

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Hana Kyclerová

Expres a regulace *Dexras1* ve strukturách mozku potkana za vývoje

**The expression and regulation of *Dexras1* in the rat brain under
development**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze, 15. 8. 2017

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé práce, doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D., za předání znalostí, příkladné vedení práce, vlídná slova i velkou podporu hlavně v posledním týdnu před odevzdáním. Velké díky dále patří Mgr. Dominice Pačesové za ochotu, vstřícnost, trpělivost při mém zaučení a za pomoc s pokusy. Děkuji také za velkou podporu a věcné rady Mgr. Veronice Spišské, našemu skvělému kolektivu Laboratoře biorytmů a naší milé paní sekretářce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému příteli a mé rodině za vstřícnost, důvěru a obrovskou podporu, která mě vedla k cíli.

ABSTRAKT

Gen pro *Dexras1* byl objeven po indukci glukokortikoidem dexametazonem v buňkách tumoru hypofýzy. *Dexras1* byl nalezen i v jiných oblastech mozku a v periferních orgánech, avšak pouze v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN), kde sídlí hlavní cirkadiánní pacemaker savců, byla jeho exprese rytmická. Exprese *Dexras1* byla ovlivněná také stresem, aplikací amfetaminu či prenatální expozicí alkoholu. Jeho úloha v buňkách nebyla zatím zcela objasněna. Bylo zjištěno, že jeho GTPázová aktivita závisí na stimulaci NMDA receptorů a že působí jako aktivátor G-proteinové signalizace v buňkách. Také byla objevena jeho role v homeostáze železa u neuronů či v regulaci citlivosti hlavního cirkadiánního pacemakeru ke světelným i nesvětelným synchronizačním stimulům z prostředí v závislosti na denní době. Cílem naší studie bylo metodou *in situ* hybridizace popsat expresi *Dexras1* mRNA v mozku potkana během ontogeneze a ve vývoji při zrakové sensorické deprivaci. Nejčasněji jsme detekovali expresi *Dexras1* v mozku potkana ve 20. embryonálním dni, a to pouze v SCN a ve ventrálním posteromediálním jádře talamu. Až postnatálně se jeho exprese objevovala také v ostatních sensorických strukturách, v motorických strukturách talamu, v hypotalamických strukturách podílejících se na regulaci vodní homeostázy či ve strukturách limbického systému. Naše výsledky dále ukazují, že zraková sensorická deprivace potlačuje expresi *Dexras1* v několika oblastech zpracovávajících zrakový vjem a posiluje jeho expresi v čichových strukturách. To naznačuje, že *Dexras1* může hrát roli v procesu, kterým nervový systém kompenzuje deprivaci jednoho sensorického systému posílením jiného.

Klíčová slova: *Dexras1*, G-protein, mozek, ontogeneze, cirkadiánní systém, zraková sensorická deprivace

ABSTRACT

The *Dexas1* gene was identified after induction by glucocorticoid dexamethasone in pituitary tumor cells. *Dexas1* has also been found in other brain regions and in the peripheral organs but its expression is rhythmic only in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN), where the mammalian main circadian pacemaker is located. *Dexas1* expression was also affected by stress, amphetamine or prenatal alcohol exposure. Its role in cells has not yet been explained. *Dexas1* GTPase activity has been determined to be dependent on the NMDA receptor stimulation. *Dexas1* acts as an activator of G protein signaling in cells. Its role has been detected in neuronal iron homeostasis or in the regulation of main circadian pacemaker sensitivity to photic and nonphotic synchronization cues during the day. The aim of our study was to describe the *Dexas1* mRNA expression in the rat brain during ontogeny and during development after visual sensory deprivation by *in situ* hybridization. The earliest *Dexas1* expression was detected on embryonic day 20, in the rat SCN and the ventral posteromedial thalamic nucleus. Postnatally, its expression also appeared in other sensory areas, motor thalamic areas, hypothalamic areas involved in the regulation of water homeostasis, or in limbic system. Our results further show that the sensory deprivation suppress *Dexas1* expression in several brain areas involved in visual processing and enhance its expression in olfactory structures. It suggests that *Dexas1* could play the role in the process by which the neuronal system compensates the deprived sensoric system by strengthening of the other.

Key words: *Dexas1*, G protein, brain, ontogeny, circadian system, visual sensory deprivation

OBSAH

Seznam použitých zkratk	7
1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Struktura, lokalizace, signalizace a úloha <i>Dexas1</i> v organismu	11
2.1.1 Signalizace <i>Dexas1</i>	11
2.1.1.1 Signalizace <i>Dexas1</i> přes heterotrimerní G-proteiny	12
2.1.2 <i>Dexas1</i> a glukokortikoidy	14
2.1.3 Úloha <i>Dexas1</i> v patologii centrálního nervového systému	14
2.2 Cirkadiánní systém	16
2.2.1 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin	17
2.2.2 Úloha <i>Dexas1</i> v cirkadiánním systému	20
2.3 Senzorická deprivace	23
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	25
4. MATERIÁL A METODY	26
4.1 Experimentální zvířata	26
4.2 Experimentální paradigma	26
4.2.1 Ontogenetický experiment	26
4.2.2 Experiment světelné deprivace mláďat	27
4.3 Stanovení exprese <i>Dexas1</i> mRNA metodou <i>in situ</i> hybridizace	27
4.3.1.1 Potřebné vybavení a chemikálie	28
4.3.1.2 Postup detekce mRNA v mozku metodou <i>in situ</i> hybridizace	30
4.3.1.3 Detekce signálu z <i>in situ</i> hybridizace	32
4.3.1.4 Statistická analýza	33
5. VÝSLEDKY	34
5.1 Vývoj exprese <i>Dexas1</i> mRNA v mozku potkana během ontogeneze	34
5.1.1 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v telencefalických strukturách potkana	35
5.1.2 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v diencefalických strukturách potkana	37
5.1.2.1 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v talamu potkana	37
5.1.2.2 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v hypotalamu potkana	40
5.1.3 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v mesencefalonu potkana	41
5.1.4 Vývoj v expresi <i>Dexas1</i> v metencefalonu potkana	42
5.2 Změny v expresi <i>Dexas1</i> v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci	43

