

## ABSTRAKT

Molekulárne cirkadiánne hodiny umožňujú predvídanie zmien v okolitom prostredí. U cicavcov sú molekulárne hodiny prítomné prakticky vo všetkých tkanivách a tvorí ich sústava transkripčno-translačných spätnoväzbových slučiek tzv. hodinových génov. Centrálné hodiny predstavujú vnútorný pacemaker, ktorý sa nachádza v suprachiazmatických jadrách (SCN) hypotalamu a synchronizuje periférne hodiny. Cirkadiánne hodiny v tráviacom trakte a ich podiel na regulácii črevných funkcií sú nedostatočne preskúmané. Preto bolo cieľom tejto práce charakterizovať molekulárne hodiny v jednotlivých častiach čreva potkana a objasniť ich úlohu v regulácii epiteliálneho transportu, bunkového cyklu a nádorovej transformácie v hrubom čreve.

Na stanovenie cirkadiánnych profilov expresie hodinových génov v epiteli duodena, jejuna, ilea a hrubého čreva potkana sme použili kvantitatívnu RT-PCR (qPCR). Ďalej sme analyzovali expresiu génov kódujúcich transportéry a kanály umožňujúcich transport NaCl, ako aj regulátorov bunkového cyklu v hrubom čreve. Na detailnejší popis expresie v rámci štruktúr črevného epitelu sme použili laserovú mikrodisekciu. Elektrogénny transepiteliálny transport bol meraný ako skratovací prúd v Ussingových komorách. Na určenie úlohy hodín v procese tumorigenézy sme použili myšiu model azoxymetánom indukovaného kolorektálneho karcinómu asociovaného s kolitídou, na ktorom sme študovali cirkadiánne expresie hodinových a hodinami kontrolovaných génov v nádoroch.

Preukázali sme funkčné molekulárne hodiny vo všetkých študovaných črevných segmentoch, keďže sme dokumentovali výraznú rytmickú expresiu hodinových génov *Per1*, *Per2*, *Revrb* a *Bmal1*. Detegovali sme cirkadiánnu expresiu aj génov *Nhe3*, *Dra*, *Ae1* a *Atp1a1*, ktorých proteínové produkty sa podieľajú na transporte NaCl, konkrétne Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmenník (NHE3), Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> výmenníky (DRA, AE1) a podjednotku Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy (*Atp1a1*). Okrem toho sme zaznamenali rytmickú expresiu u NHE3 regulačného faktoru 1 (*Nherf1*) a  $\gamma$  regulačnej podjednotky sodného kanálu ENaC (*Scnn1g*). Časovo obmedzený režim príjmu potravy posunul fázu rytmov, čo naznačuje priame regulačné zapojenie lokálnych periférnych hodín. Ukázali sme denné zmeny v aktivite elektrogénneho transportu Na<sup>+</sup> cez ENaC kanál čím sme poukázali na funkčný výstup cirkadiánnej regulácie Na<sup>+</sup> transportu.

Aby sme odhalili úlohu hodín v epitelovej bunkovej proliferácii, merali sme cirkadiánne expresie kľúčových regulátorov bunkového cyklu. Pozorovali sme zjavný rytmus v expresii génu kódujúceho WEE1 kinázu (*Wee1*), ktorý pozdrzuje prechod G2/M fázy bunkového cyklu. Toto zistenie je podporené aj laserovou mikrodisekciou, pomocou ktorej sme našli rytmickú expresiu *Wee1* v báze i ústi krypty hrubého čreva. Rytmickú expresiu sme zaznamenali ešte u génov *cyklín A* a *B1* a CDK inhibítora *p27*. Žiadny rytmus sme nepozorovali u proto-onkogénu *c-Myc*, ktorý bol pozorovaný ako rytmický v iných tkanivách v iných štúdiách. Podobne, ani gény *p21*, *p16* a *cyklín D1* nedosiahli štatisticky významný rytmus expresie. Na základe výsledkov môžeme povedať, že (i) črevné cirkadiánne hodiny sa aspoň čiastočne podieľajú na regulácii proliferácie črevného epitelu, ale ďalšie regulačné dráh môžu zohrávať podstatnú úlohu a (ii) zapojenie hodín v regulácii bunkového cyklu je pravdepodobne tkanivovo špecifické.

V modeli azoxymetánom indukovaného kolorektálneho karcinómu sme zistili v tkanive nádoru výrazne utlmené rytmy expresie hlavných hodinových génov *Per1*, *Per2* a *Revrb* a stratu rytmu expresie *Bmal1* v porovnaní so zdravo vyzerajúcim okolím nádoru a epitelom intaktných kontrol. Okrem toho sme pozorovali signifikantú zmenu cirkadiánnej expresie hodinových génov nielen v nádorovom tkanive, ale aj v zdravom príľahlom tkanive a v pečeni myši s nádorom v porovnaní s intaktnými kontrolami. Tieto údaje poukazujú na úlohu cirkadiánnych hodín v procese tumorigenézy kolorektálneho karcinómu.

Môžeme zhrnúť, že sme charakterizovali cirkadiánne hodiny v črevnom epiteli, ukázali ich zapojenie do regulácie transportu NaCl, epiteliálnej proliferácie a procesu tumorigenézy v hrubom čreve. Tieto zistenia prispievajú k pochopeniu fyziologického a patofyziologického výstupu cirkadiánnych hodín.