

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Petr Machek

Úloha cirkadiánních hodin v regulaci transportních systémů

The role of circadian clock in regulation of transport systems

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr Jiří Pácha, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Použité zkratky

ACE	angiotensin konvertující enzym (angiotensin-converting enzyme)
ADH	antidiuretický hormon
HDL	high density lipoprotein
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
RHT	retinohypotalamický trakt
RORE	ROR response element
SCN	suprachiasmatické jádro (suprachiasmatic nucleus)
WT	wild-type
ZTXX	Zeitgeber time, čas XX v hodinách měřený od počátku světelné fáze (ZT0)

Obsah

Použité zkratky	3
Abstrakt.....	5
Abstract	6
Úvod.....	7
Úloha ledvin jako transportního systému.....	8
Trávicí soustava jako transportní systém.....	9
Mechanismus hodin na molekulární úrovni	11
Nastavení fáze hodin.....	12
Cirkadiánní změny v činnosti ledvin.....	12
<i>Clock(-/-)</i> model.....	13
<i>Cry</i> -null model	13
Cirkadiánní změny v činnosti tenkého střeva.....	14
Glukóza	14
Lipidy.....	14
Aminokyseliny	15
Tlusté střevo.....	15
Seznam literatury.....	16

Abstrakt

Cirkadiánní hodiny ovládají transportní systémy a podílí se důležitou měrou mimo jiné na regulaci výměny iontů a vstřebávání živin. Tato regulace se projevuje ovládním aktivity mnoha proteinů, které vyměňují látky ve střevech a ledvinách.

Klíčová slova: membránový transport, cirkadiánní rytmy, rytmy exkrece, savci

Abstract

Circadian clock controls transport systems in organisms and takes important role in regulation of ion exchange and nutrient absorption. This regulation manifests in control of various protein activities that exchange substances in intestines and kidney.

Keywords: membrane transport, circadian rhythm, excretion rhythm, mammals

Úvod

Prostředí na zemi výrazně podléhá změnám, které s sebou nese střídání dne a noci, jako jsou změny teploty, množství světla a z nich plynoucí změny v dostupnosti potravy, výskytu predátorů a další. Tyto změny jsou pravidelné a proto do značné míry předvídatelné. Organismy naopak vynakládají značné úsilí na udržení vlastních fyziologických podmínek nutných pro jejich přežití a těmto změnám musí čelit, nebo se s nimi jinak vyrovnávat. Je pro ně proto výhodné udržovat vnitřní hodiny, které regulují fyziologické funkce v závislosti na denním čase a umožňují tak včasnou odpověď na přicházející změnu. Mohou tak například realizovat prediktivní homeostázi, jak o ní hovoří Moore-Ede (Moore-Ede, 1986), včasné zahájit transkripci mRNA, aby proteiny mohly plnit své fyziologické úlohy v dobu, kdy jich bude zapotřebí. Syntéza mRNA až v reakci na změnu podmínek by vnášela do reakcí zpoždění a pokud jsou změny očekávatelné, lze se tomuto zpoždění vyhnout a zajistit tak lepší stabilitu vnitřního prostředí. Udržování cirkadiánních hodin tak s sebou přináší výhody, které jsou zásadní pro úspěšnost organismů a souhru transportních, metabolických a dalších funkcí.

Jeden z mnoha cirkadiánně řízených jevů je také regulace transportních systémů, které se starají o udržení homeostáze a přísun živin z potravy. Jejich kapacita musí být dostatečná pro využití energie z potravy, odstraňování odpadních látek metabolismu i výměnu iontů s okolním prostředím. Protože příjem potravy obvykle neprobíhá kontinuálně a rovnoměrně v průběhu dne, nároky na kapacitu transportních systémů se liší. Cílem této práce je představit mnohé mechanismy zajišťující návaznost funkcí na fázi cirkadiánních hodin u jednotlivých buněk i orgánů, zpravidla na modelech potkanů a myší.

Úloha ledvin jako transportního systému

Následující text je shrnutí funkce ledvin, které zde uvádím pro další přehlednost. Obsahuje informace, které patří mezi obecné znalosti ledvin a jsou obecně dostupné, proto je necituji, ale předkládám jako kontext, který je dobré uvést v jednotné formě.