5.2.1	Změny v expresi hodinových genů <i>Per1</i> a <i>Rev-erba</i> v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci	50
5.2.1.1	Změny v expresi <i>Per1</i> v mozku potkanů po světelné deprivaci	50
5.2.1.2	Změny v expresi <i>Rev-erba</i> v mozku potkanů po světelné deprivaci	51
5.2.2	Změny v expresi neurotrofického faktoru BDNF v mozku potkanů po světelné deprivaci	52
6.	DISKUZE	53
7.	ZÁVĚR.....	59
8.	LITERATURA	60

Seznam použitých zkratk

AC, AC2 - adenylyl cykláza (2)
ACBD3 - *acyl coenzyme A binding domain 3*
AGS, AGS1 - aktivátor G-proteinové signalizace 1 (*activators of G protein signaling*)
AICD - *amyloid precursor protein intracellular domain*
AtT-20 buňky - buňky tumoru hypofýzy myši domácí
AVP - arginin vasopresin
Bdnf/BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*
Bmal1/ BMAL1- *brain and muscle Arnt-like protein 1*
cAMP - cyklický adenosin monofosfát
CAPON - *carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*
ccg - hodinami kontrolovaný gen (*clock-controlled gene*)
CKI ϵ/δ - kasein kináza1 ϵ/δ
Clock/ CLOCK- *circadian locomotor output cycles kaput*
CRE oblast - *cAMP response element*
CREB - Ca^{2+} /cAMP response element binding protein
Cry1,2/ CRY1,2 - *Cryptochrome 1 a 2*
CT14, CT4 - cirkadiánní čas (*circadian time*)
DD - světelný režim stálé tmy (*dark-dark cycle*)
Dexas1 - *dexamethasone-induced Ras-related protein 1*
dmSCN - dorsomediální část suprachiasmatických jader
DMT1 - transportér pro divalentní ionty (*divalent metal transporter 1*)
E0, E20 - 0. anebo 20. den embryonálního vývoje (*embryonic day*)
EAE - experimentální autoimunitní encefalomyelitida
ERK1/2 - extracelulárním signálem regulované kinázy 1 a 2 (*extracellular signal-regulated kinase*)
G $\alpha_{i/o}$ podjednotka - α podjednotka G $_{i/o}$ -proteinu
GDP - guanosin difosfát
GPCR - receptor spřažený s G-proteinem (*G protein coupling receptor*)
GRE - *glucocorticoid response element*
GTP - guanosin trifosfát
IGF, IGF-1 - *insuline-like growth factor (1)*
LD - světelný režim světlo-tma (*light-dark cycle*)
MAPK - mitogenem aktivovaná protein kináza (*mitogen-activated protein kinase*)
NMDA receptory - N-methyl-D-aspartátové receptory
nNOS - neuronální NO syntáza (*neuronal nitric oxid synthase*)
NO - oxid dusnatý
NOS1AP - *nitric oxid synthase 1 adaptor protein*
Npas2 - *neuronal PAS domain-containing protein 2*
P1, P5, P10, P60... - 1., 5., 10., 60. postnatální den (*postnatal day*)
PACAP - *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*
PAP7 - *peripheral benzodiazepine receptor-associated protein*
PDZ-doména - *PSD-95/discs-large/ZO-1 domain*
Per1,2/ PER1,2 - *Period 1 a 2*
PKA - protein kináza A
PKC δ - protein kináza C δ
PTB(2) doména - doména vázající fosfotyrosin (*phosphotyrosine-binding domain*)
Rgs16/RGS16 - regulátor G-proteinové signalizace 16 (*regulator of G protein signaling 16*)

RHT - retinohypotalamický trakt
Rora/ RORα - *retinoic acid-related orphan receptor α*
SCN - suprachiasmatická jádra (*suprachiasmatic nuclei*)
UTP - uridin trifosfát
VIP - vasoaktivní intestinální peptid
vlSCN - ventrolaterální část suprachiasmatických jader

Seznam použitých zkratk mozkových struktur

AD - anterodorsální jádro talamu (*anterodorsal thalamic nucleus*)
AOE - vnější část anteriorního olfaktorického jádra (*anterior olfactory nucleus, external part*)
AOP - posteriorní část anteriorního olfaktorického jádra (*anterior olfactory area, posterior part*)
AOVP - ventroposteriorní část anteriorního olfaktorického jádra (*anterior olfactory area, ventroposterior part*)
AVDM - dorsomediální část anteroventrálního jádra (*anteroventral thalamic nucleus, dorsomedial part*)
BLA - anteriorní část basolaterálního amygdaloidního jádra (*basolateral amygdaloid nucleus, anterior part*)
DC - dorsální kochleární jádro (*dorsal cochlear nucleus*)
DEn - dorsální endopiriformní jádro (*dorsal endopiriform nucleus*)
DLG - dorsální část laterálního genikulárního jádra talamu (*dorsal lateral geniculate nucleus*)
dmSCN - dorsomediální část suprachiasmatických jader (*dorsomedial suprachiasmatic nucleus*)
FrA - frontální asociační kůra (*frontal association cortex*)
GrDG - granulární vrstva gyru dentatu (*granular layer of the dentate gyrus*)
HDB - diagonální skupina jader olfaktorického horizontálního limbu (*nucleus of the horizontal limb of the diagonal band*)
LaDL - dorsolaterální část laterálního amygdaloidního jádra (*lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral part*)
LOT2 - druhá vrstva jádra laterálního olfaktorického traktu (*nucleus of the lateral olfactory tract, layer 2*)
LSI - intermediální část laterálního septálního jádra (*lateral septal nucleus, intermediate part*)
MeAV - anteroventrální část mediálního amygdaloidního jádra (*medial amygdaloid nucleus, anteroventral part*)
MGV - ventrální část mediálního genikulárního jádra (*medial geniculate nucleus, ventral part*)
PaLM - laterální magnocelulární část paraventriculárního jádra hypotalamu (*paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular part*)
Pir2 - druhá vrstva piriformní kůry (*piriform cortex, layer 2*)
PVA - anteriorní část paraventriculárního jádra talamu (*paraventricular thalamic nucleus, anterior part*)
RSG - retrosplenální granulární kůra (*retrosplenial granular cortex*)
RtTg - retikulo-tegmentální jádro Varolova mostu (*reticulotegmental nucleus of the pons*)
SFO - subfornikální orgán (*subfornical organ*)
SNCD - dorsální část substantia nigra pars compacta (*substantia nigra, compact part, dorsal tier*)
SO - supraoptické jádro (*supraoptic nucleus*)
SuVe - superiorní vestibulární jádro (*superior vestibular nucleus*)
VA - ventrální anteriorní jádro talamu (*ventral anterior thalamic nucleus*)
VCl - ventrální část klaustra (*ventral part of claustrum*)
VL - ventrolaterální jádro talamu (*ventrolateral thalamic nucleus*)

