňkách (ECs) (Kano et al., 2003). Dráha Jak-STAT (z angl. Janus kinase signal transducer and activator of transcription) je aktivována řadou cytokinů a růstových faktorů a má vliv na mnoho buněčných funkcí, včetně zánětlivých reakcí (Leonard et al., 1998). Vazbou ligandu na receptory-asociované s Jak dochází k fosforylaci STAT na tyrosinu, který dimerizuje a translokuje se do jádra, kde reguluje transkripci cílových genů. STAT3 je mediátorem mnoha genů aktivovaných IL-6 cytokiny (Akira et al., 1994; Leonard et al., 1998), aktivita STAT3 v ECs vede k potlačení IFN γ , který je známým mediátorem sepse (Salkowski et al., 1997) a významně se tak podílí na regulaci zánětu (Kano et al., 2003). Interakce mezi ECs a imunitním systémem je nezbytná pro fungování imunity na systémové úrovni. STATy jsou společně s cytokiny zapojeny také v drahách adaptivní imunitní odpovědi (Leonard et al., 1998). STAT3 navíc významně ovlivňuje APC buňky, které mohou indukovat aktivaci T buněk či jejich toleranci (Fengdong et al., 2003). Vývoj jednotlivých typů pomocných T lymfocytů je řízen cytokinovým prostředím vytvořeným během imunitní reakce. Cytokiny působí na vyvíjející se T lymfocyty aktivací proteinů STAT a specifických transkripčních faktorů.

Klíčovými regulátory signální dráhy Jak-STAT jsou tzv. supresory cytokinové signalizace (SOCS, z angl. suppressor of cytokine signaling), které jsou za normálních podmínek konstitutivně exprimovány v nízkém množství v buňkách a jsou silně indukovány cytokiny, jenž inhibují dráhu Jak-STAT (Greenhalgh, 2001). Dále mohou být regulovány skrze posttranslační modifikace, fosforylací na serinu a nebo tyrosinu (Levy et al., 2002; Schindler et al., 1992; Shuai et al., 1992).

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo popsat vliv akutně podaného lipopolysacharidu na cirkadiánní systém potkana. Sledovala jsem hladiny exprese fosforylovaných forem kináz GSK3 β , ERK1/2 a hladiny transkripčních faktorů STAT3 v SCN a epifýze potkana. Zajímalo nás také působení LPS na systémové úrovni, což jsme stanovili měřením hladiny interleukinu IL-6 a TNF α v krvi potkana.

Navrženým pracovním postupem pro zjištění hladin fosforylovaných proteinů byla imunohistochemická detekce specifických proteinů s využitím imunologické vazby antigenů a protilátek. K posouzení vlivu lipopolysacharidu na systémovou úroveň potkana byla použita metoda Elisa.

4. Materiál a metody

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

K experimentálním účelům bylo použito 2x 48 dospělých samců potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (Velaz s.r.o., Praha) o přibližné váze 300g. Zvířata byla krmena standardní laboratorní krmnou směsí, přístup k potravě a pitné vodě měla *ad libitum*. Teplota ve zvěřinci byla udržována na $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

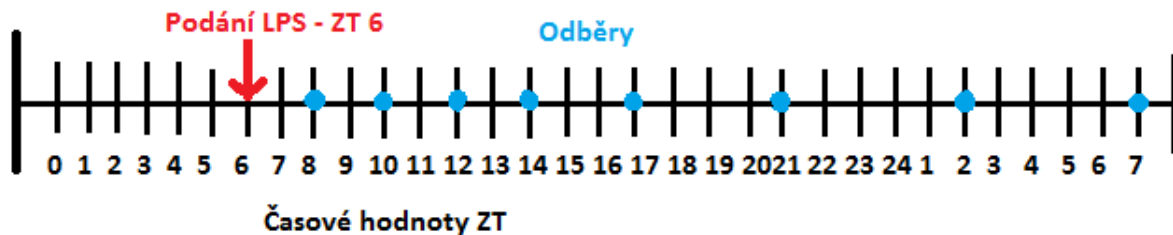
Denní světlo bylo zajištěno 40 W zářivkami, intenzita osvětlení se pohybovala mezi 150 a 250 lux, podle umístění chovných klecí. Definovaný světelný režim s 12 hod. tmy a 12 hod. světla (LD:12:12) byl řízen automatickými spínacími hodinami. Všechny experimenty byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat České republiky, s maximální ohleduplností k pokusným zvířatům.

4.2 EXPERIMENTÁLNÍ PARADIGMA

Experimentální potkani byli 14 dní před pokusem chováni v podmínkách LD - 12:12. Světlo bylo rozsvěceno vždy v 6:00 ráno (ZT 0; tj. „Zeitgeber time“, 0 označuje počátek světlé části dne) a zhasínáno v 18:00 večer (ZT 12). V čase ZT 6, tzn. 6 hodin po rozsvícení, byl polovině potkanů podán LPS do peritoneální oblasti v dávce 1 mg/kg váhy. Zbytek zvířat sloužil jako kontrola. Poté byla zvířata postupně odebrána, v definovaných časových intervalech po dvou až 25 hodinách od podání LPS. V každém časovém bodě byli odebráni a usmrceni 3 potkani s aplikovaným LPS a 3 kontrolní potkani. Po usmrcení byla odebrána krev a zpracována metodou Elisa, mozky potkanů a epifýzy byly vyjmuty a zpracovány dle protokolu imunohistochemie.

4.2.1 EXPERIMENT 1: Vliv akutního podání LPS na hladiny cytokinů interleukinu 6 a TNF- α v krvi potkana

Cílem pokusu bylo prokázat, že dávka LPS 1mg/kg indukuje imunitní odpověď organismu a může mít vliv i na funkci cirkadiálního systému. Hladiny cytokinů Il-6 a TNF- α v krvi potkana jsme stanovovali metodou Elisa.

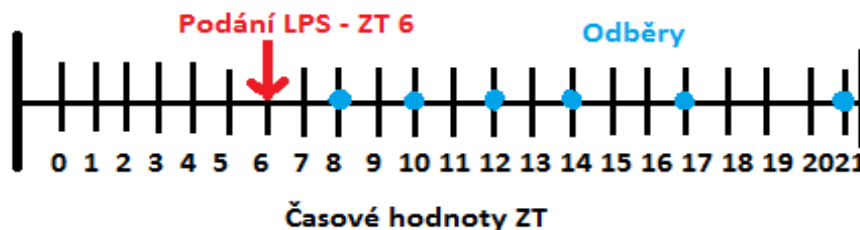


Obr.6: Časová osa odběrů vzorků pro metodu Elisa (Il-6, TNF- α).

Aplikaci lipopolysacharidu značí červená šipka, odběry vzorků představují modré body na časové ose. Odběry vzorků probíhaly po dvou, čtyřech, šesti, osmi, jedenácti, patnácti, dvaceti a pětadvaceti hodinách od podání LPS.

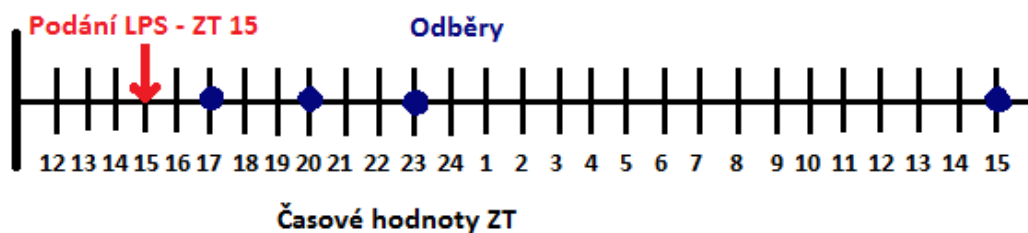
4.2.2. EXPERIMENT 2: Vliv akutního podání LPS na expresi fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v epifýze potkana

Cílem druhého pokusu bylo určit změnu hladiny exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 β a transkripčních faktorů STAT3 v řezech pineální žlázy (epifýzy) potkana, pomocí metody imunohistochemie, po aplikaci 1mg/kg LPS v době světlé části dne (obr.7), nebo v noci (obr.8).



Obr.7: Časová osa odběrů epifýz pro IHC (pERK1/2, pGSK3 β , pSTAT3) po aplikaci LPS v ZT6.

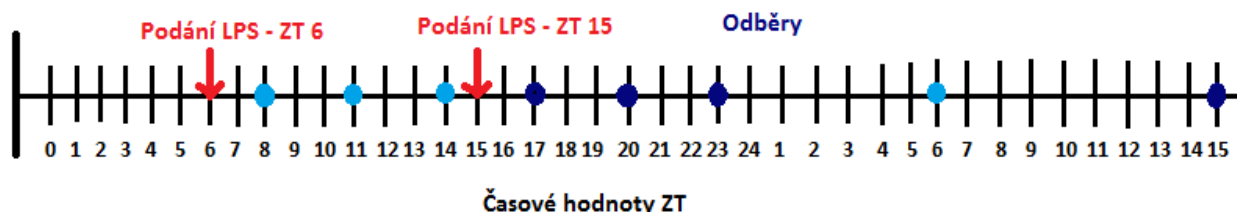
Aplikaci LPS značí červená šipka, odběry vzorků představují světle modré body na časové ose. Odběry vzorků probíhaly během dne a to po dvou, čtyřech, šesti, osmi, jedenácti a patnáctihodinách od podání LPS.



Obr.8: Časová osa odběrů epifýz pro IHC (*pERK1/2*, *pGSK3β*, *pSTAT3*) po aplikaci LPS v ZT15. Aplikaci LPS značí červená šipka, odběry vzorků představují tmavě modré body na časové ose. Odběry vzorků probíhaly během noci a to po dvou, pěti, osmi a čtyřadvaceti hodinách od podání LPS.

4.2.3. EXPERIMENT 3: Vliv akutního podání LPS na expresi fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK 3β, a transkripčních faktorů STAT3 v SCN potkana

Cílem třetího pokusu bylo určit hladinu exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3β a transkripčních faktorů STAT3 v tkáňových řezech mozku v oblasti mediálního SCN potkana, rovněž za použití imunohistochemie (obr.9).



Obr.9: Časová osa odběrů mozku pro IHC (*pERK1/2*, *pGSK 3β*, *pSTAT3*). Aplikaci LPS značí červené šipky, odběry vzorků představují modré body na časové ose. LPS byl podán jedné skupině zvířat v čase ZT 6 a druhé skupině zvířat v čase ZT 15. Odběry vzorků probíhaly v obou případech po dvou, pěti, osmi a čtyřadvaceti hodinách od podání LPS.

4.3. ŘEŠENÍ EXPERIMENTŮ

4.3.1 POSTUP STANOVENÍ HLADINY INTERLEUKINU 6 A TUMOR NEKROSIS FAKTORU α **POMOCÍ METODY ELISA V KRVÍ POTKANA**

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) patří mezi nejpoužívanější imunologické metody. Funguje na principu imunoenzymatické reakce, díky které je možné detekovat antigeny, v našem případě cytokiny Il-6 a TNF α .

4.3.1.1 MATERIÁL A VYBAVENÍ

Přístroje:

ELISA Reader

Chemikálie:

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr; pH = 7,4 (PBS, phosphate-buffered saline; Sigma)

Kity (Rat-TNF- α ELISA kit, Rat-Il6 ELISA kit, Invitrogen)

Standard

Standard diulent Buffer

Streptavidin-HRP

Streptavidin-HRP Diulent

Wash buffer Concentrate

Incubation Buffer

Cover plate

Rt Il-6 Biotin conjugate solution

Stabilized Chromogen

Stop solution

Pracovní roztoky:

Promývací pufr

- *Wash buffer Concentrate* z Kitu byl temperován při pokojové teplotě a promíchán, poté byl naředěn 1 objem pufru s 24 objemy deionizované vody.
- Koncentrát i ředěný pufr byly uchovány v lednici

Standard

- Bylo připraveno 8 zkumavek. *Standard* byl rozpuštěn na 7500pg/ml (dle instrukcí na lahvičce) ve *Standard diulent Buffer*, poté byl lehce promíchán a ponechán deset minut při pokojové teplotě, přičemž bylo důležité nepřekročit dobu inkubace.
- K 0,15 ml standardu bylo přidáno 0,6 ml *Standard diulent Buffer* a tento roztok byl označen jako 1500pg/ml Mix. Poté bylo do dalších šesti zkumavek přidáno 0,300 ml *Standard diulent Buffera* k tomu ještě 300μl z předchozího vzorku. Byla vytvořena ředící řada a byla označena jako 750; 375; 187,5; 93,8; 46,9 a 23,5 pg/ml Mix

Streptavidin-HRP pracovní roztok

- *Streptavidin-HRP* byl temperován při pokojové teplotě a velmi jemně promíchán, potom bylo naředěno 10μl koncentrovaného *Streptavidin-HRP* roztoku 1 ml *Streptavidin-HRP Diulent* pro každou z 8 jamek a roztok byl uložen do lednice.

4.3.1.2 POSTUP METODY ELISA

- Příprava vzorků (rozpuštění, promíchání a naředění)
 - Sérum, plazma a tkáňové kultury byly 2x naředěny ve *Standard diulent* pufru v poměru 1:1; tj. 120μl vzorku a 120μl pufru
- Příprava podkladu (8-jamkových proužků) pro vzorky i standardy
- Přidání 50 μl *Incubation Buffer* do každé jamky
- Přidání negativní kontroly v podobě 100 μl *Standard diulent Buffer* do 1. jamky
- Napipetování 100 μl ředěného vzorku do ostatních jamek, promíchání pipetou
- Inkubace zakrytých vzorků 2 hod při 37°C
- Vyklepnutí roztoku na buničitou vatu a promytí promývacím pufrem (4x)
- Přidání 100 μl *Rt II-6 Biotin Conjugate solution* do každé jamky
- Přikrytí a inkubace vzorků 1,5 hod při pokojové teplotě
- Vyklepnutí na buničitou vatu a promytí (4x)

- Přidání 100 μ l *Streptavidin-HRP* pracovního roztoku
- Přikrytí a inkubace vzorků 30 min při pokojové teplotě
- Vyklepnutí na buničitou vatu a promytí promývacím pufrem (4x)
- Přepipetování čirého *Stabilized Chromogenu* do speciální zkumavky a následné přidání 100 μ l do každé jamky + 1 další kontrolní jamky, roztok začne modrat
- Inkubace ve tmě při pokojové teplotě zhruba 25 minut v závislosti na kvalitě čtečky
- přidání *Stop solution* což reakci zastaví a vzorky se zbarví do žluta
- Měření absorbance při 450 nm s blankem chromogenu a *Stop Solution*
- Vynásobení hodnot 2x pro vyrovnání ředicího roztoku
- Vytvoření kalibrační křivky a stanovení hladin Il-6 a TNF α v krvi potkana

4.3.2 POSTUP STANOVENÍ EXPRESE FOSFORYLOVANÝCH FOREM KINÁZ ERK1/2 A GSK3B A TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ STAT POMOCÍ METODY IMUNOHISTOCHEMIE V SCN A EPIFÝZE POTKANA

Pro náš další experiment jsme používali nepřímou trojstupňovou metodu s ABC komplexem, jejímž principem je detekce antigenů ve vybrané tkáni pomocí imunologické vazby na specificky značené protilátky.