Ledviny patří mezi klíčové orgány udržující homeostázu organismu. Mezi jejich hlavní funkce patří regulace rovnováhy vody a iontů, včetně kontroly osmolarity, vylučování odpadních produktů, regulace krevního tlaku a udržování acidobazické rovnováhy. Mezi endokrinní funkce se dá zařadit produkce některých hemopoetických růstových faktorů. Podílí se i na metabolismu glukózy a vitamínu D. Rozdílná exkrece vody, sodíku, draslíku, chloridu a jiných iontů ledvinami patří mezi základní fyziologické projevy diurnálního rytmu. Vylučování u člověka, jako zástupce diurnálních živočichů, je nejvyšší dopoledne, a v noci prudce klesá na minimum. Největší rozdíly mezi dnem a nocí jsou ve vylučování sodíku, podstatně menší, přesto významné rozdíly se najdou i v exkreci draslíku a chloridových aniontů (Manchester, 1933) a pouze minimálně významnými rozdíly fosfátu, sulfátu a amoniaku. Rozdíly v koncentraci fosfátů se ale mohou lišit v závislosti na poloze těla a stravě (Simpson, 1929). Transport iontů probíhá na apikální a bazolaterální membráně a také paracelulárně. Regulace vylučování filtrovaného sodíku je pro organismus zásadní, kdy je resorbováno až 99 procent sodných kationtů, což je zprostředkováno několika hlavními mechanismy. Většina sodíku je resorbována v proximálních tubulech pomocí $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměníku NHE3. Menší, ale významná část v tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky pomocí $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$ kotransportu, který je důležitý i pro funkci macula densa. V distálním tubulu dochází ke vstupu zbytku iontů pomocí $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ kotransportu. Ve sběrných kanálcích dochází k resorpci aldosteronem regulovaným ENaC kanálem. Regulace draslíku jednak probíhá na úrovni resorpce v proximálních tubulech, pomocí $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$ kotransportu a také sekreci pomocí pasivní difúze do lumen tubulů pomocí ROMK a dalších draselných kanálů. Na bazolaterální membráně dochází k efluxu Na^+ a influxu K^+ pomocí $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$. Resorpce chloridových aniontů probíhá několika způsoby, např. $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ výměníkem v proximálním tubulu, $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$ kotransportem ve vzestupném raménku Henleovy kličky, $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ kotransportem v distálním tubulu nebo Cl^- kanály. Do intersticia je Cl^- transportován pomocí ClC-Kb kanálem. Za fyziologických podmínek je všechna filtrovaná glukóza resorbována v proximálním tubulu kotransportem s Na^+ pomocí SGLT2 u člověka, nebo také SGLT1 u potkana. Pomocí GLUT2 (u potkana i GLUT1) je glukóza transportována vně z buňky přes bazolaterální membránu do intersticia. Resorpce proteinů, peptidů a aminokyselin probíhá pomocí endocytózy a PEPT proteinů. Difúze vody probíhá díky osmotickým gradientům přes vodní kanály akvaporiny. Akvaporin-1 se nachází v proximálních tubulech bazolaterálně a apikálně. Akvaporin-2 se skladuje ve vezikulech ve sběrných kanálcích a k jeho vystavení na apikální membránu dojde až po působení antidiuretického hormonu (ADH).

Urea (močovina), která se podílí na vzniku osmotického gradientu ve dřeni, je secernována UT transportéry. Regulace acidobazické rovnováhy na úrovni ledviny probíhá pomocí bikarbonátu, amoniaku a H^+ . Intracelulárně dochází k vzniku bikarbonátu a H^+ z CO_2 a vody. Bikarbonát, produkováný i resorbovaný, je z buňky dopraven do intersticia. Proton vodíku je naopak secernován do lumen tubulu nefronu. Filtrovaný plasmatický bikarbonát uvnitř tubulu reaguje s H^+ za vzniků CO_2 , který volně difunduje skrz cytoplasmatickou membránu dovnitř buňky. Amoniak je syntetizován intracelulárně z glutaminu. Díky jeho liposolibilitě difunduje skrz apikální membránu do lumen tubulů, kde reaguje s H^+ za vzniku HN_4^+ , který difundovat přes membránu nedokáže. Tímto způsobem je zabezpečena exkrece H^+ do sekundární moči.