vlSCN - ventrolaterální část suprachiasmatických jader (*ventrolateral suprachiasmatic nucleus*)
VMHVL - ventrolaterální část ventromediálního jádra hypotalamu (*ventromedial hypothalamic nucleus, ventrolateral part*)
VPL - ventrální posterolaterální jádro (*ventral posterolateral thalamic nucleus*)
VPM - ventrální posteromediální jádro talamu (*ventral posteromedial thalamic nucleus*)
VTT2 - druhá vrstva ventrální tenia tecta (*ventral tenia tecta, layer 2*)

1. ÚVOD

Dexas1 je malá GTPáza, která byla poprvé objevená po aplikaci kortikosteroidu dexametazonu do buněk tumoru hypofýzy (Kemppainen & Behrend, 1998). Její exprese v mozku lze rychle indukovat také injekcí amfetaminu (Schwendt & McGinty, 2010). Exprese *Dexas1* byla dále nalezena také v srdci, játrech, ledvinách, plicích a jiných periferních orgánech (Kemppainen & Behrend, 1998; Fang *et al.*, 2000). Rytmicky je však *Dexas1* exprimován pouze v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (Panda *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Hahnová *et al.*, 2016), kde je uložený hlavní cirkadiánní pacemaker savců (Stephan & Zucker, 1972; Ralph & Menaker, 1988; Ralph *et al.*, 1990). Zde *Dexas1* zastává úlohu v regulaci citlivosti cirkadiánního pacemakeru na světelné i nesevětelné synchronizační stimuly během dne (Cheng *et al.*, 2004, 2006; Koletar *et al.*, 2011; Bouchard-Cannon & Cheng, 2012), které seřizují fyziologické, metabolické, imunologické, ale také behaviorální funkce s denní dobou. Doposud byly zjištěny ještě další role *Dexas1* v buňkách, například v udržování homeostázy vnitrobuněčného železa (Cheah *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2013, 2015; White *et al.*, 2016), v indukci adipogeneze řízené glukokortikoidy (Cha *et al.*, 2013) či ve specifické aktivaci signalizace řízené přes $G_{i/o}$ -proteiny bez aktivace receptorů spřažených s těmito G-proteiny (Graham *et al.*, 2002, 2004; Nguyen & Watts, 2005; Harrison & He, 2011).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Struktura, lokalizace, signalizace a úloha Dexas1 v organismu

Dexas1 (*dexamethasone-induced Ras-related protein 1*) je malá GTPáza, jejíž exprese byla poprvé identifikována po indukci syntetickým glukokortikoidem dexametazonem v buněčné linii AtT-20 myšního hypofyzárního tumoru, která vylučuje adenokortikotropní hormon (Kemppainen & Behrend, 1998). Myší *Dexas1* vykazuje 97% homologii s potkaním *Dexas1* a velmi podobnou sekvenci má i lidský *Dexas1* lokalizovaný na chromozomu 2q32 (Cismowski *et al.*, 1999, 2000; Graham *et al.*, 2001). *Dexas1* byl nalezen také u *Drosophila melanogaster*, u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Cismowski *et al.*, 2000, 2001; Graham *et al.*, 2001).

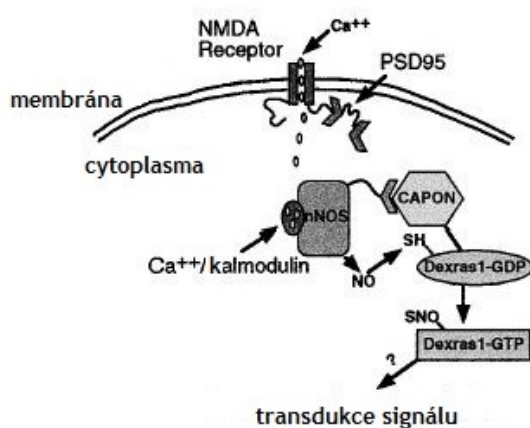
Expresi *Dexas1* mRNA u myší byla identifikována v mozku, srdci, játrech a ledvinách (Kemppainen & Behrend, 1998). U potkanů byla navíc naměřená i v plicích, slezině, kosterním svalstvu a varlatech (Fang *et al.*, 2000). Studie Fanga a kolegů (2000) také popisuje expresi *Dexas1* v mozku metodou *in situ* hybridizace. Autoři identifikovali nejvyšší expresi *Dexas1* mRNA v kortexu, v přídatném olfaktorickém jádře, supraoptickém jádře, v CA1 a CA2 oblastech hipokampu, v gyru dentatu a v Purkyňových buňkách mozečku. Nižší expresi *Dexas1* našli v talamu, v substantia nigra pars compacta a v CA3 oblasti hipokampu.

Dexas1 bývá někdy označován jako Rasd1, protože je díky 35% homologii zařazen do superrodiny Ras, zahrnující malé G proteiny. V sekvenci proteinu Dexas1 byly zjištěny vysoce konzervované domény pro vazbu a hydrolýzu guanosin trifosfátu (GTP), vazebná oblast přítomná na P smyčce pro fosfát/magnesium a charakteristický CAAX motiv na C-konci (Kemppainen & Behrend, 1998; Cismowski *et al.*, 2000). Od ostatních členů superrodiny se však Dexas1 odlišuje C-koncem delším o 7 kDa a tedy větší velikostí (celkově má 31 kDa). Na prodlouženém C-konci se nachází oblasti pro vazbu s adaptorovými proteiny FE65 a CAPON (*z angl. carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*; někdy označovaný jako NOS1AP *z angl. nitric oxid synthase 1 adaptor protein*), jež zprostředkovávají unikátní signalizaci indukovanou Dexas1 (Jaffrey *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2008).