4.3.2.1 MATERIÁL A VYBAVENÍ

Přístroje:

Kryomikrotom Leica

Světelný mikroskop Olympus Provis

Běžné laboratorní vybavení

Podložní sklíčka Superfrost

Chemikálie:

Fosfátový pufr; 0,1 M, pH = 7,4 (PBS, phosphate-buffered saline; Sigma)

Paraformaldehyd, 4% (PFA), (v 0,1M fosfátovém pufru, pH=7,2; Sigma)

Thiopental sodný (INC Czech Republic a.s.)

Heparin (Zentiva)

Peroxid vodíku, 0,5%, 30% (H₂O₂; Penta)

BSA pufr - Hovězí sérový albumin, 0,3%, 1% (BSA, bovine serum albumine; Sigma)

Diaminobenzidin (DAB; Sigma)

Sacharóza, 20% (v 0,1M fosfátovém pufru, pH=7,2; Penta)

Ethanol, 70%, 96% (EtOH; Penta)

Xylen (Penta)

histologický balzám DPX Mountant for histology (Sigma)

Triton-x, 0,3% (Sigma)

Želatina (Carl ROTH)

Cryomount (zalévací médium pro zmrazené řezy; Bamed s.r.o.)

ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)

Kity:

Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratoires)

- součástí kitu 1 je normální kozí sérum (NGS)
- sekundární králičí IgG s navázaným biotinem
- avidin a biotin s avázanou křenovou peroxidázou H

Vectastain ABC KIT

- PK-6105 Goat IgG

Primární protilátky:

- pERK1/2, 1:1500 (Cell Signalling Technology)
- pGSK3 β , 1:600 (Cell Signalling Technology)
- STAT3, 1:300 (Cell Signalling Technology)
- pSTAT3 (Y), 1:300 (Cell Signalling Technology)
- pSTAT3 (S), 1:300 (Cell Signalling Technology)

Pracovní roztoky:

0,01M PBS (fosfátový pufr, pH 7,4)

- 1 sáček byl rozpuštěn v 1l destilované vody a následně přefiltrován

BSA pufr:

- 1% roztok hovězího sérového albuminu ředěný PBS + 0,3% Triton-X 100

DAB

- Tableta (10 mg) byla rozpuštěna ve 20 ml PBS + 7 μ l 30% H₂O₂.

4% PFA (paraformaldehyd)

- 80 g práškového PFA jsme míchali pomocí magnetického míchadla v 1l připraveného PBS, zahříváného na 60°C, dokud nebyl zcela rozpuštěn
- Po vychladnutí byl roztok naředěn PBS na objem 2l
- Výsledný roztok 4% PFA byl přefiltrován přes filtrační papír do perfuzní lahve

20% sacharóza

- 20 g sacharózy byl rozpuštěn ve 100 ml 0,01M PBS

4.3.2.2 POSTUP METODY IMUNOHISTOCHEMIE

Schéma:

- Odběr a fixace tkáně
- Krájení řezů
 - Technika free-floating - byla použita pro mozky
 - Technika přímého krájení řezů na sklo - byla použita pro epifýzy
- Zablokování endogenních peroxidáz
- Zablokování nespecifického pozadí
- Vazba primární protilátky (1°Ab)
- Vazba sekundární protilátky (2°Ab)
- Zesílení signálu pomocí avidin-biotin-horseradish peroxidázy (ABC)
- Obarvení komplexu pomocí DAB reakce
- Nanesení řezů na skla - v případě techniky free-floating
- Dehydratace a zamontování preparátů

Odběr a fixace tkáně

Zvířata byla anestetizována injekcí thiopentalu do peritoneální oblasti, v dávce 50mg/kg váhy. Poté byla provedena transkardiální perfuze. Po otevření hrudní oblasti byl do levé srdeční komory vpraven heparin v dávce 500 U/l dospělého potkana, který zamezil srážení

krve a do aorty byla zavedena kanyla. Perfuze roztokem 0,01M PBS po dobu 3 minut způsobila odplavení krve z těla a hned poté byla tkáň fixována roztokem 4% PFA po dobu asi 5 minut. Mozek byl vyjmut a dále fixován v 4% PFA po dobu 12 hodin, poté byl přenesen do kryoprotektivního roztoku 20% sacharózy, kde zůstal přes noc. Pro další zpracování byl mozek zamražen v suchém ledu a uchován v teplotě -80°C. Epifýza byla opatrně vyjmuta a stejně jako mozek postfixována, přenesena do sacharózy, zmrazena a skladována v teplotě -80°C.

Krájení řezů

- **Technika free-floating**

Zmražené mozky byly krájeny na kryokatu (Cryocut Leica) na tenké koronární řezy v oblasti mediálního SCN. Tloušťka řezů byla 30 μm a teplota při krájení se pohybovala okolo -22°C. Jednotlivé řezy byly pak pomocí štětce přeneseny do jamek s roztokem PBS.

- **Technika přímého krájení řezů na sklo**

Zmražené epifýzy byly po vyjmutí z mrazicího zařízení chvíli ponechány v pokojové teplotě, poté byly pinzetou vyjmuty z komůrek a nakrájeny na 12μm silné řezy. Řezy v oblasti nejširšího průměru epifýzy se zachycovaly přímo na skla.

Zablokování endogenních peroxidáz

K zablokování endogenních peroxidáz byl použit roztok 0,5% H₂O₂. V případě mozků byl roztok s peroxidem rozpipetován do jamek a tkáňové řezy byly do roztoku přeneseny štětcem. Řezy seinkubovaly 10 minut následně byly důkladně promyty 3x5 minut v PBS. Skla s epifýzami byla vložena do kyvet a zpracována stejným způsobem.

Zablokování nespecifického pozadí

Pro zablokování nespecifického pozadí byl použit roztok 2% séra Normal Goat Serum (NGS) z kitu Vectastain ELITE v BSA pufru (1% BSA, 0,3% Triton-x v PBS). Řezy byly inkubovány po dobu 60 minut při pokojové teplotě.

Vazba primární protilátky (1°Ab)

Ze séra byly tkáňové řezy mozků přeneseny štětcem do roztoku primární protilátky ředěné v 1% BSA pufrua byly ponechány přes noc v lednici při teplotě 4°C. Na skla s epifýzami byl použit tentýž postup, s rozdílem že roztok primární protilátky byl rozpipetován do inkubační komůrky s gumovými okraji v množství 150 µl /1 sklo a překryt sklíčkem s řezy. Následující den byly řezy promyty 3x5 minut v roztoku 0,3% BSA.

Vazba sekundární protilátky (2°Ab)

Mozkové řezy se inkubovaly 60 minut při pokojové teplotě v sekundární protilátce ředěné v poměru 1:600 v 0,3% BSA (podle kitu Vectastain ELITE ABC reagent) a poté byly znovu promyty 2x5 minut v 0,3% BSA. Skla s epifýzami se procesu účastnila v inkubačních komůrkách, opět v množství 150 µl/1 sklo.

Zesílení signálu pomocí avidin-biotin-horseradish peroxidázy (ABC)

Roztok s komplexem avidin-biotinu a křenovou peroxidázou ředěného v poměru 1:400 v 0,3% BSA (podle kitu Vectastain ELITE ABC reagent) byl připraven 30 minut před použitím. V roztoku ABC se řezy inkubovaly 60 minut při pokojové teplotě a poté byly promyty 1x5 minut v 0,3% BSA a 3x5 minut v PBS.

Obarvení komplexu pomocí DAB reakce

K detekci navázaných imunokomplexů speroxidázou bylo potřeba řezy obarvit. Tableta 3, 3'-diaminobenzidinu (DAB; 10 mg) byla rozpuštěna ve 20 ml PBS. Po rozpuštění tablety bylo přidáno 7 µl 30% H₂O₂ a řezy se inkubovaly dle potřeby 20 s - 20 min. Oxidovaný DAB navázaný jako substrát na ABC komplex vytváří hnědé zbarvení komplexu. Řezy pak byly promyty 2x5 minut v PBS.

Nanesení řezů na skla

V případě techniky free-floating tkáňových řezů mozku byly jednotlivé řezy mozků naneseny pomocí jemného štětce na želatinovaná podložní skla a ponechány při pokojové teplotě, aby uschly.

Dehydratace a zamontování preparátů

Po zaschnutí řezů byla skla přendána do stojanu, který byl postupně ponořen do několika nádob. Nejprve byla skla asi minutu omyta destilovanou vodou, poté byla ponořena na 5 minut do 70% EtOH, 2x5 minut do 96% EtOH a 3x5 minut do xylenu. Byla tedy dehydratována ethanolem a prosycena xylenem. Po této proceduře byla skla pokapána histologickým balzámem DPX a překryta krycím sklem. Byla ponechána den až dva při pokojové teplotě, dokud nebyla zcela suchá.

Detekce signálu

Preparáty byly důkladně očištěny a nafoceny světelným mikroskopem Olympus Provis. Z každého mozku byla vybrána reprezentativní část mediální oblasti SCN a stejným způsobem byla vybrána a nafocena reprezentativní oblast jednotlivých epifýz.

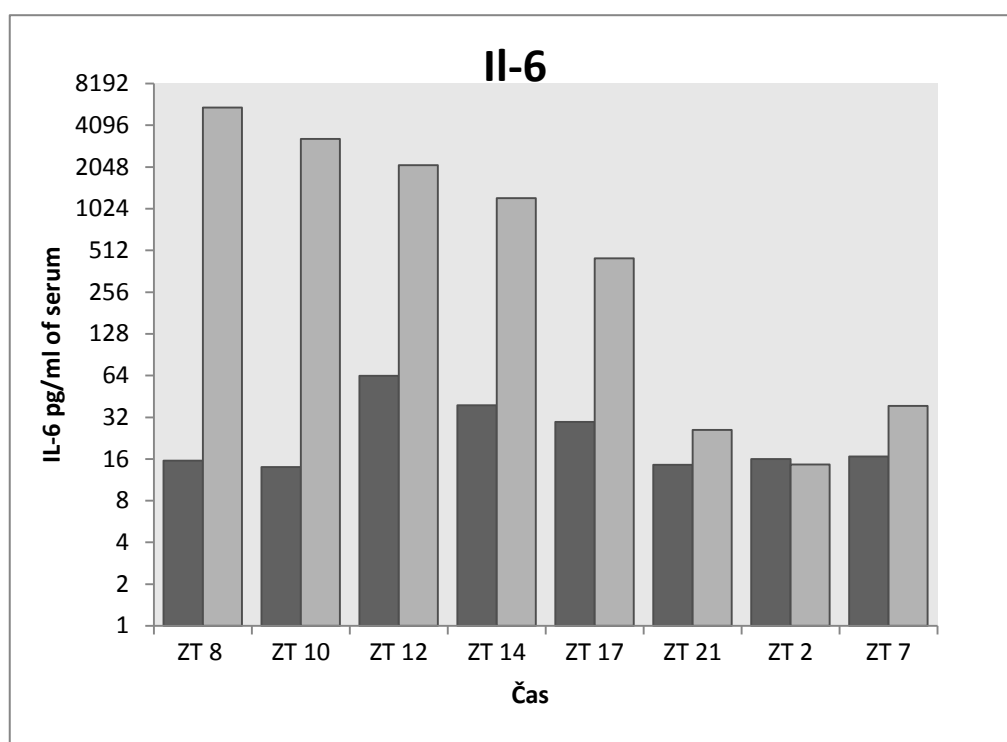
Počet imunopozitivních buněk se v obou případech vyhodnocoval manuálně pomocí počítačového „Cell counter“ programu softwaru ImageJ (NIH). SCN bylo rozděleno ventrolaterální a dorsomediální část a vzniklé šablony byly uloženy a používány pro analýzu jednotlivých obrazů. Při počítání byly započítávány všechny buňky uvnitř ohraničených částí levé a pravé části SCN a také všechny buňky ležící na hraně ohraničených částí SCN. Výsledný počet buněk SCN byl určen jako průměr z levého a pravého SCN. Epifýza jakožto heterogenní struktura nebyla nijak rozdělena, imunopozitivní buňky byly počítány z reprezentativní části výřezu epifýzy při dvacetinásobném zvětšení.

5. Výsledky

5.1 STANOVENÍ HLADINY INTERLEUKINU 6 A TUMOR NEKROSIS FAKTORU α POMOCÍ METODY ELISA V KRVI POTKANA

V prvním experimentu jsme se zaměřili na porovnání hladin IL-6 a TNF α v krvi potkanů s aplikovaným LPS a kontrolních potkanů. Zhodnocení krevních vzorků pomocí metody Elisa ukázalo signifikantní rozdíly v hladinách IL-6 a TNF α v krvi mezi kontrolními a LPS potkany.