Ledviny se krom tvorby moči podílí i na regulaci krevního tlaku. Klíčovým mechanismem regulace krevního tlaku je renin-angiotensin-aldosteronový systém. Ledviny po působení některých vlivů, jako je např. nízká perfúze ledviny nebo signálům z macula densa, reagující na koncentraci Na^+ a Cl^- , produkují v juxtaglomerulárním aparátu proteázu renin, který mění angiotensinogen na angiotensin I, který je následně přeměněn angiotenzin konvertující enzym (ACE) na angiotensin II. Tento produkt různými mechanismy stimuluje zvýšení krevního tlaku, mimo jiné je to jeden z hlavních faktorů zvyšující sekrece aldosteronu.

Trávicí soustava jako transportní systém

Podobně jako pro ledviny i zde shrnuji obecně známé informace trávení, které tvoří kontext pro kapitoly o cirkadiálních efektech.

Trávicí soustava je soubor orgánů, zabezpečující příjem živin pomocí trávení, resorpce i sekrece. Tato práce se zabývá cirkadiální rytmy na úrovni tenkého a tlustého střeva. V tenkém střevě, které se dělí na duodenum, jejunum a ileum, dochází k sekreci trávicích šťáv a následnému trávení a vstřebávání sacharidů, proteinů, lipidů, vody a mikronutrientů a samotné pasáži tráveniny. Významná je i hormonální aktivita i nervová (v podobě enterického nervového systému) trávicího traktu, které reguluje jeho činnost. Tlusté střevo z přicházejícího chymu vstřebává elektrolyty a vodu. Postupnou pasáží přes jednotlivé úseky tlustého střeva, ulehčovanou produkcí hlenu, formuje finální stolice. Sekrece trávicího traktu je nutná k vytvoření prostředí pro trávení, vylučováním některých elektrolytů, vody a samotných trávicích enzymů. Důležitá je i tvorba zásaditého hlenu v duodenu, aby se neutralizoval silně kyselý obsah, přicházející za žaludku a vytvoření optimálního pH pro funkci trávicích enzymů. Voda se pohybuje pasivně po osmotickém gradientu. Mezi hlavní transportní mechanismy pro elektrolyty se dá zařadit Na^+-H^+ výměník NHE, $Cl^-HCO_3^-$ výměník CLD, který transportuje bikarbonát do lumen střeva výměnou za Cl^- , v tlustém střevě je velmi významný ENaC sodný kanál, reagující na aldosteron. Chloridy se dostávají do

enterocytů Na^+ - 2Cl^- - K^+ kotransporterem (NKCC1) z intersticia jsou následně sekretovány do lumen pomocí CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Draselné kanály se nachází na všech membránách buňky, navíc ale jsou dopravovány pomocí H^+ - K^+ ATPázy intracelulárně z lumen střeva. Z intersticia je draslík společně s chlorem dopravován pomocí symportéru KCC1 nebo pomocí Na^+ - K^+ ATPázy.

Štěpení škrobu je zprostředkováno pomocí pankreatické alfa-amylázy. Štěpné produkty jako jsou dextriny, maltotrióza a maltóza jsou dále hydrolyzovány oligosacharidázami maltázou, isomaltázou a sacharázou, nacházející se v kartáčovém lemu enterocytů. Disacharidy jako je sacharóza, laktáza nebo trehalóza jsou buď vstřebávány přímo, nebo jsou štěpeny enzymy sacharázou, laktázou a trehalázou. Následná absorpce glukózy a galaktózy je závislá na sekundárně aktivním transportu pomocí Na^+ pomocí SGLT1, ale fruktóza je absorbována pomocí GLUT5. Fruktóza a glukóza jsou následně transportovány do intersticia pomocí GLUT2.

Štěpení proteinů začíná v žaludku pepsinem a pokračuje v tenkém střevě, probíhá pomocí několika různých enzymů, endopeptázami a exopeptidázami. Hlavní endopeptidázou je trypsin, který vzniká z trypsinogenu aktivací enterokinázou, která se nachází v kartáčovém lemu enterocytů. Trypsin následně aktivuje ostatní proenzymy, včetně samotného trypsinogenu. Chymotrypsin vznikající rozštěpním chymotrypsinogenu pepsinem, podobně elastáza, aktivní forma proelastázy. Exopeptidázy prokarboxypeptidázy se aktivují na karboxypeptidázu A a B. Mezi další proteolytické enzymy patří aminopetidázy nebo dipeptidázy. Některé dipeptidy a tripeptidy jsou aktivně transportovány do enterocytů pomocí PEPT1, kontrtransportem s H^+ . Aminokyseliny jsou absorbovány hned několika různými přenašeči, většinou kotransportem s Na^+ , nebo v případě některých s Cl^- . Pouze menšina je vstřebána samostatně. Absorbované di- a tripeptidy se dále štěpí intracelulárně a aminokyseliny jsou přeneseny do intersticia hned několika transportními systémy.