2.1.1 Signalizace Dexas1

V buněčných lyzátech mozku byla zjištěna selektivní vazba C-konce Dexas1 k doméně vázající fosfotyrosin (PTB; *z angl. phosphotyrosine-binding domain*), nacházející se na N-

konci cytoplazmatického proteinu CAPON. Jelikož současně C-terminální doména proteinu CAPON interaguje s PDZ doménou (*z angl. PSD-95/discs-large/ZO-1*) na N-konci neuronální NO syntázy (nNOS), dochází k tvorbě ternárního komplexu nNOS/CAPON/Dexas1, který usnadňuje aktivaci GTPázové aktivity Dexas1 (Jaffrey *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2000). Oxid dusnatý (NO) vytvořený nNOS nitrosyluje sulfanylovou skupinu cysteinu11 v Dexas1 na nitrosothiolovou skupinu, čímž iniciuje výměnu vázaného guanosin difosfátu (GDP) na Dexas1 za GTP a tedy aktivaci Dexas1 (Lander *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2000; Jaffrey *et al.*, 2002). Navíc v korových neuronech potkana bylo prokázáno, že tato aktivace Dexas1 je regulována aktivací glutamátových N-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA), o nichž je známo, že se mohou vázat přes adaptorový protein PSD-95/93 k nNOS (*obr. 1*) (Kornau *et al.*, 1995; Brenman *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2000). Vápník, vstupující NMDA receptory do buňky, se váže na kalmodulin a komplex vápník/kalmodulin iniciuje nNOS k tvorbě NO (Bredt & Snyder, 1990; Fang *et al.*, 2000).



*Obr. 1: Aktivace Dexas1 závisí na stimulaci NMDA receptorů. Stimulované NMDA receptory propouští do buňky vápenaté ionty, které ve vazbě na kalmodulin podporují aktivaci GTPázové aktivity Dexas1 řízenou NO (Převzato z Fang *et al.*, 2000).*

2.1.1.1 Signalizace Dexas1 přes heterotrimerní G-proteiny

Protein Dexas1 bývá také řazen do rodiny aktivátorů G-proteinové signalizace (AGS), které fungují nezávisle na aktivitě receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Díky této funkci byl objeven lidský homolog Dexas1, který byl označen jako AGS1 (Cismowski *et al.*, 1999). Bylo ukázáno, že Dexas1 aktivuje signalizaci přes heterotrimerní G-proteiny, nezávisle na aktivaci GPCR vazbou agonisty. Dexas1 se váže k α podjednotce $G_{i/o}$ -proteinu ($G_{\alpha i/o}$) s navázaným GDP (Cismowski *et al.*, 2000, 2001, Graham *et al.*, 2002, 2004; Nguyen & Watts, 2005; Harrison & He, 2011) a zřejmě usnadňuje jeho výměnu za GTP, čímž podporuje disociaci podjednotek $G_{i/o}$ -proteinu na $G_{\alpha i/o}$ -GTP a $G_{\beta\gamma}$ komplex

(Cismowski *et al.*, 2000, 2001, Graham *et al.*, 2002, 2004; Takesono *et al.*, 2002). Dexras1 zůstává pravděpodobně navázán na $G_{ai/o}$ podjednotce (Cismowski *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2004) a aktivuje signalizaci řízenou $G_{ai/o}$ podjednotkou, například inhibiční účinek na aktivitu adenylyl cyklázy (AC), vedoucí k poklesu produkce cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) (Graham *et al.*, 2004; Harrison & He, 2011) a k útlumu transkripce genů závislé na cAMP. Tento inhibiční vliv Dexras1 na transkripční aktivitu CREB (*z angl. Ca²⁺/cAMP response element binding protein*) by mohl mít důležitý význam v mnoha fyziologických procesech (Graham *et al.*, 2004). Dexras1 je také schopen aktivovat signalizaci řízenou $G_{\beta\gamma}$ komplexem, nezávisle na aktivaci GPCR vazbou agonisty; konkrétně bylo prokázáno, že Dexras1 specificky spouští ERK1,2/MAP-kinázovou dráhu (extracelulárním signálem regulované kinázy 1 a 2; MAPK - mitogenem aktivovaná protein kináza)(Graham *et al.*, 2002; Nguyen & Watts, 2005).

Vazbou Dexras1 k $G_{ai/o}$ podjednotce a disociací podjednotek $G_{i/o}$ -proteinu brání Dexras1 znovu utvoření heterotrimerního komplexu $G_{i/o}$ -proteinu a blokuje tak aktivaci signalizace přes $G_{i/o}$ -proteiny stimulované vazbou agonisty k membránově vázaným GPCR (Graham *et al.*, 2002; Takesono *et al.*, 2002; Nguyen & Watts, 2005). Dexras1 tímto mechanismem inhiboval například $G_{\beta\gamma}$ -řízenou aktivaci dovnitř usměřujících draselných kanálů stimulovanou aktivací spřažených acetylcholinových muskarinových receptorů typu M_2 v *in vitro* podmínkách (Takesono *et al.*, 2002). Jiná studie demonstrovala inhibiční vliv Dexras1 na aktivitu AC2, stimulované vazbou agonisty k GPCR, nejen potlačením $G_{\beta\gamma}$ -řízené aktivace protein kinázy $C\delta$ (PKC δ), která má stimulační účinek na aktivitu AC2, ale také signifikantním snížením autofosforylace PKC δ , vedoucím ke ztrátě jejich katalytických schopností (Nguyen & Watts, 2006).