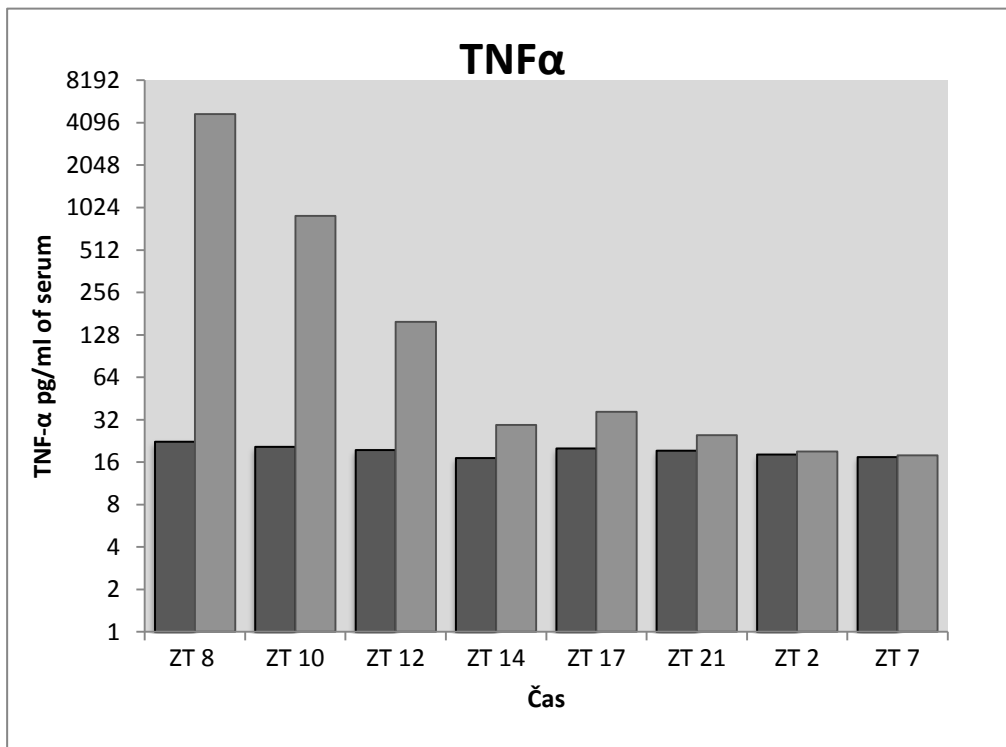
Výsledky naznačují, že dávka LPS 1mg/kg indukuje imunitní odpověď organismu a hladina cytokinu IL-6 v krvi LPS potkana je vysoká již po dvou hodinách od aplikace (obr.10). Vysoké hladiny IL-6 pozvolně klesaly, ale ještě po 11 hodinách od podání LPS přetrvávaly znatelně zvýšené hodnoty IL-6 v krvi. U kontrol byly hladiny IL-6 po celou dobu téměř konstantní.



Obr. 10: Změna hladiny IL-6 v krvi potkana po aplikaci LPS v ZT6.

Hladinu cytokinu IL-6 u kontrolních zvířat označují tmavě šedé sloupce, hladinu IL-6 u zvířat s aplikovaným LPS světle šedé sloupce. Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu ze vzorku získaného smícháním vzorků ze 3 zvířat.

Také v případě TNF α byla prokázána silná indukce vyvolaná LPS (obr.11). Hladina TNF α byla vysoká dvě hodiny od podání LPS, ale klesala rychleji a znatelněji než v případě Il-6; po šesti hodinách byla ještě zvýšena, ale po zbytek experimentu již hladiny vyšší nebyly a klesly na úroveň kontrol. Ve vzorcích kontrolních zvířat byly hladiny TNF- α konstantní jen s nepatrnými rozdíly mezi skupinami.



Obr. 11: Změna hladiny TNF α v krvi potkana po aplikaci LPS v ZT6.

Hladinu TNF α u kontrolních zvířat označují tmavě šedé sloupce, hladinu TNF α u zvířat s aplikovaným LPS světle šedé sloupce. Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu ze vzorku získaného smícháním vzorků ze 3 zvířat.

5.2 STANOVENÍ EXPRESE FOSFORYLOVANÝCH FOREM KINÁZ ERK1/2 A GSK3B A TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ STAT3 POMOCÍ METODY IMUNOHISTOCHEMIE V EPIFÝZE POTKANA

Ve druhém experimentu jsme sledovali expresi fosforylovaných forem kináz pERK 1/2, pGSK3 β a transkripčních faktorů pSTAT3(y) (STAT3 fosforylovaný na tyrosinu) a pSTAT 3(s) (STAT3 fosforylovaný na serinu) v epifýze potkanů s aplikovaným LPS a v epifýze kontrolních potkanů. Sledovali jsme také rozdíly v hladinách těchto proteinů při aplikaci LPS v ZT 6 a ZT15.

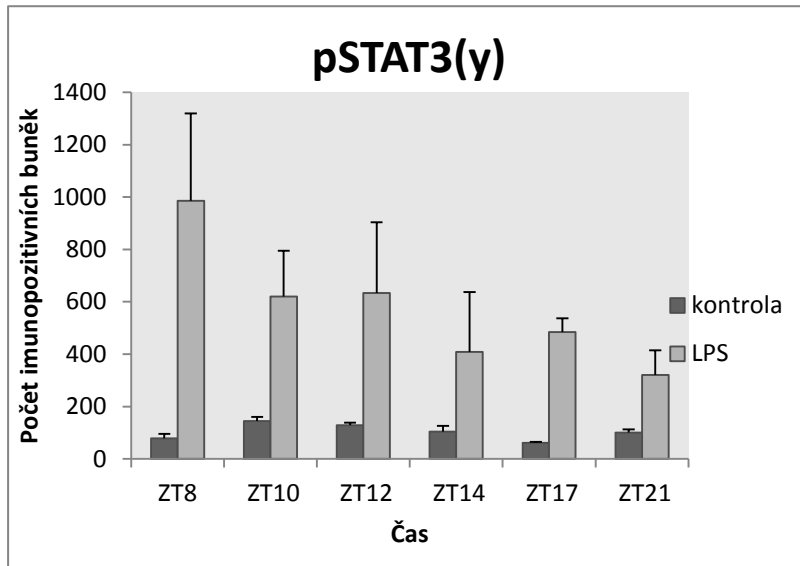
Výsledky ukázaly, že dávka 1mg/kg LPS prokazatelně zvýšila expresi pSTAT3(y) v epifýzách. Nejvyšších hladin dosahoval STAT3(y) dvě hodiny po aplikaci ve dne i v noci a poté pozvolna klesal. Avšak ještě po patnácti hodinách od aplikace byly rozdíly hladin pSTAT3(y) u experimentálních potkanů signifikantně zvýšeny oproti kontrolám (obr. 12A a 12B).

Lipopolysacharid také zvýšil hladinu pSTAT3(s) (Obr. 12C). Oproti pSTAT3(y) bylo zvýšení mnohem menší, nicméně i zde byla maximální indukce pSTAT3(s) naměřena dvě hodiny po podání LPS. U STAT3(s) máme k dispozici výsledky pouze z nočního experimentu.

Hladina pERK1/2 je u zvířat s aplikovaným LPS zvýšená oproti kontrolním zvířatům ve všech časových bodech (obr. 13A a 13B).

Hladina pGSK3 β je signifikantně vyšší u potkanů s aplikovaným LPS ve všech časových bodech (obr. 14A a 14B).

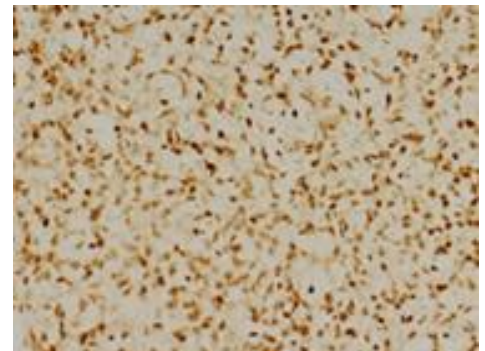
A



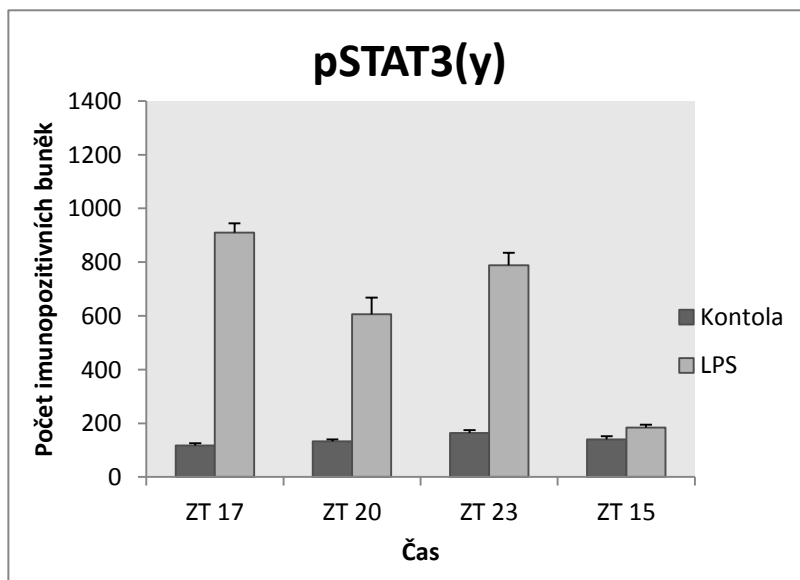
Kontrola v čase ZT 12



LPS v čase ZT 12



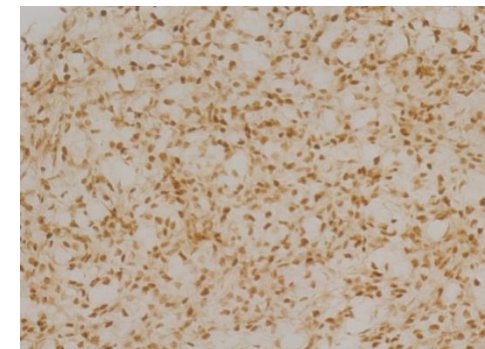
B



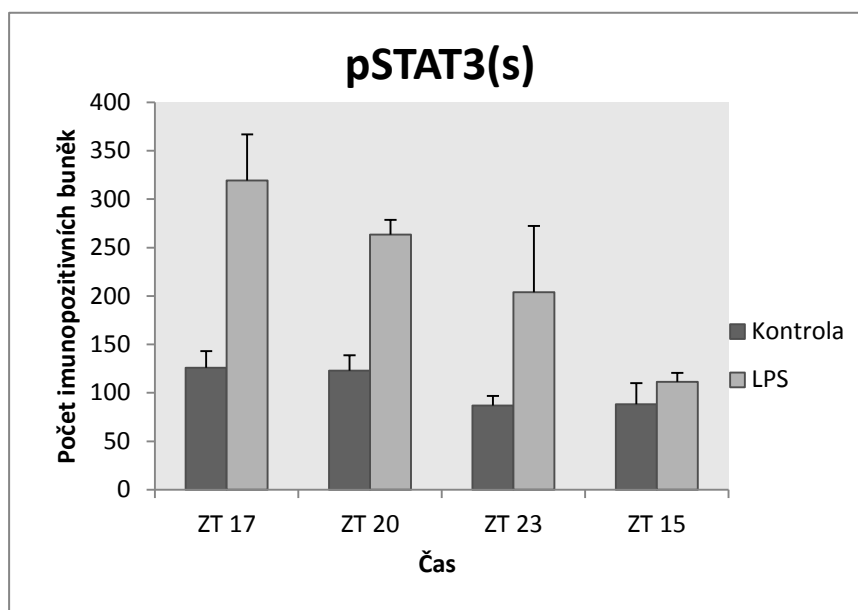
Kontrola v čase ZT 17



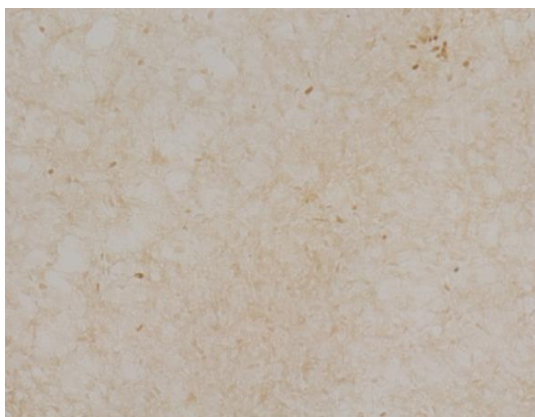
LPS v čase ZT 17



C



Kontrola v čase ZT 17

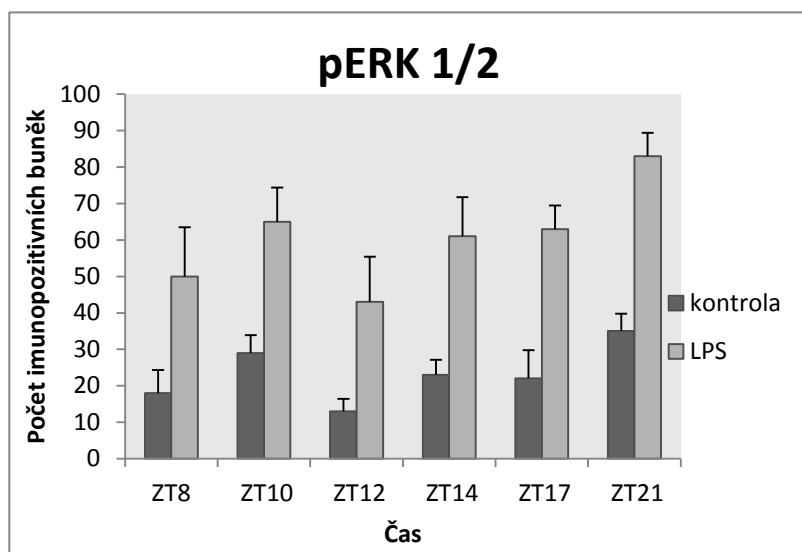
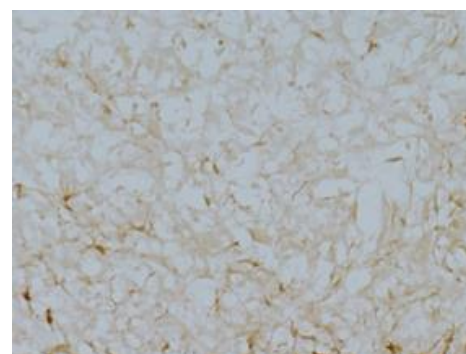
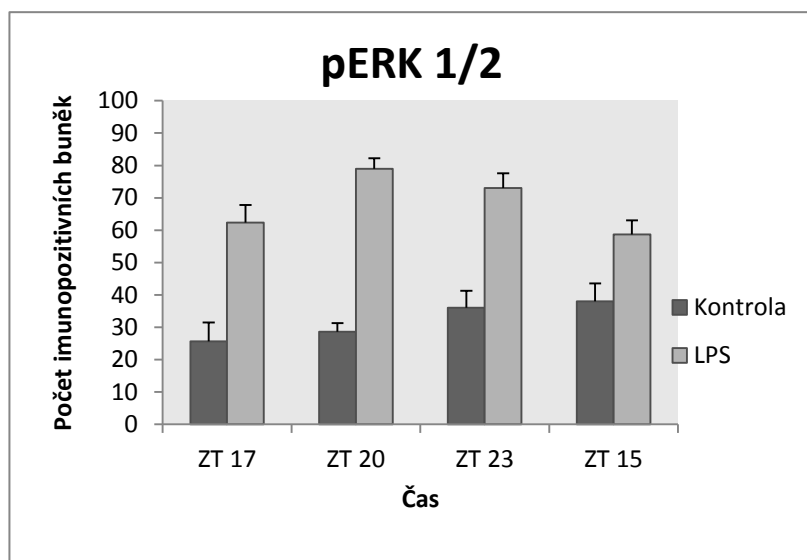


LPS v čase ZT 17



Obr. 12: Vliv lipopolysacharidu na expresi fosforylovaných forem transkripčních faktorů pSTAT3 v epifýze potkana.