Trávení lipidů probíhá hlavně díky pankreatické lipáze, která štěpí triglyceridy na volné mastné kyseliny a 2-monoacylglycerol. Mezi další enzymy, které většinou vznikají z proenzymů po aktivaci pepsinem se řadí kolipáza, která je důležitá pro správnou funkci lipázy, nebo fosfolipáza A_2 . Významným enzymem je cholesterol esteráza, která štěpí cholesterol ester, estery některých vitamínů a triglyceridy. Spolu se solemi žlučových kyselin následně lipidy tvoří micely, což umožňuje jinak hydrofobním lipidům větší rozpustnost ve vodě. Micely následně migrují k membráně enterocytů, ze kterých následně difundují lipidy. V některých případech jsou transportovány i přenašeče. Intracelulárně se buď vyskytují ve volné formě, v případě kratších mastných kyselin, nebo spolu s jinými lipidy a některými proteiny, jako je ApoB-48, tvoří chylomikrony. Ty jsou následně exocytózou dopraveny do intersticia, odkud putují do organismu lymfatickou cestou. Trávení nukleových kyselin nebo jejich nukleotidů zprostředkovávají

ribonukleázy, deoxyribonukleázy a nukleázy za vzniku bazí, které jsou pak aktivně transportovány do enterocytů.

Absorpce předtím redukováného Fe^{2+} probíhá pomocí DMT1, které je v buňce následně zpětně oxidováno a skladováno pomocí ferritinu, nebo transportováno do intersticia pomocí ferroportinu 1 asociovaného s proteinem hephaestinem. Hem je absorbován pomocí specifického hem transportéru.

Absorpce vitaminů rozpustných v tucích probíhá stejným způsobem jako absorpce tuků. Absorpce ve vodě rozpustných vitaminů probíhá většinou kotransportem s Na^+ . Vitamin B12 je transportován intracelulárně v terminálním ileu pouze ve formě komplexu s tzv. vnitřním faktorem.

Mechanismus hodin na molekulární úrovni

Cirkadiální hodiny jsou v savčích buňkách realizovány na úrovni proteinů, které se vzájemně ovlivňují pomocí transkripčních smyček se zpětnou vazbou (Sato et al., 2006). Proteiny CLOCK a BMAL1, které patří do rodiny bazických helix-loop-helix (bHLH)-PAS (*Period-Arnt-Single-minded*) transkripčních faktorů, působí jako pozitivní rameno smyčky. Společně tvoří heterodimer CLOCK:BMAL1, který aktivuje transkripci po vazbě na E-box sekvenci (DNA sekvence CACGTG). Aktivací z E-boxů dochází k transkripci genů rodiny *Period* (*Per1*, *Per2*) a rodiny *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*), které fungují jako negativní rameno smyčky. *Period* a *Cryptochrome* působí negativně na vlastní transkripci a zpětně snižují vlastní koncentrace. Protože mezi transkripcí, translací a translokací proteinů zpět do jádra nastává zpoždění, dojde nejdříve k hromadění transkripčních faktorů CLOCK a BMAL1, se zpožděním teprve nárůst PER a CRY. PER a CRY s dalším zpožděním potlačí vlastní transkripci a množství těchto proteinů v buňce opět poklesne, což dokončí jeden cyklus cirkadiálních hodin. Oscilace těchto proteinů také závisí na posttranslačních modifikacích (Lee et al., 2008). Druhou částí negativního ramene je negativní zpětná smyčka, kde REV-ERB α , který je indukován také pomocí CLOCK:BMAL1, po navázání do ROR response elementu (RORE) snižuje transkripci *Bmal1*, což posiluje robustnost cyklu (Preitner et al., 2002). Takto dochází k cyklickým změnám koncentrací transkripčních faktorů v pravidelných časových intervalech. Tyto transkripční faktory působí syntézu dalších mRNA (aktivací přes E-box, RORE), což buňce umožňuje provádět další změny s ohledem na cirkadiální čas.