Výše uvedené studie prokazují, že Dexras1 blokuje signalizaci přes receptory spřažené s $G_{i/o}$ -proteiny, ba dokonce sám může spouštět konkurenční signalizační dráhy přes aktivaci heterotrimerních $G_{i/o}$ -proteinů nezávisle na stimulaci GPCR. Některé studie proto dále zkoumaly vliv Dexras1 na signalizaci řízenou přes $G_{s/olf}$ -proteiny. Nguyen a Watts (2006) demonstrovali, že Dexras1 neovlivňuje $G_{as/olf}$ - řízenou akumulaci cAMP způsobenou aktivací AC2 po stimulaci β -adrenergických receptorů a že Dexras1 pravděpodobně nenarušuje aktivaci $G_{as/olf}$ podjednotky přes agonistou stimulovaný GPCR (Nguyen & Watts, 2006). Harrison a He (2011) navíc zjistili, že Dexras1 se v buněčných lysátech striata myši neváže k $G_{as/olf}$ podjednotce, přestože tlumí aktivaci AC řízenou $G_{as/olf}$ podjednotkou, aktivovanou přes dopaminový receptor typu D1 (Harrison & He, 2011). Obě studie tedy prokázaly, že Dexras1 nekompetuje s GPCR o vazbu

na $G_{as/olf}$ podjednotce, na rozdíl od vazby *Dexas1* s $G_{ai/o}$ podjednotkou (Graham *et al.*, 2002). Pozorovaný inhibiční účinek *Dexas1* na aktivitu AC byl pravděpodobně zprostředkován přes interakci *Dexas1* s $G_{ai/o}$ podjednotkou, vedoucí k aktivaci $G_{ai/o}$ -řízené signalizace nezávisle na aktivaci přes GPCR. A proto dosud jediným známým způsobem, jak může *Dexas1* tlumit $G_{s/olf}$ -proteinem řízenou signalizaci, je cestou aktivace protichůdné $G_{ai/o}$ -řízené signalizace nezávisle na aktivaci GPCR (Harrison & He, 2011).

2.1.2 *Dexas1* a glukokortikoidy

V promotoru genu pro lidský *Dexas1* byly nalezeny tři regulační sekvence pro glukokortikoidy (GRE, z *angl. glucocorticoid response element*) (Kemppainen *et al.*, 2003). Původní práce ukázaly, že syntetický analog dexametazon a kortikosteron indukovaly expresi *Dexas1* v myších buňkách AtT-20, ostatní endogenní steroidy však jeho expresi neovlivnily (Brogan *et al.*, 2001). Spolu s poznatky o negativní zpětné vazbě glukokortikoidů na sekreci adenokortikotropního hormonu z adenohipofýzy, tato data naznačují možnou účast *Dexas1* v této zpětnovazebné regulaci produkce glukokortikoidů (Phillips & Tashjian, 1982; Brogan *et al.*, 2001). Tuto hypotézu podporují i výsledky studie Greenwooda a kolegů (2016) kteří ukázali, že rychlá indukce *Dexas1* v myších buňkách AtT-20 po aplikaci dexametazonu závisí na signalizačních drahách řízených glukokortikoidními receptory a že *Dexas1* je schopný v hypotalamu potlačit transkripci genů řízenou CREB v reakci na působení stresorů (Greenwood *et al.*, 2016).

Cha a spolupracovníci (2013) zjistili, že *Dexas1* řídí adipogenezi spojenou s glukokortikoidy, protože je nezbytný pro diferenciaci preadipocytů v adipocyty. Tyto poznatky o souvislosti *Dexas1* s obezitou nabízí možnost léčby obezity farmakologickými inhibitory *Dexas1* (Cha *et al.*, 2013).

2.1.3 Úloha *Dexas1* v patologii centrálního nervového systému

Výsledky několika studií naznačují možnou úlohu *Dexas1* v patologiích neurodegenerativních poruch, ale i ve vývoji neuronálních mechanismů drogové závislosti, čímž pravděpodobně odkrývají novou oblast zájmu s klinickým významem.

Studie Lau a kolegů (2008) ukázala roli *Dexas1* v patogenezi Alzheimerovy choroby. Autoři studie objevili v korových neuronech potkana interakci C-konce *Dexas1* s PTB2 doménou na proteinu FE65 (Lau *et al.*, 2008) a prokázali, že většina *Dexas1* vázaného k FE65 se translokuje do jádra, kde potlačuje transkripci genů řízenou AICD (z *angl. amyloid precursor protein intracellular domain*), například glykogen syntázy kinázy 3β (von Rotz *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2008), jejímž substrátem je tau protein (Lovestone *et al.*,

1994; Takashima *et al.*, 1998). Autoři studie dále zjistili, že fosforylace tyrosinu⁵⁴⁷ v PTB2 doméně FE65 vede ke snížené schopnosti Dexras1 vázat se k FE65 a tedy posiluje transkripci genů řízenou FE65-AICD (Lau *et al.*, 2008), vedoucí ke zvýšené fosforylaci tau proteinu (Kim *et al.*, 2003).

Akumulace vnitrobuněčného železa bývá také často spojována s neurodegenerativními poruchami (Thomas & Jankovic, 2004). Například u pacientů s Parkinsonovou chorobou byla v dopaminergních neuronech substantia nigra pars compacta zjištěna vysoká hladina vnitrobuněčného železa (Dexter *et al.*, 1989; Hirsch *et al.*, 1991) spolu se zvýšenou expresí transportéru pro divalentní ionty (DMT1, z *angl. divalent metal transporter 1*) (Salazar *et al.*, 2008). Cheah a kolegové (2006) ukázali, že se Dexras1 váže pomocí adaptorového proteinu PAP7 (z *angl. peripheral benzodiazepine receptor-associated protein*) k DMT1, ležícímu v plazmatické membráně myších neuronů, a řídí tak vychytávání železnatých iontů do buněk (Cheah *et al.*, 2006). White a spolupracovníci (2016) objevili v neuronech myšiči hipokampu interakci Dexras1, aktivovaného dráhou NMDA-nNOS-NO (Fang *et al.*, 2000; Jaffrey *et al.*, 2002), s DMT1 v lysosomální membráně, přes adaptorový protein ACBD3 (z *angl. acyl CoA binding domain 3*), podporující transport železnatých iontů skrze DMT1 z lysosomu do cytosolu buňky (White *et al.*, 2016). Společně tyto studie naznačují, že Dexras1 řídí přepravu železnatých iontů v neuronech a podílí se tak na akumulaci železnatých iontů v buňce. Nevázané železnaté ionty v neuronech významně přispívají k tvorbě volných hydroxylových radikálů, působících oxidační stres (Gutteridge, 1994; Garrick *et al.*, 2006) a následnou buněčnou smrt neuronů (Cheah *et al.*, 2006). Neurotoxicitu řízenou Dexrasem1 a NMDA receptory se podařilo potlačit genetickou delecí *Dexras1* u myši (Chen *et al.*, 2013), anebo selektivní chelatací železa v kulturách primárních korových neuronů potkana (Cheah *et al.*, 2006). Chen a spolupracovníci (2015) nedávno zjistili, že protein kináza A (PKA) specificky fosforyluje Dexras1 na serinu²⁵³, čímž pravděpodobně pozmění strukturu Dexras1, vedoucí k zastínění cysteinu¹¹, jenž brání S-nitrosylaci Dexras1, řízené dráhou NMDA-nNOS-NO, u HEK293T buněk (Chen *et al.*, 2015). Tato studie dále prokázala, že Dexras1 se primárně vyskytuje ve fosforylovaném stavu, ale S-nitrosylace pravděpodobně nastává přednostně na nefosforylovaném Dexras1. PKA tedy inhibuje přepravu železa řízenou Dexras1 (Chen *et al.*, 2015). Společně tyto studie nabízí možnou úlohu případných inhibitorů Dexras1 v terapii neurodegenerativních poruch spojených s akumulací železnatých iontů v neuronech.