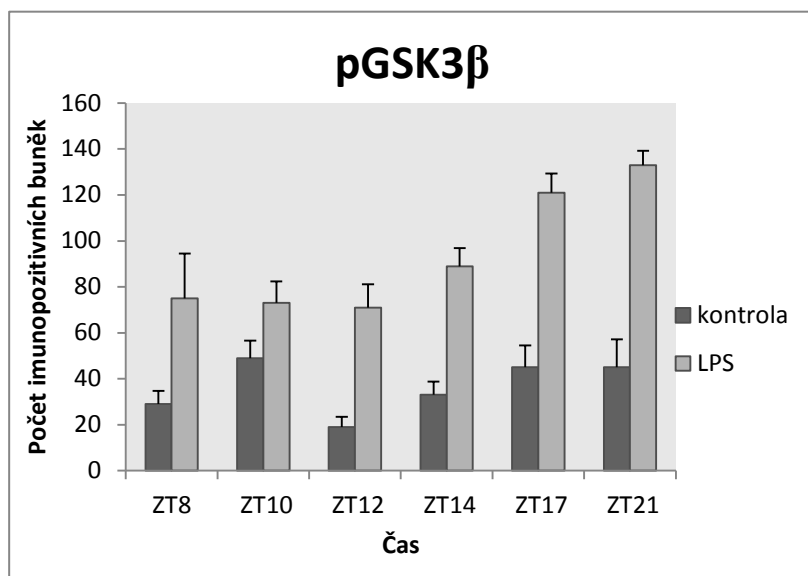
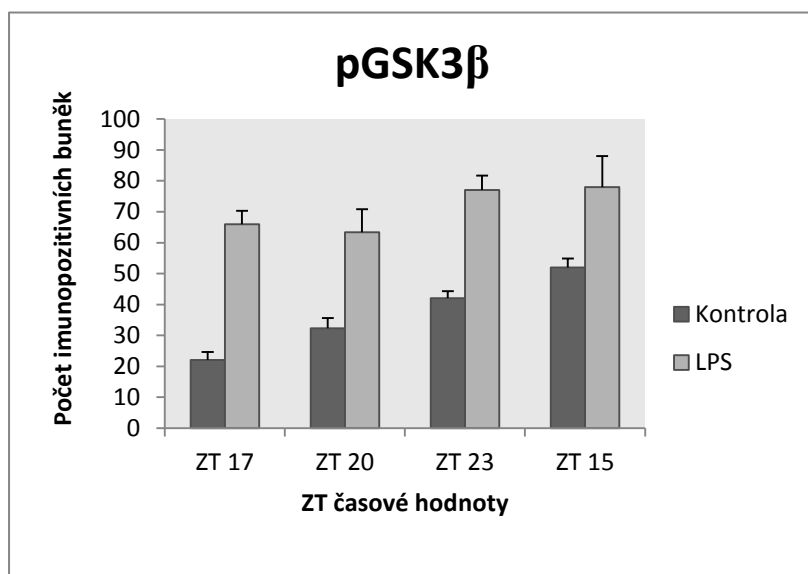
Množství STAT3(y) po aplikaci LPS ve dne v ZT6 (A), v noci v ZT15 (B) a STAT3(s) v ZT15 (C). Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu \pm SEM ze vzorku 3 zvířat. Přiložené snímky reprezentativních mikrofotografií epifýz ukazují rozdíly mezi potkany kontrolními a s aplikovaným LPS v časech ZT12 a ZT17.

A**Kontrola v čase ZT 12****LPS v čase ZT 12****B****Kontrola v čase ZT 20****LPS v čase ZT 20**

Obr. 13: Vliv lipopolysacharidu na expresi pERK1/2 v epifýze potkana.

Množství pERK1/2 po aplikaci LPS ve dne v ZT6 (A) a v noci v ZT15 (B).

Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu \pm SEM ze vzorku 3 zvířat. Přiložené snímky reprezentativních mikrofotografií epifýz ukazují rozdíly mezi potkany kontrolními a s aplikovaným LPS v časech ZT12 a ZT20.

A**Kontrola v čase ZT 12****LPS v čase ZT 12****B****Kontrola v čase ZT 20****LPS v čase ZT 20**

Obr. 14: Vliv lipopolysacharidu na expresi pGSK3 β v epifýze potkana.

Množství pGSK3 β po aplikaci LPS ve dne v ZT6 (A) a v noci v ZT15 (B).

Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu \pm SEM ze vzorku 3 zvířat. Přiložené snímky reprezentativních mikrofotografií epifýz ukazují rozdíly mezi potkany kontrolními a s aplikovaným LPS v časech ZT12 a ZT20.

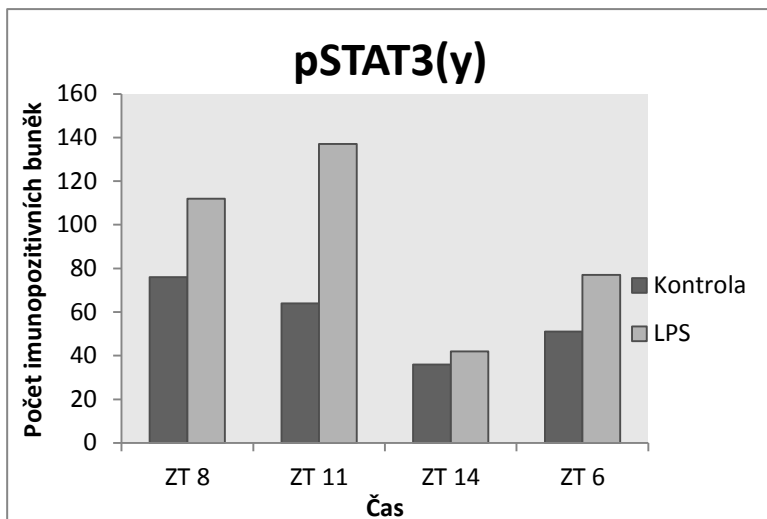
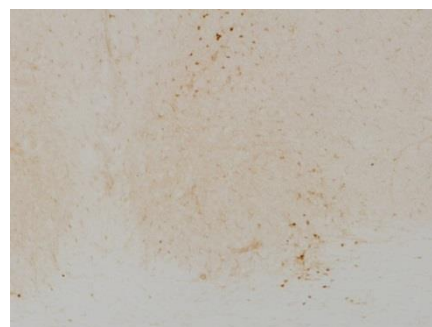
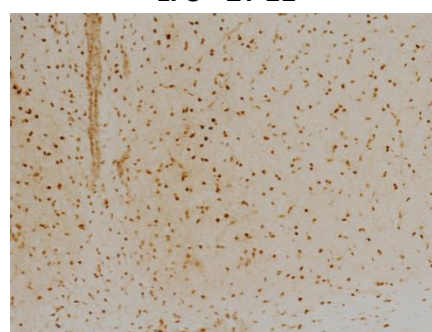
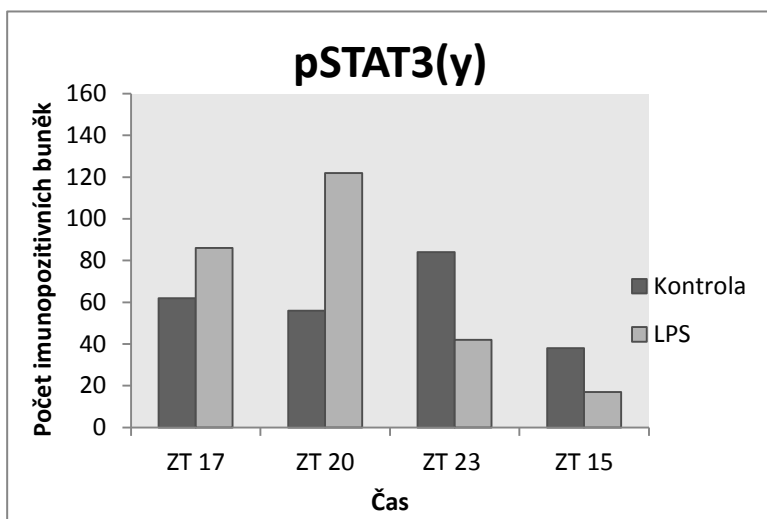
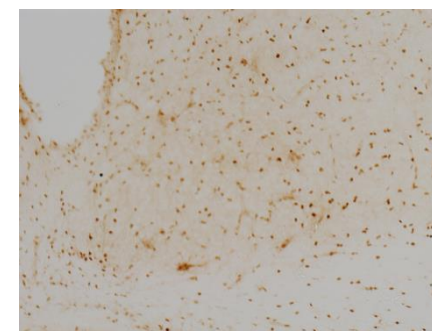
5.3 STANOVENÍ EXPRESE FOSFORYLOVANÝCH FOREM KINÁZ ERK1/2 A GSK3B A TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ STAT POMOCÍ METODY IMUNOHISTOCHEMIE V SCN POTKANA

Ve třetím experimentu jsme sledovali expresi fosforylovaných forem kináz ERK1/2, GSK3 β a transkripčních faktorů pSTAT3(y) a pSTAT3(s) v SCN kontrolních potkanů a po aplikaci LPS v ZT6 a ZT15. Výsledky shrnuté do této práce reprezentují pouze předběžná data získaná z jednoho zvířete, proto nejsou doložena statistickým vyhodnocením.

Výsledky naznačují, že hladiny proteinů transkripčních faktorů pSTAT3 byly v SCN vyšší než u kontrol pouze dvě a pět hodin po podání LPS jak v ZT6, tak v ZT15. Hladiny pSTAT3(y) se v dalších časových bodech spíše neliší (obr. 15). LPS aplikovaný v ZT6 mírně zvýšil také hladinu pSTAT3(s), dvě hodiny po aplikaci (obr. 16).

Expresi pERK1/2 byly posuzovány zvlášť pro dmSCN a vlSCN. Výsledky naznačují, že aplikace LPS v ZT6 snižuje vysokou hladinu pERK1/2 v dmSCN 2h a 5h po aplikaci a naopak ji zvyšuje 8h po aplikaci. Ve vlSCN způsobuje mírné zvýšení nízké endogenní hladiny pERK1/2. 24h po aplikaci LPS jsou obě hladiny pERK1/2 v obou částech SCN již vyrovnané (obr. 17). Aplikace LPS v ZT15 vyvolala mírné snížení endogenní hladiny pERK1/2, které je nejvýznamnější 8 h po aplikaci ve vlSCN. 24 hodin po aplikaci LPS se hladiny vyrovnaly podobně jako u aplikace v ZT6 (obr. 18).

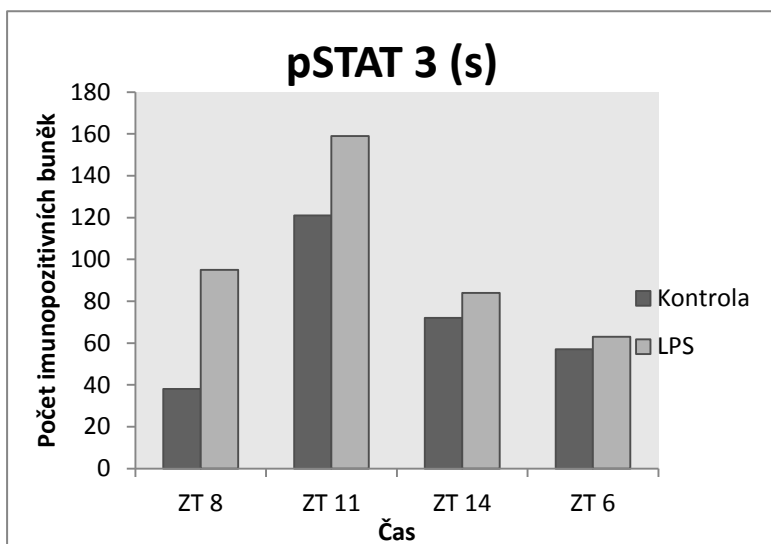
Hladiny pGSK3 β u potkanů s aplikovaným LPS jsou v porovnání s kontrolami zvýšeny nepatrně (obr. 19). Pouze aplikace v ZT15 naznačuje možnou upregulaci jeho hladiny po dvou hodinách a snížení vysoké endogenní hladiny po osmi hodinách od injekce LPS.

A**Kontrola - ZT 11****LPS - ZT 11****B****Kontrola - ZT 20****LPS - ZT 20**

Obr. 15: Vliv LPS na expresi fosforylovaných forem transkripčního faktoru STAT3(y) v SCN potkana.

Množství STAT3(y) po aplikaci LPS v ZT6 v SCN (A) a v ZT15. Snímek SCN ukazuje rozdíly mezi potkany kontrolními a potkany s aplikovaným LPS v ZT11 a ZT20.