Funkčně naprosto zásadní jsou hodiny nacházející se v suprachiasmatickém jádře (SCN), které se časově synchronizují pomocí světla ze sítnice skrze retinohypotalamický trakt (RHT) a udržují vzájemný rytmus pomocí neuronální komunikace. SCN se tak za normálních podmínek chová pro tělo jako jeden oscilátor, který udává hlavní rytmus zbytku těla jak pomocí eferentních drah, tak

hormonálně (review Welsh, Takahashi, & Kay, 2010). Roli CLOCK proteinu v SCN může nahradit NPAS2, což má mimo jiné za následek, že *Clock*(-/-) mutanti mohou být behaviorálně rytmičtí, ale jejich periferní hodiny nefunkční (review Saini, Suter, Liani, Gos, & Schibler, 2011). Při studiu *Clock*(-/-) tak lze snáze odlišit některé efekty, které jsou způsobeny během lokálních hodin v tkáních a které jsou do periferních hodin přeneseny z SCN.

Nastavení fáze hodin

Aby byly orgány a tkáně časově v souladu a cirkadiálně rytmické, musí každá buňka zachovávat svůj rytmus, jehož fáze je ve shodě s okolím. Jak je toho dosaženo se tkáňově liší a není to zatím definitivně v plné míře objasněno. Například u potkanů, při vagotomii (odstranění části bloudivého nervu) dochází k potlačení rytmu GLUT2, ale ne SGLT1 a GLUT5 v tenkém střevě, což ukazuje, že vliv inervace není pro všechny proteiny transportního systému identický (Tavakkolizadeh et al., 2005). Navíc signály udávané příjmem potravy se mohou časově lišit od světelných signálů, což po čase vyústí v rozdílné fázi hodin SCN a některých periferních hodin, například v játrech a ledvinách. SCN zůstává synchronizované podle světla (Damiola et al., 2000).

Cirkadiální změny v činnosti ledvin

Pro zkoumání změn v tkáních, které se odehrávají v čase, je vhodná metoda microarray, která měří koncentrace jednotlivých transkriptů ve vzorku. V ledvinách, konkrétně distálním stočeném kanálku (DCT) a spojovacím tubulu (CNT) a sběrném kanálku (CCD) bylo ze vzorků odebraných v 4hodinových intervalech touto metodou nalezeno 3 814 genů, jejichž exprese se v průběhu dne změnila více jak 1,8násobně. Stejně měření provedené na vzorcích ze sběrného kanálku našlo 2112 takových genů. Zatímco maxima exprese byla u genů obecně rozložena v čase náhodně, ukázalo se, že geny z rodiny solute carriers (SLC) a enzymy I. a II. fáze metabolismu xenobiotik mají jasné maximum v čase začátku subjektivní noci (aktivní fáze). Toto načasování tedy připravuje kapacitu ledvin pro zpracování látek v aktivní fázi, jak pro ionty, tak pro odstraňování xenobiotik přicházejících v potravě. Protože se moč v distálnějších částech nefronu koncentruje, dochází i ke zvýšení v koncentraci xenobiotik, proto je zřejmě výhodné xenobiotika odstraňovat zde, aby se nevracela po koncentračním spádu do buněk nefronu a do těla (Zuber et al., 2009). Navíc analýzou dat bylo nalezeno 356 transkriptů DCT/CNT a 504 v CCD, jejichž exprese vykazuje více jak alespoň 1,5násobnou amplitudu podobnou křivce funkce cosinus s periodou 24h. V CCD sem patří například kanály akvaporin-2 (aqp-2), akvaporin-4 (aqp-4).

U potkanů, $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměník NHE3 vykazuje rytmickou expresi na úrovni jak mRNA, tak i proteinu v proximálním tubulu. Bylo zjištěno, že jeho promotor obsahuje E-box a bylo potvrzeno, že váže

CLOCK:BMAL1 dimer, který aktivuje jeho transkripci. V souladu s tímto výsledkem, měření na *Cry*-null myších ukázalo sníženou expresi jejich BMAL1 i NHE3 mRNA a ztrátu rytmu jejich exprese oproti myším s WT alelami CRY1 a CRY2 (Saifur Rohman et al., 2005). Jde tak o důkaz přímého propojení cirkadiálních hodin na rytmy výměny sodíku a protonů v ledvině, které jsou zásadní pro udržování krevního tlaku a homeostázy.