Dexas1 je také spojován s vývojem experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) potkanů, která se používá jako experimentální model roztroušené sklerózy (Brück & Stadelmann, 2005; Gao *et al.*, 2010). Tuto autoimunitní chorobu doprovází demyelinizace axonů končící paralýzou (Brück & Stadelmann, 2005). U potkanů trpících EAE byla nalezena signifikantně zvýšená exprese *Dexas1* v neuronech hipokampu a kalózního tělesa, ale také v oligodendrocytech páteřní míchy. V těchto oblastech byla nalezena v kolokalizaci s apoptotickým markerem kaspázou 3, ale také s up-regulovanou nNOS nebo s up-regulovaným CAPON. Tato zjištění tedy naznačují, že by se ternární komplex nNOS/CAPON/Dexas1 mohl pravděpodobně účastnit apoptotického procesu v centrálním nervovém systému při vývoji EAE (Gao *et al.*, 2010).

Nedávno Schwendt a McGinty (2010) demonstrovali roli *Dexas1* v utváření drogové závislosti. Autoři studie pozorovali, že intraperitoneální podání jediné dávky amfetaminu (2,5 mg/kg) dočasně indukovalo selektivní nárůst exprese *Dexas1* v prefrontální kůře potkana, naměřený 3 hodiny od aplikace. Opakované podání menší dávky amfetaminu také vyvolalo v prefrontální kůře potkanů up-regulovanou expresi *Dexas1*. Jelikož psychostimulanty ovlivňují dopaminergní systém v mozku (Cabib *et al.*, 1991), zaměřili se autoři studie také na jeho vliv na amfetaminem indukovanou expresi *Dexas1* a zjistili, že exprese *Dexas1* v prefrontální kůře je zřejmě regulována přes dopaminové receptory typu D2 a částečně i přes glukokortikoidní receptory. *Dexas1* se zřejmě prostřednictvím regulace G-proteinové signalizace v kůře podílí na vytvoření neuroadaptačních mechanismů měnících citlivost neuronů k psychostimulantům a tedy na utváření drogové závislosti na psychostimulantech (Schwendt & McGinty, 2010).

2.2 Cirkadiánní systém

Vnitřní cirkadiánní systém řídí načasování chování živočichů a také všech fyziologických i biochemických procesů v těle s denní dobou. Výsledkem jsou cirkadiánní rytmy v tělesné teplotě, cyklu spánku a bdění, v produkci a sekreci hormonů, v kolísání krevního tlaku, v regulaci metabolismu glukózy či v imunitních odpovědích organismu (Coogan & Wyse, 2008; Hasler *et al.*, 2010; Kalsbeek *et al.*, 2014; Gubin *et al.*, 2017). Cirkadiánní rytmy se opakují s přibližně 24hodinovou periodou, jejíž délku určuje endogenní molekulární mechanismus vnitřních hodin a k přesné 24hodinové periodě jsou přizpůsobovány pravidelným střídáním světla a tmy během dne a noci.

Vnitřní hodiny savců zahrnují hlavní cirkadiánní pacemaker, který sídlí v suprachiasmatických jádrech předního hypotalamu (SCN) (Stephan & Zucker, 1972; Ralph & Menaker, 1988; Ralph *et al.*, 1990), dále podřízené periferní cirkadiánní oscilátory v orgánech a tkáních (Yamazaki *et al.*, 2000; Storch *et al.*, 2002) a autonomní cirkadiánní oscilátory v sítnici (Ruan *et al.*, 2006; Tosini *et al.*, 2007; Baba *et al.*, 2010) a v čichových lalocích (Abe *et al.*, 2002; Granados-Fuentes *et al.*, 2004). Jelikož každá buňka lidského těla, včetně bezjaderného erytrocytu (O'Neill & Reddy, 2011), obsahuje vlastní cirkadiánní oscilátor, hlavní cirkadiánní pacemaker musí svými elektrickými, endokrinními či metabolickými signály synchronizovat tkáňově specifické oscilátory s denní dobou (Buijs *et al.*, 1999; Storch *et al.*, 2002; Kalsbeek *et al.*, 2004).

SCN potkana obsahují přibližně dvacet tisíc neuronů (Van den Pol, 1980) a bývají funkčně rozdělována na ventrolaterální část (vlSCN; anglicky „core“) a dorsomediální část (dmSCN; anglicky „shell“), protože neurony vlSCN přednostně syntetizují vasoaktivní intestinální peptid (VIP) a gastrin releasing peptid, zatímco neurony dmSCN nejsilněji exprimují arginin vasopresin (AVP) (Moore *et al.*, 2002). Neurony vlSCN přijímají informaci světla přímo ze sítnice vedenou přes retinohypotalamický trakt (RHT) (Moore *et al.*, 1995; Gooley *et al.*, 2001; Gamlin *et al.*, 2007), ale také nepřímo přes genikulohypotalamický trakt z intergenikulárních lístků talamu, které jsou také přímo spojené se sítnicí (Moore & Card, 1994; Moore *et al.*, 2000). Neurony dmSCN jsou na rozdíl od neuronů vlSCN vnitřně rytmické (Dardente *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002).