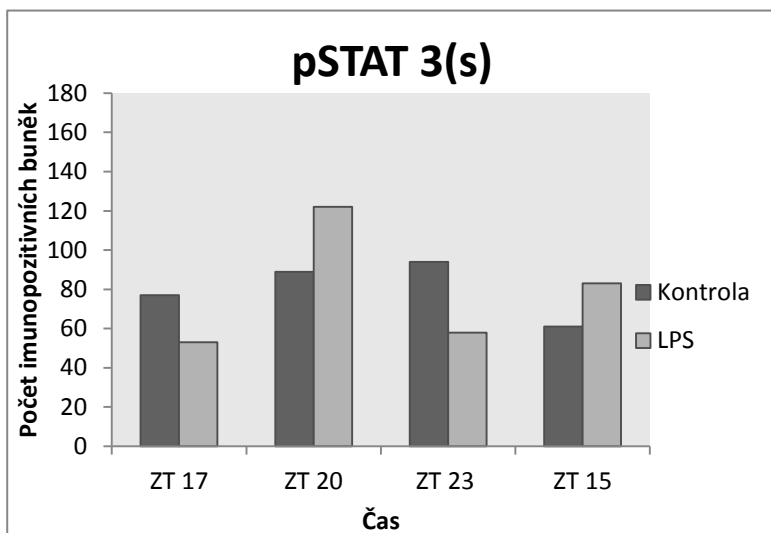
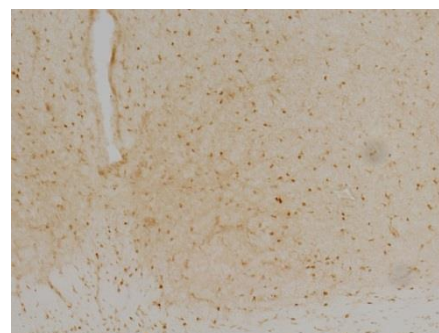
A



Kontrola - ZT 11



LPS - ZT 11



Kontrola - ZT 20

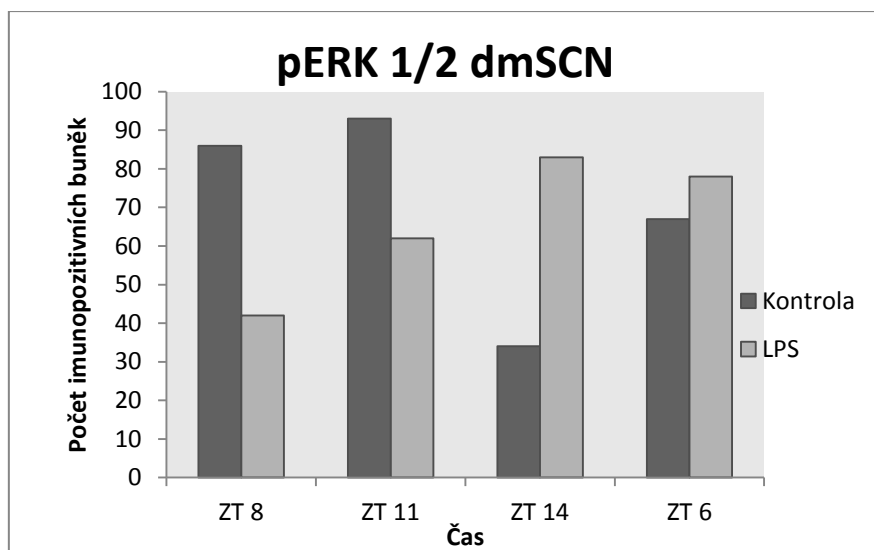
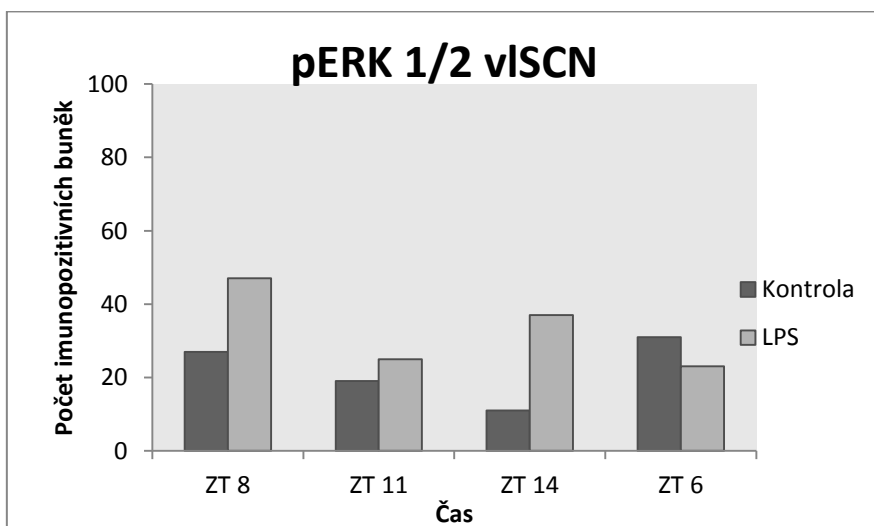
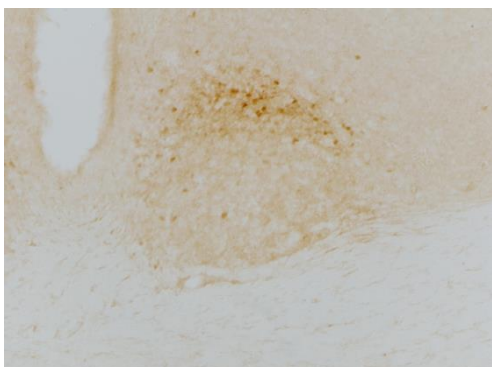
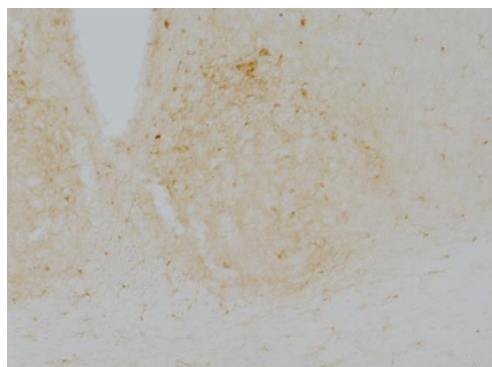


LPS - ZT 20



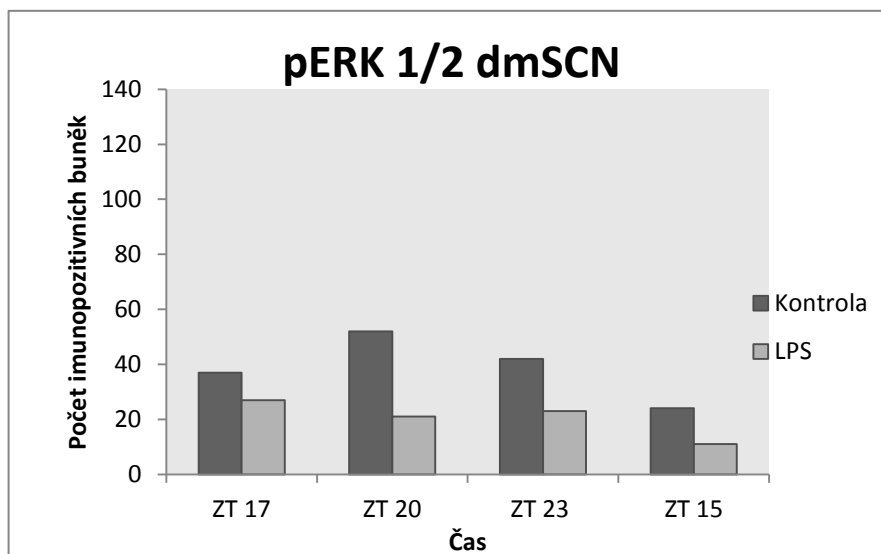
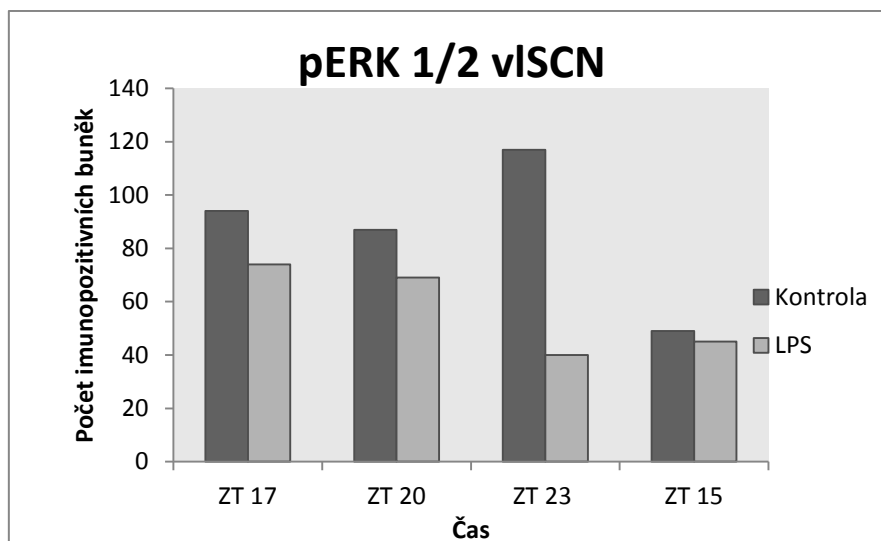
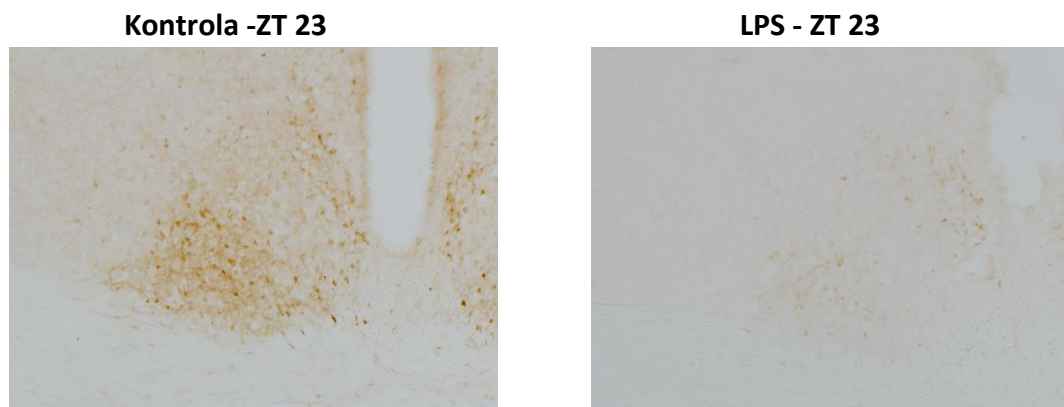
Obr. 16: Vliv lipopolysacharidu na expresi fosforylovaných forem transkripčního faktoru STAT3(s) v SCN potkana.

Množství STAT3(s) po aplikaci LPS v ZT6 v SCN (A) a v ZT15. Snímek SCN ukazuje rozdíly mezi potkany kontrolními a s aplikovaným LPS v ZT11 a ZT20.

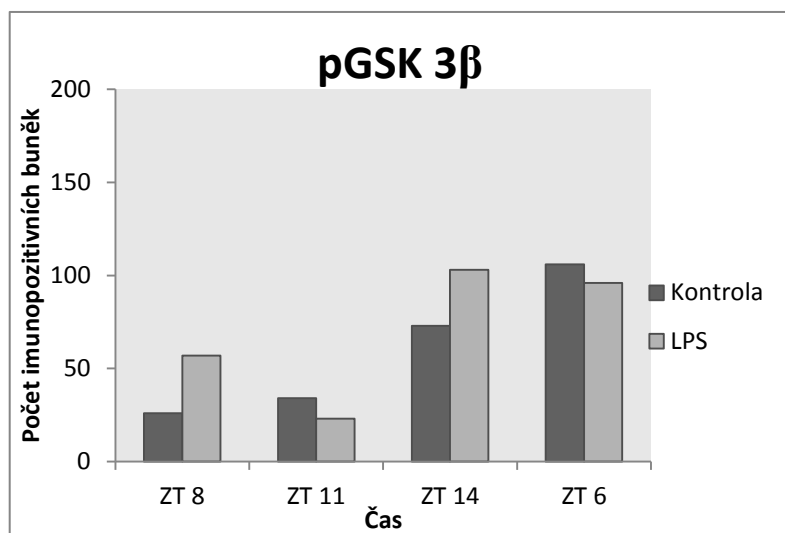
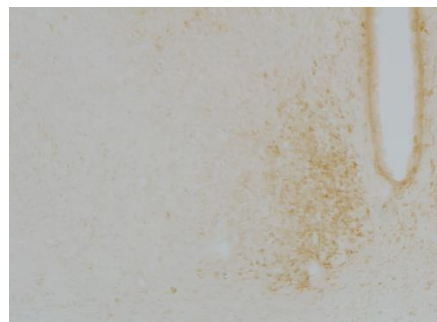
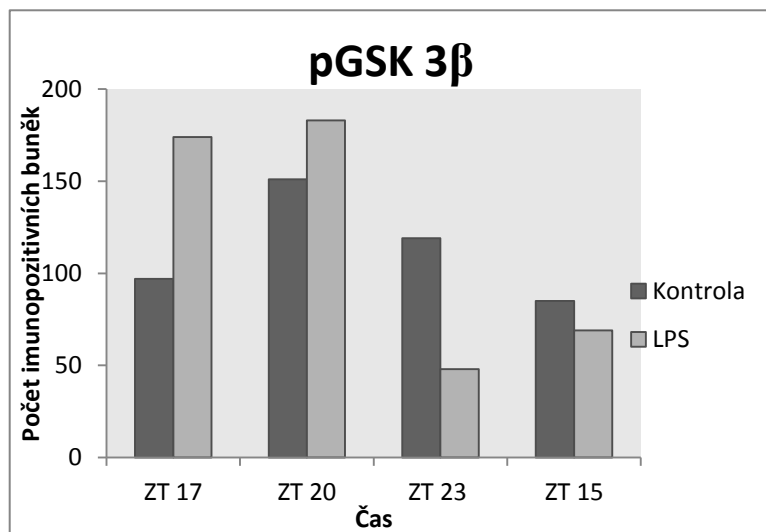
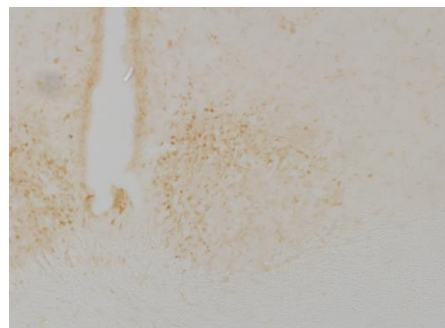
A**B****C****Kontrola -ZT 11****LPS - ZT 11**

Obr. 17: Vliv lipopolysacharidu na indukci pERK1/2 v SCN potkana.

Množství pERK1/2 po aplikaci LPS v ZT6 v dmSCN (A) a ve vlSCN (B). Každý sloupec představuje hodnotu pouze z jednoho zvířete. Snímek SCN ukazuje rozdíly mezi dmSCN a vlSCN u obou skupin zvířat, tj. kontrol a LPS potkanů v ZT 11(C).

A**B****C**

Obr. 18: Vliv lipopolysacharidu na indukci pERK1/2 v SCN potkana. Množství pERK1/2 po aplikaci LPS v ZT15 v dmSCN (A) a ve vlSCN (B). Každý sloupec představuje hodnotu pouze z jednoho zvířete. Snímek SCN ukazuje rozdíly mezi dmSCN a vlSCN u obou skupin zvířat, tj. kontrol a LPS potkanů v ZT 23(C).