Molekulární hodiny také kontrolují resorpci sodíku i pomocí regulace kanálu ENaC na apikální membráně ledvinových epitelů. Přímo se tak děje pomocí regulace α ENaC podjednotky, která reaguje na hladiny na hladiny PER1. Hladina PER1 naopak narůstá v reakci na aldosteron a nárůst α ENaC v odpovědi na aldosteron se vytrácí u buněk, ze kterých byl odstraněn Per1. Per1 je tedy prostředníkem odpovědi na aldosteron (Gumz et al., 2009). Na bazolaterální membráně je dále cirkadiálně regulován protein HK α 2 sloužící jako podjednotka v H⁺-K⁺ ATPáze. Hladina jeho mRNA kolísá a myši s jeho odstraněním mají změněné vylučování draslíku (Salhi, Centeno, Firsov, & Crambert, 2012).

Je vhodné poznamenat, že regulace ENaC a NHE3 je vysvětlena pomocí reakcí přímo s proteiny hlavní smyčky cirkadiálních hodin. Regulace na jiných proteinech může být prováděna složitější cestou, zprostředkovanou více faktory.

Clock(-/-) model

Důležitým nástrojem pro zkoumání cirkadiálních hodin v ledvinách jsou mutanti genů hodin, jako jsou myši s odstraněnými geny *Clock* (tedy *Clock*(-/-)). Mají mírné projevy diabetes insipidus, odlišný rytmus exkrece sodíku v moči a významné snížení krevního tlaku. Plazmatická koncentrace sodíku je u nich vyšší než u WT (wild-type, s běžnou alelou *Clock* genu) myší a přijímají více vody (Zuber et al., 2009). Jejich plazmatická hladina aldosteronu se v průběhu dne mění, ale průběh v čase vykazuje odlišný profil od WT. Průměrná hladina aldosteronu za 24 hodin je ovšem stejná (Nikolaeva et al., 2012). Protože aktivita proteinu CLOCK je významná pro aktivní fázi dne, lze předpokládat, že jeho odstranění omezí fyziologické projevy spojené právě s aktivní fází. Mutantní myši mají ve shodě s touto teorií nižší krevní tlak. Analýza transkriptomu *Clock*(-/-) myši odhalila změněnou hladinu exprese genů *Cyp4a12a*, *Cyp4a12b* a *Cyp4a14*, mRNA enzymů oxidace arachidonové kyseliny na 20-hydroxyeicosatetraenovou kyselinu (20-HETE), která ovlivňuje renální resorpci sodíku, exkreci draslíku a renální vaskulární tonus. Koncentrace 20-HETE je u těchto myší snižena, což je zřejmě jedním z důvodů jejich hypotenze (Nikolaeva et al., 2012).

Cry-null model

Dalším významným mutantem cirkadiálních hodin jsou *Cry*-null myši (odstranění *Cry1* i *Cry2* genů). Měření bylo zjištěno, že mají abnormálně vysokou hladinu krevního aldosteronu

v průběhu dne, ale není zde odpovídající zvýšení reninu (Doi et al., 2010). Tato produkce aldosteronu tedy neprobíhá klasickou cestou přes renin-angiotensin-aldosteronový systém. Při prozkoumání expresního profilu v zona glomerulosa kůry nadledviny byla nalezena vysoká aktivita genu *Hsd3b6* oproti vzorku odebraném z WT myši. Exprese genu *Hsd3b6* koreluje se zvýšenou aktivitou 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenáz, jednoho z klíčových enzymů dráhy syntézy aldosteronu (kroku přeměny pregnenolonu na progesteron). Tento výsledek potvrzuje, že na regulace tlaku a hladiny sodíku má vliv nejen snaha organismu o zachování okamžitého stálého prostředí, ale i cirkadiální rytmy, které v případě dysregulace nebo genetického poškození mohou zvrátit svůj homeostázu naopak narušovat homeostázu organismu.