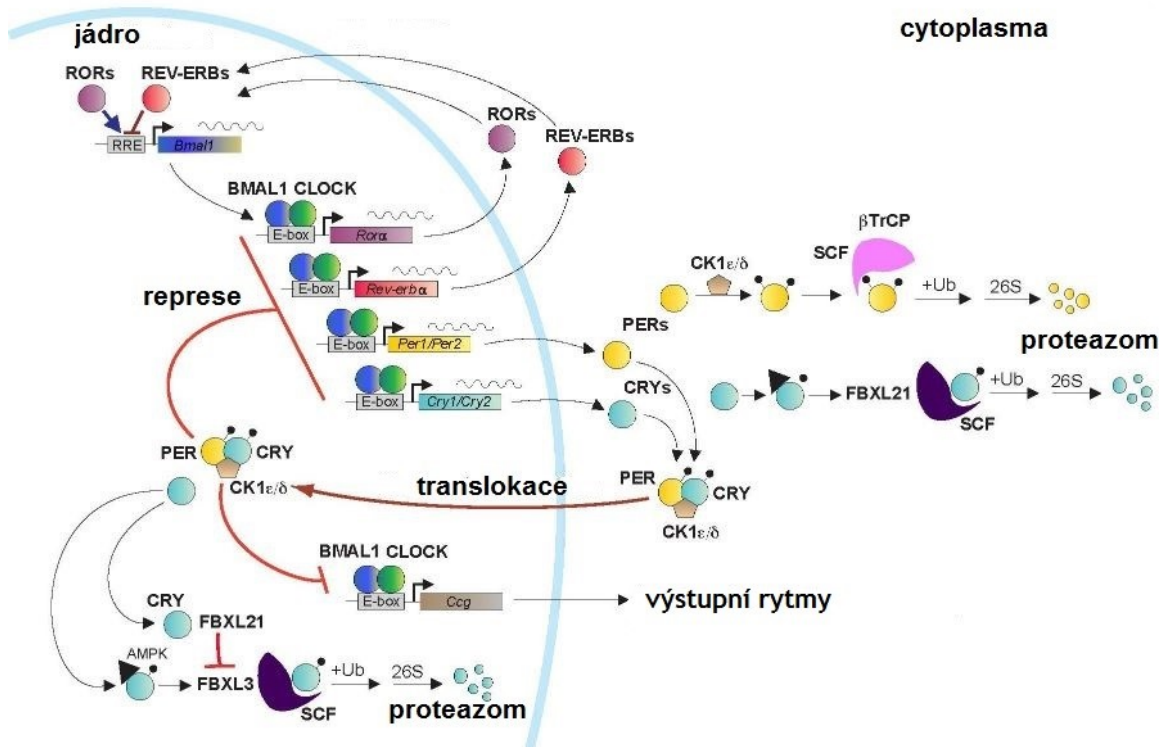
2.2.1 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin

Provázanost oscilací posttranslačních modifikací proteinů se zpětnovazebnými transkripčně-translačními smyčkami hodinových genů a jejich proteinových produktů utváří endogenní molekulární mechanismus savčích cirkadiánních hodin, udávající délku volně běžící periody cirkadiánních rytmů.

Na začátku subjektivního dne proteiny hodinových genů *Clock* (z angl. *circadian locomotor output cycles kaput*) a *Bmal1* (z angl. *brain and muscle Arnt-like protein 1*) společně v jádře utváří heterodimer CLOCK:BMAL1, který vazbou na E-box v promotoru hodinových genů *Period 1,2* (*Per1,2*) a *Cryptochrome 1,2* (*Cry1,2*) spouští jejich transkripci (Gekakis *et al.*, 1998). Během subjektivního dne se vytvořené proteiny PER1,2 a CRY1,2 hromadí v cytoplasmě a utváří heterodimery. Postupně se oba typy heterodimerů spojují v multimerní komplexy s kasein kinázou 1 ϵ/δ (CKI ϵ/δ), která je fosforyluje (Vielhaber *et al.*, 2000; Akashi *et al.*, 2002; Eide *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009; Etchegaray

et al., 2010). Fosforylace podporuje translokaci komplexů do jádra, kde během večera zpětnovazebně inaktivují heterodimer CLOCK:BMAL1, a tím i vlastní transkripci (Zylka *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999; Vielhaber *et al.*, 2000; Eide *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Ke konci subjektivní noci jsou proteiny PER1,2 a CRY1,2 fosforylovány kinázami CKI ϵ/δ a protein kinázou aktivovanou adenosin monofosfátem, následně jsou ubiquitinovány a degradovány - v případě PER1,2 v proteazomu (Akashi *et al.*, 2002; Eide *et al.*, 2005), v případě CRY1,2 v komplexu s SCF E3 ubiquitin ligázou obsahující FBXL3 (Eide *et al.*, 2002; Busino *et al.*, 2007; Siepka *et al.*, 2007). Degradace negativních elementů PER1,2 a CRY1,2 umožní opět obnovit aktivační heterodimer CLOCK:BMAL1 (Hastings *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999; Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000).

Jelikož heterodimer CLOCK:BMAL1 dále řídí také transkripci hodinových genů *Rev-erba* a *Rora* (z angl. *retinoic acid-related orphan receptor α*), jejichž proteinové produkty zpětnovazebně regulují transkripci genu *Bmall*, utváří se sekundární zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka (obr. 2) (Preitner *et al.*, 2002; Guillaumond *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2012). Proteiny REV-ERB α a ROR α mají opačný účinek na *Bmall* a kompetují spolu o vazbu k RORE sekvenci v promotoru genu *Bmall* (Giguère *et al.*, 1994; Preitner *et al.*, 2002). REV-ERB α transkripci genu *Bmall* potlačuje, zatímco ROR α ji aktivuje (Preitner *et al.*, 2002; Guillaumond *et al.*, 2005). Celý mechanismus ještě doplňuje přímá interakce N-koncového motivu LXXLL proteinu PER2 s lysinem456 v doméně vázající ligand proteinu REV-ERB α . Takto může protein PER2 regulovat genovou transkripci řízenou REV-ERB α a precizně synchronizovat obě zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky (Schmutz *et al.*, 2010).