A**Kontrola - ZT 14****LPS - ZT 14****B****Kontrola - ZT 23****LPS - ZT 23**

Obr. 19: Vliv LPS na indukcí pGSK3 β v SCN potkana.

Množství pGSK 3 β po aplikaci LPS v ZT6 v SCN (A) a v ZT15. Snímek SCN ukazuje rozdíly mezi potkany kontrolními a s aplikovaným LPS v ZT14 a ZT23.

6. Diskuze

V této práci jsme se zabývali vlivem endotoxinu lipopolysacharidu na cirkadiální systém potkana. Cílem práce bylo popsat vliv akutně podaného lipopolysacharidu v dávce 1 mg/kg na hladinu kináz pGSK3 β , pERK1/2 a hladiny transkripčních faktorů pSTAT3 v SCN a epifýze potkana, přičemž jsme si všímali rozdílů při aplikaci LPS ve dne a v noci. Vliv LPS na imunitní systém jsme ověřovali měřením hladiny interleukinu IL-6 a TNF α v krvi potkana.

6.1 VLIV AKUTNÍHO PODÁNÍ LPS NA HLADINY CYTOKINŮ IL-6 A TNF α V KRVI POTKANA

Podobně jako jiné laboratoře jsme prokázali, že LPS indukuje vzestup zánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α v plazmě (Okada et al., 2008; Castanon-Cervantes et al., 2010). To ukazuje, že dávka 1mg/kg LPS, kterou jsme zvolili pro naše experimenty velmi významně aktivuje imunitní systém a může tedy ovlivňovat i další fyziologické procesy.

Při pokusu prováděném na myších bylo zjištěno, že citlivost na LPS je ovlivněna dobou, ve které byl LPS zvířeti aplikován a že aplikace na začátku subjektivního dne vyvolává silnější indukci prozánětlivých faktorů než aplikace stejného množství LPS na začátku noci (Marpegan et al., 2009). Naše práce zkoumala vliv LPS na hladinu cytokinů v plazmě pouze při aplikaci během dne, kdy byl zaznamenán signifikantní nárůst obou cytokinů. TNF α je indukován poměrně brzy po aplikaci LPS, jeho exprese je řízena signalizační kaskádou, do které jsou zapojeny TLR4 receptory a transkripční faktor NF- κ B (Miguel et al. 2007). Tento nárůst trvá několik hodin, poté se v plazmě se postupně začíná zvyšovat hladina cytokinů IL-1 β , IL-12, IL-13 a GM-CSF, které pomáhají snižovat vazbu LPS na TLR4 receptory (Castanon-Cervantes et al., 2010). IL-6 je považován za jednoho z hlavních ukazatelů sepse (Bozza et al., 2007), vzrůst hladin IL-6 v mozku je často spojován s narušením behaviorálních rytmů (Dantzer et al., 2008).

Většina prací zabývajících se působením LPS na cirkadiální systém zkoumá především změny behaviorální. Studie na myších prováděná v Argentíně ukázala, že podání LPS vyvolá fázový posun v pohybové aktivitě myši a že aktivace imunitního systému může fungovat jako

synchronizační signál biologických hodin (Marpegan et al., 2005). Další studie z Japonska potvrdila, že aplikace LPS způsobuje narušení rytmů v pohybové aktivitě u potkanů. U zvířat, kterým byl podán LPS došlo ke snížení celkové pohybové aktivity, což přetrvávalo dva dny od podání LPS (Okada et al., 2008). Fázové posuny cirkadiánních rytmů v chování vyvolané LPS jsou regulovány aktivací transkripčního faktoru NFκB (Marpegan et al., 2004). Naše práce nezkoumala primárně behaviorální aspekty působení LPS, ale měla za cíl objasnit změny indukované LPS v cirkadiánním systému na molekulární úrovni.

6.2 VLIV AKUTNÍHO PODÁNÍ LPS NA EXPRESI FOSFORYLOVANÝCH FOREM KINÁZ ERK1/2 A GSK3B A TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ STAT3 V EPIFÝZE POTKANA

Různé studie zabývající se vlivem LPS na cirkadiánní systém prokázaly, že endotoxin LPS nepůsobí pouze na SCN, ale také na periferní oscilátory. Po podání LPS aktivují buňky imunitního systému imunitní odpověď a vysílají do těla signály (např. ve formě prozánětlivých cytokinů), které jsou zachyceny epifýzou a zajišťují zpětnou vazbu pro regulaci její vlastní funkce. Melatonin hraje zásadní roli v modulaci imunitních a cirkadiánních dějů (Carillo-Vico et al., 2013). Mnohé práce naznačují blízký vztah mezi cirkadiánním a imunitním systémem. Zánětlivé mediátory jako prozánětlivé cytokiny a transkripční faktor NFκB se podílejí na regulaci molekulárního mechanismu biologických hodin (Marpegan et al., 2005). Přestože LPS vyvolává fázové posuny cirkadiánního rytmu podobné posunům indukovaným světlem, pan Marpegan zjistil, že fázové posuny cirkadiánních rytmů vyvolané LPS jsou regulovány primárně aktivací transkripčního faktoru NFκB (Marpegan et al., 2004).

Epifýza může být regulována skrze různé prozánětlivé cytokiny, např. IFNγ, IL12, TNFα (Withyachumnarnkul et al., 1990; Lissoni et al., 1998; Fernandes et al., 2006) a také buňkami imunitního systému GM-CSF (z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) a G-CSF (z angl. granulocyte colony-stimulating factor). Patogeny a cizí potencionálně škodlivé molekuly, včetně LPS aktivují transkripci NFκB jak v pinealocytech, tak v makrofázích. Aktivovaná NFκB dráha blokuje syntézu melatoninu v pinealocytech a zároveň indukuje syntézu melatoninu v makrofázích (Markus et al., 2013). Tato dvousměrná komunikace mezi epifýzou a neepifyzárními producenty melatoninu je umožněna díky specifickým

melatoninovým receptorům M1 a M2 (MTR), které se nacházejí na plazmatických membránách i v jádrech imunokompetentních buněk (např. T-lymfocytech) a imunitních orgánů (Calvo et al., 2013). Interakce melatoninu s MTR spouští aktivaci signální dráhy ERK1/2 v epifýze potkana (Luchetti et al., 2009). Aktivované makrofágy jsou pak hlavním zdrojem cytokinů IFN γ , IL1, IL12 a TNF α , stejně jako prostaglandinů a proteinu komplementu (Seljelid et al., 1993; Gordon et al., 2010). Melatonin inhibuje TLR4 receptory zprostředkovanou expresi TNF α , IL1 β , IL6, IL8 a IL10 v makrofázích, ze kterých sám vznikl po stimulaci LPS (Xia et al., 2012).

Kináza ERK1/2 byla prokázána v epifýze. Syntéza melatoninu v epifýze je úzce regulována nočním uvolňováním norepinefrinu ze sympatických nervů, kterými je tento orgán inervován (Klein et al., 1991). Uvolňování NE je řízeno centrálními hodinami v SCN, které v noci posílají do epifýzy stimulační signály skrze centrální i periferní nervový systém (Moore et Klein, 1974). Vzhledem k tomu, že cirkadiální hodiny v SCN jsou synchronizovány převážně světlem skrze neuronální signály přenášenými přes RTH, je logické že také stimulace epifýzy podléhá enviromentálnímu L:D cyklu. Kromě signalizační dráhy zahrnující stimulaci NE, která vede skrze cAMP, PKA A a pCREB k transkripci *aanat*, byly nalezeny stejné signalizační dráhy, které však indukují jiné cílové geny CREB. Je jich přibližně 600 (Bailey et al., 2009) a některé proteinové produkty těchto genů jsou významnými regulátory transkripce *annat* (Ho et. Chik, 2010). Patří mezi ně kináza ERK1/2 (Price et al., 2004a), indukovatelný cAMP časný represor (ICER) (Stehle et al., 1993) a mnohé další.

Mechanismus, kterým aktivovaná GSK3 β kontroluje neurofyzilogické rytmy v SCN by mohl pomoci objasnit její roli také v epifýze. Naše výsledky potvrdily signifikantní zvýšení pGSK3 β po podání LPS ve všech časových bodech. Studie, která by zkoumala zapojení signální kaskády GSK3 do řízení cirkadiálních rytmů v epifýze a pomohla nám osvětlit, jakými mechanismy signalizační kaskáda pGSK3 β funguje bohužel není v současné době dostupná.

Naše výsledky také poprvé ukazují přítomnost STAT3 v epifýze potkana. Akutní podání LPS indukovalo vzestup hladiny pSTAT3(s) a pSTAT3(y) již po dvou hodinách od aplikace nezávisle na době, kdy byl LPS podán. STAT3 i NF- κ B jsou aktivovány cytokiny jako odpověď na zánětlivou reakci vyvolanou LPS. Jejich vzájemná interakce udržuje stabilitu celého systému.

6.3 VLIV AKUTNÍHO PODÁNÍ LPS NA EXPRESI FOSFORYLOVANÝCH FOREM KINÁZ ERK1/2 A GSK3B A TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ STAT3 V SCN POTKANA

Současná věda předpokládá velmi blízký vztah mezi nervovým, endokrinním a imunitním systémem, jehož molekulární podstatou je zřejmě propojení signálních drah a různých molekul, které mohou vzájemně interagovat a regulovat tak své funkce (Calvo et al., 2013). Cirkadiánní systém je tedy ovlivňován signalizačními molekulami imunitního systému a současně sám imunitní systém reguluje (Castanon-Cervantes et al., 2010; Logan et al., 2012). Při zkoumání souvislostí mezi imunitními reakcemi a narušením cirkadiánních rytmů, došlo mnoho autorů k závěru, že systémové podání LPS vyvolává autonomní endokrinní a behaviorální změny, které vyplývají z indukovaných změn v mozku (Linthorst et Reul, 1998; Matsunaga et al., 2000) a že efekt působení imunitního systému na cirkadiánní rytmy je zprostředkován prozánětlivými cytokiny v mozku (Kwak et al., 2008), zejména pak TNF α v SCN (Leone et al., 2012). Po aplikaci LPS se v mozku se zvyšují hladiny prozánětlivých cytokinů jako je IL-1, IL-6, IL-8 a TNF α (Herber et al., 2006; Quin et al., 2007).

Při srovnání hladin fosforylovaných forem kináz GSK3 β , ERK1/2 a hladiny transkripčních faktorů STAT3 indukovaných LPS v buňkách SCN a epifýzy naznačily naše výsledky mnohem vyšší změnu hladiny těchto proteinů v epifýzách. To může souviset s přímým působením mediátorů na epifýzu bez nutnosti projít HEB, narozdíl od SCN. LPS nepřekračuje HEB v mozku, ale může se vázat na specifické receptory v cévním endotelu mozku, což způsobuje uvolnění různých prozánětlivých cytokinů a následně také NO (Singh et Jiang, 2004). LPS indukované cytokiny mohou prostupovat mozkem skrze propustné spoje v endotelu (Romanovsky et al., 2003) a vázat se na TLR4 receptory, které jsou exprimovány přímo v SCN (Lundkvist et al., 1999; Sadki et al., 2007). V SCN se nachází také transkripční faktor NF κ B, jeho přítomnost a aktivita byla prokázána v práci zkoumající LPS indukovaný fázový posun (Marpegan et. al, 2004, 2005). LPS může působit na hodiny včetně uvolňování cytokinů IL-1 β a TNF α , které působí na SCN (Leone et al., 2006). Zdá se tedy, že LPS působí na funkci cirkadiánního systému v SCN nepřímo skrze prozánětlivé cytokiny jako jsou IL-6 a TNF α , díky vazbě na TLR4 receptory (Gay et al., 2006), což jsou hlavní receptory aktivující signální kaskády, kterými LPS nastavuje cirkadiánní rytmy (Paladino et al., 2010).

Studie prováděná v Japonsku na řízcích SCN hlodavců prokázala, že aktivovaná MAPK je signifikantně rozpoznatelná v SCN, hraje nezbytnou roli při udržování robustnosti neuronální aktivity rytmů i cirkadiánní exprese v hodinových genech a podílí se také na jejich regulaci (Akashi et al., 2008). To naznačuje nepostradatelnou roli MAPK v SCN při řízení cirkadiánních oscilací a možnost funkčního propojení mezi neuronální aktivitou a molekulární smyčkou hodin v SCN skrze MAPK signalizační kaskádu. Jedna z prvních prací pojednávající o roli MAPK v SCN, ukázala u myši držných ve stálé tmě signifikantní rozdíly v hladině fosforylovaných forem MAPK kinázy ERK1/2 v SCN během cirkadiánního dne, s vysokými hladinami během subjektivního dne a nízkými hladinami během subjektivní noci (Obrietan et al., 1998). Další studie prováděná v UK na křečcích potvrdila, že hladiny fosforylovaných forem proteinů ERK1/2 oscilují během dne jak v režimu L:D, tak za konstantních podmínek, v obou případech s maximem exprese ERK1/2 během dne a minimem jeho exprese v průběhu noci (Coogan et Piggins, 2003). Exprese pERK se výrazně liší v jednotlivých oblastech SCN. Byly popsány dva endogenní rytmy v hladině pERK s různými fázemi (Obrietan et al., 1998). Předchozí výsledky naší laboratoře ukázaly vysokou hladinu proteinu pERK1/2 v dmSCN u kontrol během subjektivního dne, což koresponduje se studií pana Leeho, který zjistil, že protein pERK1/2 je spontánně exprimován v oblasti slupky (tedy dmSCN) s maximem během subjektivního dne, se schématem podobným buňkám syntetizujícím AVP (Lee et al., 2002). Během subjektivní noci je protein pERK1/2 exprimovaný výhradně v jádře (vlSCN), což taktéž koresponduje s našimi výsledky, zejména u kontrol (Lee et al., 2002; Nakaya et al., 2003). Signifikantní rozdíl v expresi pERK1/2 v suboblastech SCN během dne a noci je dán odlišnou funkcí těchto dvou oblastí SCN (Hamada et al., 2001). Fosforylace ERK1/2 je klíčovou událostí při fázovém zpoždění indukovaném světlem během brzké subjektivní noci (Butcher et al., 2002). Světelný pulz během noci způsobuje okamžité krátkodobé zvýšení pERK1/2 v celém SCN (Butcher et al., 2003) a patřičné fázové posuny behaviorálních rytmů (Coogan et Piggins, 2003). Přenastavení fáze periody hodin v SCN vyžaduje změny v genové expresi (Zhang et al., 1996) a v souvislosti s touto myšlenkou docházíme k závěru, že je-li fosforylovaný protein ERK součástí mechanismu přenastavování fáze molekulárních biologických hodin, pak musí aktivace jeho signální kaskády pozměňovat genovou expresi biologických hodin (Coogan et Piggins, 2004). Domnělými cíli pro ERK kaskádu jsou transkripční faktory, které mají vazebná místa na promotorech hodinových genů. Příkladem v SCN je protein CREB, který se váže na