Cirkadiální změny vstřebávání živin v tenkém střevě

Glukóza

Vstřebávání glukózy v jejunu a ileu vykazuje cirkadiální rytmicitu. Při studiu na potkanech dochází k maximu vstřebávání v ZT15 a kapacita přenosu glukózy je 1,9krát vyšší než v ZT3. V této době je na vrcholu i koncentrace proteinu SGLT1. Při inhibici transportu SGLT1 pomocí specifického inhibitoru se významně snižuje kapacita vstřebávání a vytrácí se cirkadiální variace v kapacitě. V jejunu bylo maximum exprese mRNA *Sglt1* diurnální s maximem v ZT9 a rozdíl proti minimu je 4,6násobný (ZT9 / ZT21). V terminálním ileu je menší cirkadiální variace s 3,9násobným rozdílem mezi maximem a minimem. Maximum *Sglt1* mRNA je dosaženo v ZT15, tedy o 6h později než v jejunu. Proteiny v jejunu vykazují 5,9násobný rozdíl mezi maximem a minimem, kdy maximum proteinu bylo v ZT15 (6h po maximu mRNA). důležitě zastoupení SGLT1 na jeho efektu a posunutí exprese v ileu oproti jejunu, které je logické vzhledem ke zpoždění putující natráveniny (odpovídá rychlosti pohybu jídla ve střevě). Tento transport s sebou strhává i vodu (až 250 molekul H₂O na hexózu), tudíž i pro regulace vody v těle. (Balakrishnan et al., 2008)

Lipidy

Rytmicky se mění i koncentrace lipidů v plazmě. Pozorováno na modelu potkana, v průběhu noci (aktivní fáze u potkanů) se zvyšuje koncentrace triglyceridů a cholesterolu jak volně v plazmě, tak vázaných na apolipoproteinu B (apoB). Zatímco rozdíl mezi maximem a minimem koncentrace triglyceridů vázaných na apoB-lipoprotein v krvi je 6-10násobný, rozdíl v celkovém objemu triglyceridů je asi dvojnásobný a změny v triglyceridech vázaných v HDL nejsou významné (Pan & Hussain, 2007). Cirkadiální regulace ale neovlivňuje vždy aktivitu transportních systémů přímo, což lze demonstrovat například na deadenyláze nocturninu (gen *Ccrn14*), která je exprimována cirkadiálně. *Noc*(-/-) myši mají snížený transport tuků z potravy na úrovni samotného enterocyty. (Douris et al., 2011)

Aminokyseliny

Vstřebávání aminokyselin v tenkém střevě probíhá velkou měrou ve formě di- a tripeptidů, které jsou vstřebány přes PEPT1, H⁺/oligopeptidový kotransportér. Pept1 mRNA byla ukázána jako cirkadiálně oscilující a osciluje i hladina proteinu PEPT1 (Pan, Terada, Irie, Saito, & Inui, 2002). Zvýšení hladiny mRNA předchází zvýšenou hladinu proteinu a hladina proteinu je vysoká v aktivní fázi potkanů, což umožňuje plnit svoji funkci ve střevě, jak je pro transportéry tenkého střeva typické.

Tlusté střevo

Cirkadiální rytmy lze nalézt i v expresi mnohých kanálů a pump v tlustém střevě. Cyklicky se zde exprimují *γEnac* (podjednotka kanálu ENaC, stimulována aldosteronem), již dříve zmiňovaný *Nhe3*, *Ae1* (HCO₃⁻-Cl⁻ výměník) a *Atp1a1* katalytická podjednotka sodíkové pumpy. Dochází zde také k elektrogennímu transportu Na⁺, který je vyšší v aktivní fázi dne. Naproti tomu exprese *Kcc1* se v průběhu dne neměnila. (Soták et al., 2011).

Závěr

Cirkadiální rytmy jsou v současnosti velmi aktivně studovanou oblastí, která nalézá nová a často nečekaná propojení mezi buněčnými hodinami, transportem látek i metabolickými pochody a odkrývá molekulární příčiny již dlouho známých jevů. Tato práce shrnula mechanismy cirkadiálních rytmů, jejich projevy na transportních systémech (v ledvinách, tlustém a tenkém střevě).