CRE sekvenci promotoru shodnou vazebnou sekvencí, jaká je přítomna na světlem-indukovaných hodinových genech a po fosforylaci na serinových zbytcích řídí transkripci těchto genů (Ginty et al., 1993; Gau et al. 2002). Cirkadiální a světelné stimuly regulují fosforylaci proteinu CREB (Ginty et al., 1993; Obrietan et al. 1999; Gau et al. 2002). Transkripce zprostředkovaná CRE je také pod cirkadiální i světlem řízenou kontrolou (Obrietan et al. 1999) a je vyžadovaná k světlem indukovanému přenastavení fáze hodin a indukci hodinového genu PER1 (Tischkau et al., 2002; Trávníčková-Bendová et al., 2002). CREB není fosforylován skrze ERK kinázu přímo, ERK nejdříve fosforyluje p90 ribosomální s6 kinázu (p90RSK), která následně fosforyluje CREB (Roberson et al., 1999). Bylo zjištěno, že p90RSK představuje klíčovou spojnicí v ERK-CREB genové expresi signální kaskády v epifýze obratlovců (Ho et al., 2003a). Dalším domnělým substrátem pro kinázu ERK1/2 v SCN je Elk-1, komplex tří transkripčních faktorů, který se po fosforylaci váže na sérum responsní element (SRE) shodnou sekvencí jako CRE (Coogan et Piggins, 2003). Podobně jako CRE jsou také SRE přítomny na sekvencích promotorů světlem indukovaných hodinových genů (Wilsbacher et al., 2002). CREB a Elk1 jsou tedy hlavními prvky signální kaskády ERK1/2 v cirkadiálních hodinách. Naše studie naznačila, že by LPS mohl ovlivnit expresi pERK1/2 v SCN potkanů. Po aplikaci LPS v ZT6 se neměnila hladina pERK1/2 ve vlSCN, zato v dmSCN byla snížena vysoká endogenní hladina ve dne a zvýšena nízká hladina v noci. Zdá se tedy, že LPS by mohl udržovat stabilní zvýšenou hladinu pERK v dmSCN a tím narušit její cirkadiální rytmicitu. Jeho aplikace v ZT15 snižuje více jeho nízkou noční hladinu v dmSCN. Může se proto zdát, že efekt LPS je okamžitý, krátkodobý a vede k potlačení endogenní exprese pERK1/2 v dmSCN. Změny v pozdějších časových bodech mohou souviset s postupnou obnovou přirozené rytmicity.

Mnohé studie prokázaly, že také kináza GSK3 β je schopná fosforylovat téměř všechny komponenty molekulární smyčky biologických hodin, jako jsou PER2, CLOCK, BMAL1 a REV-ERB α (Litaka et al., 2005, Wang et al., 2006; Spengler et al., 2009; Kurabayashi et al., 2010). GSK3 vykazuje denní rytmus ve fosforylaci v SCN (Iwahana et al., 2004; Litaka et al., 2005). Přestože se někteří vědci domívají, že rytmická aktivita GSK3 je nezbytná pro zajištění robustnosti cirkadiálních rytmů (Paul et al., 2012), přesná úloha této kinázy není zatím stále objasněná. Předchozí výsledky naší laboratoře ukázaly cirkadiální rytmus v množství exprimovaného proteinu pGSK3 β . Hladina pGSK3 β byla vysoká během noci a nízká během

dne. Hladiny pGSK3 β u potkanů s aplikovaným LPS byly v porovnání s kontrolami zvýšeny nepatrně, kromě aplikace v čase ZT15. Dvě hodiny po podání LPS v ZT 15 došlo k signifikantní upregulaci hladiny GSK3 β , která se navrátila k normálním hodnotám zhruba po šesti hodinách. LPS tedy krátkodobě narušil rytmus v aktivitě pGSK3 β , což potvrzuje hypotézu, že při našem pokusu došlo vlivem LPS k narušení cirkadiánních rytmů. Dysregulace v tvorbě rytmů pGSK3 byla pozorována také u mnoha psychických poruch a u nemocí způsobených stárnutím, souvisejících s narušením cirkadiánních rytmů (Gomez-Sintez et al., 2011; Jope et al., 2011). V CNS slouží k produkci prozánětlivých molekul hlavně mikroglie a astrocyty. GSK3 v těchto buňkách podporují produkci prozánětlivých cytokinů (IL6, TNF α), chemokinů (IL8) a NO, což opět ukazuje propletenost obou systémů a důležitost pGSK3 pro modulaci cirkadiánních a imunitních odpovědí.

Signalizaci skrze STAT3 využívá mnoho cytokinů (Darnell et al., 1994). Transkripční faktory STAT jsou důležitými faktory v celé řadě fyziologických procesů, ale jejich vliv na cirkadiánní systém v SCN a epifýze dosud nebyla příliš popsán. Naše výsledky ukazují přítomnost STAT3 a v SCN. Aplikace LPS zvýšila hladinu pSTAT3 po dvou hodinách, hladina pSTAT3 byla v obou částech SCN po podání LPS přechodně zvýšena oproti kontrolám. V mozku není role STAT 3 jako zánětlivého faktoru zcela objasněná, je však aktivován během sepse a kooperací s GSK3 napomáhá kontrolovat produkci IL-6, vyvolanou např. LPS, dá se tedy předpokládat, že také STAT3 se účastní modulace cirkadiánního a imunitního systému.

7. Závěr

Při zkoumání vlivu LPS na cirkadiánní systém, ukázaly naše výsledky signifikantní zvýšení hladin cytokinů TNF α a IL-6 u LPS potkanů krátce po podání LPS, což potvrzuje poměrně rychlou aktivaci imunitní odpovědi v reakci na LPS, typickou pro neadaptivní imunitní odpověď. U kontrol nedošlo k výraznému zvýšení hladin těchto cytokinů.

Cílem této práce bylo také zjistit vliv akutně podaného LPS na hladiny exprese fosforylovaných forem kináz ERK1/2, GSK3 β a transkripčních faktorů STAT v SCN a epifýze potkana. Imunohistochemické stanovení v epifýze prokázalo jednoznačný nárůst hladin pERK1/2 i pGSK3 β a také prokazatelné zvýšení hladin pSTAT3(y). LPS slabě zvýšil také hladinu STAT3(s) a výsledky naznačují, že epifýza silně reaguje na prozánětlivé faktory indukované lipopolysacharidem. V SCN výsledky naznačují spíše drobné změny v hladinách fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK-3 β a transkripčního faktoru STAT3. To naznačuje, že v mozku brání HEB volnému působení LPS a aktivace imunitního systému lipopolysacharidem ovlivňuje SCN nepřímo prostřednictvím cytokinů a jiných neuromediátorů, či aferentací z jiných oblastí mozku. Což prokazuje interakce mezi imunitním a cirkadiánním systémem.

8. Seznam použité literatury

- Abe, M. et al., 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, 22(1): 350-356.
- Abrahamson, E.E. et Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, 916(1-2): 172-191.
- Ader, R. et al., 1995. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet*, 345:99-103.
- Akashi, M. et al., 2002. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKI epsilon) and CKI delta in cultured cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6): 1693-1703.
- Akashi, M. et al., 2008. Mitogen-activated protein kinase is a functional component of the Autonomic circadian system in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 28(18):4619-4623.
- Akira, S. et al., 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77:63-71.
- Akira, S. et Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7):499-511.
- Annane, D. et al., 2005. Septic shock. *Lancet* 365:63-78.
- Arendt, J., 1995. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. Chapman Hall, London, pp201-285.
- Arendt, J., 2005. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J. Biol. Rhythms*, 20:291-303.
- Baba, K. et al., 2009. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 15043-15048.
- Bae, K. et al., 2001. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30: 525-536.
- Bailey, M. et al., 2009. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling. *J. Biol. Chem.*, 284:7606-7622.
- Balsalobre, A., 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and tissue research*, 309(1):193-9.
- Baller R., et al. 1997. The rat arylkalamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.*, 272:6967-6985.
- Beasley, D. et Eldridge, M. 1994. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically induce NO synthase in rat vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*, 266:197-1203.
- Beurel, E. et Joep, R. S., 2008. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J. Biol Chem.* 283(32): 21934-21944.
- Belinda, L.W. et al. 2008. SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. *Mol Immunol.*, 45:1732-1742.
- Biello, S.M., et al., 1997. Neuropeptide Y and glutamate block phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience*, 77(4), pp.1049-1057.
- Bilu, C. et Kronfeld-Schor, N., 2013. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. *Chronobiol Int.*, 30(6): 828-836.
- Blalock, J. E., 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*, 15:504-511.
- Borjigin, J. et al., 1995. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin-n-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378: 783-785.
- Bozza, P.T. et al., 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.*, 113:30-49.
- Brown, M.D. et D.B. Sacks. 2009. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling*, 21:462-469.
- Brownstein, M. J. et al., 1974. Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science*, 185:267-269.
- Butcher, G. Q. et al., 2002. The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem*, 277(33): 29519-29525.
- Butcher, G. Q. et al., 2003. Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.*, 90: 3854-3863.
- Butcher, G. Q. et al., 2005. Light stimulates MSK1 activation in the suprachiasmatic nucleus via a PACAP ERK/MAP kinase-dependent mechanism. *J Neurosci*, 25(22): 5305-5313.
- Calvo, R. et al., 2013. The role of melatonin in the cells of the innate immunity. *J. Pineal Res.*, 55:103-120.
- Carillo-Vico, A. et al., 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance, possible role as intracrine, autocrine and paracrine substance. *Faseb J*, 18:537-539.
- Carillo-Vico, A. et al., 2005. A review of multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27:189-200.
- Carvalho-Sousa, C.E. et al., 2011. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for

- tumor necrosis factor. *Frontiers in Endocrinology*, 2:1–10.
- Castanon-Cervantes, O. et al., 2010. Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *J Immunol*, 185:5796-5805.
- Claustrat, B. et al., 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9:11–24.
- Coogan, A. N. et Piggins, H. D., 2003. Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J. Neurosci.*, 23:3085-3093.
- Coogan, A. N. et Piggins, H. D., 2004. MAP kinases in the mammalian circadian system - Key regulators of clock function. *J Neurochem*, 90:769–775.
- Coogan, A. N. et Wyse, C. A., 2008. Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain Res.*, 1232:104-112.
- Damiola, F. et al., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14:2950-2961.
- Dantzer, R. et al., 2006. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin.*, 24:441-460.
- Dantzer, R. et al., 2008. From Inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9:46-56.
- Darnell, J. E. Jr. et al., 1994. Jak–STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264:1415–1421.
- DeBruyne, J.P. et al., 2006. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50: 465–477.
- Delves, P. J. et Roitt, I. M., 2000. The immune system. Review; First of two parts. *N Engl J Med.*, 343(1):37-49.
- Dibner, C. et al., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev. Physiol.*, 72:517-549.
- Dochi, M. et al., 2009. Shift work is a risk factor for increased total cholesterol level: a 14-year prospective cohort study in 6886 male workers. *Occup. Environ. Med.*, 66: 592–597.
- Doi, M. et al., 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125:497–508
- Doi, M. et al., 2007. Light inducible and clock-controlled expression of MAP kinase phosphatase 1 in mouse central pacemaker neurons. *J Biol Rhythms*, 22(2): 127-139.
- Dranoff, G., 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4(1):11-22.
- Dunlap, J.C. et al., 2004. Chronobiology. Biological Timekeeping. Sunderland, Massachusetts, *Sinauer Associates, Inc.*: 276 p.
- Doble, B. W. et. Woodgett, J. R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell. Sci.*, 116(7): 1175-1186.
- Dziema, H. et al., 2003. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 17(8): 1617-1627.
- Eide, E.J., 2005. Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKIε-Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 25(7):2795-2807.
- Fernandes, E. et al., 2006. DARPP-32 Is a Robust Integrator of Dopamine and Glutamate Signals. *PLoS Computational Biology*, 2(12): 176.
- Foulknes, N.S. et al., 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci*, 20:487–492.
- Eckmann L., 2006. Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol*, 22: 95-101.
- Foster, R.G. et Kreitzman, L., 2004. Rhythms of Life. The Biological clock that control the daily lives of every living thing. New Haven et London, *Yale University press*, 276 p.
- Gallego, M. et Virshup, D.M., 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2):139–148.
- Gau, D. et al., 2002. Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron*, 34(2), pp.245–253.
- Ganguly, S. et al., 2001. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 8083–8088.
- Ganguly, S. et al. 2002. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.*, 309:127-137.
- Garcia-Maurino, S. et al., 1997. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-γ production by human circulating CD4⁺ cells. *J Immunol*, 159:574-581.
- Garcia-Maurino, S. et al., 1998. Involvement of nuclear factor binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production in human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol*, 92: 76-84.
- Gay, N. J. al., 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat. Rev. Immunol.*, 6:693–698.
- Ginty, D. D. et al., 1993. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a

- circadian clock. *Science*, 260:238-241.
- Gatfield, D. et Schibler, U., 2007. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science*, 316:1135–1136.
- Golombek, D.A. et Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3):1063–1102.
- Greenhalgh, C. et al. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 70:348–356.
- Guillaumond, F. et al., 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5):391–403.
- Hamada, T. et al., 2001. Expression of period genes: rhythmic and non-rhythmic components of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J. Neurosci.*, 21:7742-7750.
- Hannibal, J., 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*, 309(1):73–88.
- Harwood, A. J., 2001. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*, 105(7): 821-824.
- Hastings, M.H. et al., 1998. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology international*, 15(5), pp.425–45.
- Hastings, M.H. et Herzog, E.D., 2004. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Rhythms*, 19:400–413.
- Hayashi, M. et al., 2007. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, 30:621-626.
- Hayden, M.S. et al., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 30: 6758-6780.
- Herzog, E.D. et al., 2004. Temporal precision in the mammalian circadian system: A reliable clock from less reliable neurons. *Journal of Biological Rhythms*, 19(1):35–46.
- Ho, A.K. et al., 2003a. Regulation of 90-kDa ribosomal S6 kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 144:3344–3350.
- Hu, X. et al., 2006. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity*, 24:563-574.
- Challet, E. et al., 1998. Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *Journal of Biological Rhythms*, 13(5):410–421.
- Challet, E. et al., 2003. Light exposure during daytime modulates expression of Per1 and Per2 clock genes in the suprachiasmatic nuclei of mice. *J Neurosci Res.* 72(5): 629-637.
- Challet, E. et Pevet, P. 2003. Interactions between photic and nophotic stimuli to synchronize the mammalian circadian clock. *Front. Biosci.*, 8:246–257.
- Chuang, J. I. et al., 1996. Effect of melatonin on NF-κB DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol. Int.*, 20:687-692.
- Iguchi, H. et al., 1982. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol, Metab*; 55:27–9.
- Inouye, S.T. et Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11):5962–5966.
- Janeway, C. A. Jr. et Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197–216.
- Ji, R.R. et al., 2009. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.*, 60:135-148.
- Jaworek, J. et al., 2005. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J. Pineal Res.*, 38:73-78.
- Jope, R. S. et al., 2007, Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem Res*, 32:577-595.
- Kadoi, Y. et Goto, F., 2007. Effects of selective iNOS inhibition on systemic hemodynamics and mortality rate on endotoxic shock in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shock*, 28
- Kalsbeek, A. et al., 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms*, 21:458–469.
- Karlsson, B.H. et al., 2003. Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 76:424–430.
- Kano, A. et al., 2003. Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation. *J Exp Med*, 198:1517-1525.
- Karatsoreos, I.N. et al., 2012. Effects of Circadian Disruption on Mental and Physical Health. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(2):1–8.
- Keller, M. et al., 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106:21407–21412.
- Klein, D.C. et al., 1991. Suprachiasmatic Nucleus: The Mind’s Clock. *Oxford University Press*, Oxford.
- Klein, D.C. et al., 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N

- acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog. Horm. Res.*, 52: 307-358.
- Ko, C.H. et Takahashi, J. S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 15:271–R277.
- Korf, H. W. et al., 1992. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res.* 595: 57-66.
- Korf, H. W. et al., 1998. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*, 146: 1-100.
- Kosobud et al., 2007. Drugs of abuse can entrain circadian rhythms. *Scientific World Journal*, 7: 203-212.
- Kluger, M. J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, 71, 93–127.
- Krueger, J. M., et al., 2001. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 933: 211–221.
- Kwak, Y. et al., 2008. Interferon-gamma alters electrical activity and clock gene expression in suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Biol. Rhythms*, 23:150-159.
- Lamia, K.A. et al., 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(39):14753-4.
- Larsen, P.J. et al., 1998. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 128–145.
- Leak, R.K. et Moore, R.Y., 2001. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of comparative neurology*, 433(3):312–34.
- Lee, H. S. et al., 2002. The eye is required for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.*, 6:111-112.
- Lehman, M. N. et al., 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience*, 7(6):1626–1638.
- Leone, M. J. et al., 2006. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *J Neurosci*, 8:1521-1527.
- Leonard, W. J. et J.J. O'Shea. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.*, 16:293–322.
- Linthorst, A. C. et. Reul, J.M., 1998. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N.Y. Acad. Science*, 840:139-152.
- Lerner, A. B. et al. 1959. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*, 81:6084-6085.
- Levy, D. E. et al., 2002. Signalling: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 3:651–662.
- Lewy, A. J. et al., 2006. Circadian uses of melatonin in humans. *Chronobiol Int.*, 23(1-2):403-12.
- Linthorst, A. C. et Reul, J. M., 1998. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 840:139-152.
- Litaka, C. et al., 2005. A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*. 280(33): 29397-29402.
- Liu, A.C. et al., 2007. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*, 129(3):605–616.
- Logan, R. W. et al., 2012. Circadian nature of immune function. *Mol Cell Endocrinol*, 349:82–90.
- Lowrey, P.L. et al., 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288:483–492.
- Luchetti, F. et al., 2009. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med.*, 46:339-351.
- Lundkvist, G. B. et al., 1998. Expression of an oscillating interferon-gamma receptor in the suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport*, 9:1059-1063.
- Lundkvist, G. B. et al., 1999. Light-dependent regulation and postnatal development of the interferon-gamma receptor in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*, 849:231-234.
- Maestroni, G. J. M., 2001. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Exp. Opin Invest Drugs*, 10:467-476.
- Mao et al., 2004. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 19(5): 1207–1216.
- Markus, R.P. et al., 2013. Immune-pineal axis: NFkB mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci*, 14:10979-10997.
- Maronde E. et al. 1997. Control of CREB phosphorylation and its role for induction of melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Biol. Cell*, 89:505–511.
- Marpegan, L. et al., 2004. Participation of transcription factors from the Rel/MF-kappaB family in the circadian system in hamsters. *Neurosci. Let.*, 358:9-12.

- Marpegan, L. et al., 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Jour. Neuroimmunol*, 160:102-109.
- Marpegan, L. et al., 2009. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiology International*, 26(7):1430-1442.
- Martin, M. et al., 2005. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.*, 6:777-784.
- Masson-Pevet, M. et al., 1994. An attempt to correlate brain areas containing melatonin binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tiss. Res.*, 278: 97–106.
- Matsunaga, W. et al., 2000. LPS induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 858:9–18.
- May et al., 2010. Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 Receptor Activation Coordinates Multiple Neurotrophic Signaling Pathways. *The Journal of biological chemistry*, 285(13): 9749 –9761.
- Mazanetz, M. P. et Fischer, P. M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature reviews; Drug discovery*, 6:464-479.
- Medzhitov, R. et Janeway, C.A. Jr., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9:4-9.
- Medzhitov, R. et al. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* 1:135–145.
- Meyer, P. et al., 2002. Melatonin MT-1-receptor immunoreactivity in the human eye. *Br J Ophthalmol*, 86: 1053–1057.
- Miguel, R.N. et al., 2007. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *Plos One*, 2(8):788.
- Mohawk, J.A. et al., 2012. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience*, 35:445–62.
- Moore, R. Y. et Klein, D. C., 1974. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.*, 71: 17-33.
- Moore, R.Y. et Card, J.P., 1994. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *Journal of Comparative Neurology*, 344(3): 403–430.
- Moore, R.Y., 1996b. Neural control of the pineal gland. *Behav. Brain Res.*, 73:125–130.
- Moore, R. Y. et al., 2001. The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch Ital Biol.*, 139:195–205.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. et Leak, R.K., 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309(1):89–98.
- Morin, L.P., 2012. Neuroanatomy of the Extended Circadian Rhythm System. *Experimental Neurology.*, 243:420.
- Møller, M. et Baeres, F.M.M., 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Research*, 309:139-150.
- Muxel, S.M. et al., 2012. NFkappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS ONE*, 7:52010.
- Nagoshi, E. et al., 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119:693-705.
- Nakaya, M. et al., 2003. Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res. Commun*, 305:494 501.
- Nava, F. et al, 2000. Lipopolysaccharide increases arginine-vasopressin release from rat suprachiasmatic nucleus slice cultures. *Neurosci. Lett.*, 288:228-230.
- Nelson, D.E. et al., 2004. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 306(5696):704-8.
- Nomura K. et al., 2001. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. *J. Neurosci Res*, 72:384-392.
- Obrietan, K. et al., 1998. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci*, 1:693–700.
- Obrietan, K. et al. 1999. Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem.*, 274:17748 –17756.
- Okada, K. et al., 2008. Injection of LPS causes transient suppression of biological Clock genes in rats. *Journal of Surgical Research*, 145: 5-12.
- O’Neill, L. A. et Bowie, A. G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor

- signalling. *Nat Rev Immunol.*, 7:353–364.
- Paladino, N. et al., 2010. Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *J. Neuroimmunol.*, 225:62–67.
- Panda, S. et Hogenesh, J.B., 2004. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *J. Biol. Rhythms*, 19: 374–387.
- Pandi-Perumal, S.R. et al., 2008. Melatonin, Circadian Dysregulation and Sleep in Mental Disorders. *Primary Psychiatry*, 15:77–82.
- Penev, V. et al., 1998. Chronic circadian desynchronization decreases the survival of animals with cardiomyopathic heart disease. *American Journal of Physiology*, 275(6):2334–2337.
- Pedersen, E.B. et al. 1993. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Research*, 272:257–265.
- Pevet, P. et Challet, E., 2011. Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of Physiology - Paris*, 105: 170 - 182.
- Pircher, T. J. et al., 1999. *Mol. Endocrinol.*, 13:555–565.
- Price, D.M. et al., 2004a. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1): >100-fold nocturnal and norepinephrine-induced changes in the rat pineal gland. *FEBS Lett.* 577:220–226.
- Prolo, L.M., Takahashi, J.S. et Herzog, E.D., 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(2):404–408.
- Qin, L. et al., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neuridegeneration. *Glia* 55:453–462.
- Ralph, M.R. et al., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247:975–978.
- Rayasam, G. V., et al., 2009. Glycogen synthase kinase 3: More than a namesake. *Br J Pharmacol*, 156: 885–898.
- Reiter, R.J. et al. 2010a. Melatonin: a multitasking molecule. *Progr Brain Res*, 181:127–151.
- Reppert, S.M. et Weaver, D.R., 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 63(63), pp.647–676.
- Reppert, S.M. et Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418, 935–941.
- Roberts, A. W. et al., 2001. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 9324–9329.
- Roberson, E.D. et al., 1999. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.*, 19:4337–4348.
- Roseboom, P. H. et Klein, D. C., 1995. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*, 47:439–449.
- Rosenboom, P.H. et al. 1996. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 137:3033–3045.
- Romanovsky, A. A. et al., 2003. The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: A reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285:420.
- Romanovski, A. A. et al., 2012. The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling. A reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285:420.
- Sadki, A. et al., 2007. Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiol. Aging*, 28:296–305.
- Saitoh, S. et al., 2004. Lipid A antagonist, lipid IVA, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*, 16:961–969.
- Sakamoto, K. et al., 1998. Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J. Biol. Chem*, 273:27039–27042.
- Salkowski, C.A. et al., 1997. Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN gamma, and TNF receptor-1-mediated signaling. *J. Immunol.*, 158: 905–912.
- Sato, T. et al., 1996. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Research*, 284:65–76.
- Seeger, R. et Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *Faseb J.*, 9:726–735.

- Semmler, A. et al., 2007. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*, 204:733-740.
- Shearman, L.P. et al., 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288:1013-1019.
- Schernhammer, E.S. et al., 2006. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology*, 17:108-111.
- Shimazu, R. et al., 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 189:1777-1782.
- Schindler, C. et al., 1992. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*, 257:809-813.
- Schroemer, C. et al., 2005. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1057: 372-383.
- Shuai, K. et al., 1992. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*, 258:1808-1812.
- Schulz, P. et al., 2009. Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs*, 23(2):3-13.
- da Silveira Cruz-Machado, S. et al., 2010. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. *J Pineal Res*, 49:183-192.
- da Silveira Cruz-Machado, S. et al., 2012. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*, 7: e40142.
- Simonneaux, V. et al., 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.*, 55: 325-395.
- Singh, A.K., et al., 2004. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology*, 201:197.
- Sookoian, S. et al., 2007. Effects of rotating shift work on biomarkers of metabolic syndrome and inflammation. *J. Intern. Med.* 261, 285-292.
- Spengler, M. L. et al., 2009. A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle*, 8:4138-4146.
- Stephan, F.K. et al., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), pp.1583-1586.
- Stehle, J.H., et al., 1993. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365:314-320.
- Stehle, J.H. et al., 2002. Organisation of the circadian system in melatonin proficient C3H and melatonin deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tiss. Res.*, 309:173-182.
- Sumová, A. et al., 1995. The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), pp.7754-7758.
- Sumová, A. et al., 1998. Photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under various photoperiods. *The American journal of physiology*, 274(3 Pt 2):857-63.
- Ševčíková, S. et al., 2012. Molekulární podstata Waldenströmovy makroglobulinemie. Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno, *Klin Onkol*, 25(6): 413-420.
- Swanson, L. W. et al., 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence doublelabelling methods. *J. Comp. Neurol.*, 194:555-570.
- Takahashi, S. et al., 2001. Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse. *Endocrinology*, 142:4910-4917.
- Takahashi, J.S. et al., 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(10):764-775.
- Takane, H. et al., 2002. Relationship between 24-hour rhythm in antiviral effect of interferon-beta and interferon-alpha/beta receptor expression in mice. *Jpn J. Pharmacol*, 90:304-312.
- Takeda, K. et al., 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Mikrobiol*, 5: 143-153.
- Tardito, D. et al., 2010. Time in the brain: rhythms of intercellular and intracellular processes. *Medicographia*, 32(2): 155.
- Tecler-Mesbah, R. et al., 1999. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.*, 406:171-182.
- Terron, M. P. et al., 2004. Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels. *J Comp Physiol*, 174:421-427.

- Tischkau, S. A. et al., 2002. CREB-dependent activation of *Per1* is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol. Chem.*, 278:718-723.
- Travnickova-Bendova, Z. et al., 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11): 7728-7733.
- Wei et al., 2011. Protracted cocaine withdrawal produces circadian rhythmic alterations of phosphorylated GSK-3 β in reward-related brain areas in rats. *Behav Brain Res*, 218(1): 228-233.
- Werlen, G. et al., 2003. Signaling Life and Death in the Thymus: Timing Is Everything. *Science*, 299, 1859-1863.
- Wilsbacher, L. D. et al., 2002. Photic and circadian expression of luciferase in *mperiod 1-luc* transgenic mice in vitro. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:489-494.
- Wirz-Justice, A., 2006. Biological rhythm disturbances in mood disorders. *Int. Clin. Psychopharmacol*, 21:11-15.
- Withyachumnarnkul, B. et al., 1990. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal gland in organ culture. *J. Interf. Res.*, 10, 403-411.
- Woodgett, J. R. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J.*, 9: 2431-2438.
- Xia, M. Z. et al., 2012. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated. *J Pineal Res.*, RAW264.7 cells.
- Yamamoto, M. et al., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.*, 301(5633):640-643.
- Yamaguchi, S. et al., 2003. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science N.Y.*, 302(5649):1408-12.
- Yan, J. et al., 2008. Analysis of Gene Regulatory Networks in the Mammalian Circadian Rhythm. *PLoS Comput Biol* 4(10): e1000193.
- Young, M.R. et al., 1995. Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiol. Int.*, 12:19-27.
- Zhang, Y. et al., 1996. Critical period for cycloheximide blockade of light-induced phase advances of the circadian locomotor activity rhythm in golden hamsters. *Brain. Res.*, 740: 285-290.