Seznam literatury

- Balakrishnan, A., Stearns, A. T., Rounds, J., Irani, J., Giuffrida, M., Rhoads, D. B., ... Tavakkolizadeh, A. (2008). Diurnal rhythmicity in glucose uptake is mediated by temporal periodicity in the expression of the sodium-glucose cotransporter (SGLT1). *Surgery*, *143*(6), 813–818. doi:10.1016/j.surg.2008.03.018
- Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*, *14*(23), 2950–2961. doi:10.1101/gad.183500
- Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., ... Okamura, H. (2010). Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nature Medicine*, *16*(1), 67–74. doi:10.1038/nm.2061
- Douris, N., Kojima, S., Pan, X., Lerch-Gaggl, A. F., Duong, S. Q., Hussain, M. M., & Green, C. B. (2011). Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Current Biology*, *21*(16), 1347–1355. doi:10.1016/j.cub.2011.07.018
- Gumz, M. L., Stow, L. R., Lynch, I. J., Greenlee, M. M., Rudin, A., Cain, B. D., ... Wingo, C. S. (2009). The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *J. Clin. Invest.*, *119*(8), 2423–2434. doi:10.1172/JCI36908.dehydrogenase
- Lee, J., Lee, Y., Lee, M. J., Park, E., Kang, S. H., Chung, C. H., ... Kim, K. (2008). Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(19), 6056–6065. doi:10.1128/MCB.00583-08
- Manchester, R. C. (1933). THE DIURNAL RHYTHM IN WATER AND MINERAL EXCHANGE 1. *Journal of Clinical Investigation*, *12*(6), 995–1008. doi:10.1172/JCI100569
- Moore-Ede, M. C. (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *The American Journal of Physiology*, *250*(5 Pt 2), R737–R752.
- Nikolaeva, S., Pradervand, S., Centeno, G., Zavadova, V., Tokonami, N., Maillard, M., ... Firsov, D. (2012). The Circadian Clock Modulates Renal Sodium Handling. *Journal of the American Society of Nephrology*, *23*(6), 1019–1026. doi:10.1681/ASN.2011080842
- Pan, X., & Hussain, M. M. (2007). Diurnal regulation of microsomal triglyceride transfer protein and plasma lipid levels. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(34), 24707–24719. doi:10.1074/jbc.M701305200
- Pan, X., Terada, T., Irie, M., Saito, H., & Inui, K.-I. (2002). Diurnal rhythm of H⁺-peptide cotransporter in rat small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *283*(1), G57–G64. doi:10.1152/ajpgi.00545.2001
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, , Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251–260. doi:10.1016/S0092-8674(02)00825-5

- Saifur Rohman, M., Emoto, N., Nonaka, H., Okura, R., Nishimura, M., Yagita, K., ... Yokoyama, M. (2005). Circadian clock genes directly regulate expression of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney International*, 67(4), 1410–1419. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00218.x
- Saini, C., Suter, D. M., Liani, a, Gos, P., & Schibler, U. (2011). The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 39–47. doi:10.1101/sqb.2011.76.010918\rsqb.2011.76.010918 [pii]
- Salhi, a., Centeno, G., Firsov, D., & Crambert, G. (2012). Circadian expression of H,K-ATPase type 2 contributes to the stability of plasma K⁺ levels. *The FASEB Journal*, 26(7), 2859–2867. doi:10.1096/fj.11-199711
- Sato, T. K., Yamada, R. G., Ukai, H., Baggs, J. E., Miraglia, L. J., Kobayashi, T. J., ... Hogenesch, J. B. (2006). Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nature Genetics*, 38(3), 312–319. doi:10.1038/ng1745
- Simpson, G. E. (1929). Changes in the comoposition of urine brought about by sleep and other factors. *J. Biol. Chem.*, 84(3), 393–411.
- Soták, M., Polidarová, L., Musílková, J., Hock, M., Sumová, a, & Pácha, J. (2011). Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon, 1066–1074. doi:10.1152/ajpgi.00256.2011.
- Tavakkolizadeh, A., Ramsanahie, A., Levitsky, L. L., Zinner, M. J., Whang, E. E., Ashley, S. W., & Rhoads, D. B. (2005). Differential role of vagus nerve in maintaining diurnal gene expression rhythms in the proximal small intestine. *Journal of Surgical Research*, 129(1), 73–78. doi:10.1016/j.jss.2005.05.023
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. a. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72, 551–577. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919
- Zuber, A. M., Centeno, G., Pradervand, S., Nikolaeva, S., Maquelin, L., Cardinaux, L., ... Firsov, D. (2009). Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16523–16528. doi:10.1073/pnas.0904890106