Obr. 2: Schéma molekulárního mechanismu savčích cirkadiálních hodin. Heterodimery CLOCK:BMAL1 aktivují transkripci hodinových genů *Per1,2*, *Cry1,2*, *Rev-erba* a *Rora* i genů kontrolovaných hodinami (*ccg*; z angl. *clock-controlled genes*). Proteinové produkty *PER1,2* a *CRY1,2* utváří negativní zpětnovazebnou smyčku, *REV-ERBa* a *RORa* tvoří sekundární zpětnovazebnou smyčku regulující transkripci genu *Bmal1*. Načasování těchto smyček hodinového mechanismu řídí řada posttranslačních modifikací tak, aby se utvářela endogenní 24hodinová perioda cirkadiálních rytmů (Převzato a upraveno z <http://www.hhmi.org/research/molecular-and-genetic-analysis-mammalian-circadian-clocks> dne 30. 6. 2017).

Při absenci hodinového genu *Clock* může jeho funkci v předním mozku převzít hodinový gen *Npas2* (z angl. *neuronal PAS domain-containing protein 2*), jehož proteinový produkt se váže k BMAL1 a tvoří heterodimer NPAS2:BMAL1 (Reick *et al.*, 2001; DeBruyne *et al.*, 2007). Transkripce genu *Npas2* je pod kontrolou proteinů REV-ERBa a RORa, které se podobně jako u *Bmal1* váží k RORE sekvencím v promotoru genu. Avšak afinita obou proteinů k NPAS2 je nižší a navíc REV-ERBa nemůže plně inhibovat transkripci *Npas2*, proto pouze blokuje aktivační účinek RORa (Crumbley *et al.*, 2010). Tento kompenzační mechanismus udržující endogenní oscilace cirkadiálních hodin

je předností hlavního cirkadiálního pacemakeru (DeBruyne *et al.*, 2007; Crumbley *et al.*, 2010).

Fázové posuny mezi jednotlivými transkripčními smyčkami utváří 24hodinovou periodu cirkadiálních rytmů. Hladiny mRNA pro *Per1,2* a *Cry1,2* jsou v antifázi oproti hladině mRNA pro *Bmall* a vykazují vysokou amplitudu během dne, zatímco transkripce genu *Bmall* narůstá během tmavé fáze dne a ráno vlivem zvyšujícího se inhibičního působení proteinu REV-ERB α klesá (Zylka *et al.*, 1998; Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Guillaumond *et al.*, 2005).

Hodinový mechanismus řídí, mimo exprese hodinových genů, také expresi tzv. hodinami kontrolovaných genů, například genu pro AVP. Heterodimer CLOCK:BMAL1 se také v tomto případě váže k E-box sekvenci promotoru genu pro AVP, čímž rytmicky spouští jeho transkripci. Podobně jako u regulace transkripce hodinových genů *Per1,2* a *Cry1,2*, útlum transkripce genu pro AVP zprostředkovávají proteiny PER1,2. Proto hladiny mRNA pro AVP v SCN oscilují s 24hodinovou periodou, s maximem během dne a minimem v noci (Jin *et al.*, 1999). Hlavní cirkadiální pacemaker může těmito regulacemi ovlivňovat načasování různých tkáňově specifických funkcí v organismu.

2.2.2 Úloha *Dexas1* v cirkadiálním systému

Dexas1 je rytmicky exprimován v myším SCN i v SCN potkana (Panda *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Hahnová *et al.*, 2016), s vyšší hladinou během časně subjektivní noci (CT14; z *angl. circadian time*) a jeho exprese tedy vykazuje podobný cirkadiální rytmus jako genová exprese *Bmall*. Genetický knock-out obou genů *Cry* vede ke ztrátě rytmu v expresi *Dexas1* a dokazuje, že *Dexas1* je tzv. hodinami kontrolovaný gen (Takahashi *et al.*, 2003). Na rozdíl od SCN, exprese *Dexas1* naměřená v hipokampu, v kůře, ale také v játrech či v srdci nevykazuje cirkadiální rytmus (Takahashi *et al.*, 2003; Hahnová *et al.*, 2016).

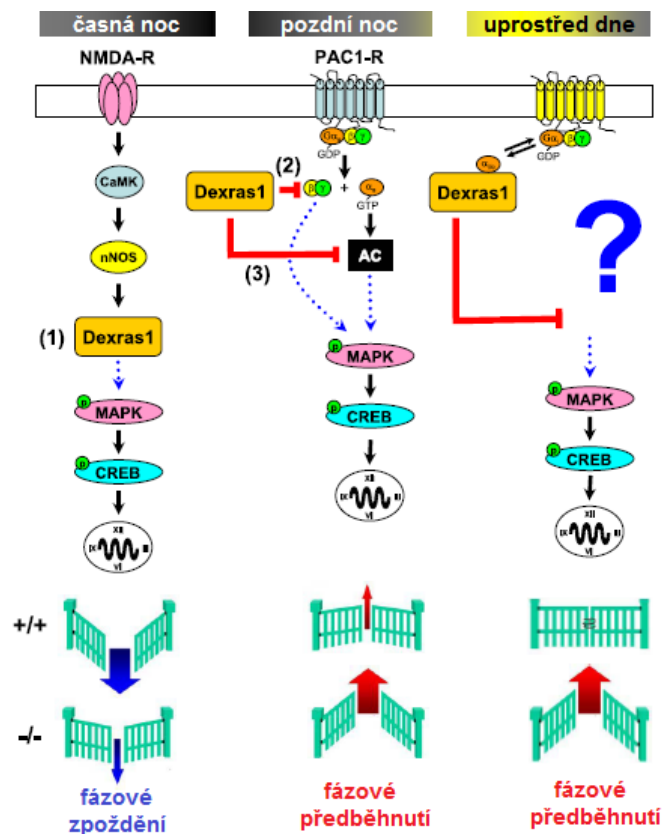
Studie Cheng a kolegů (2004) ukázala, že *Dexas1* ovlivňuje délku periody cirkadiálního rytmu. *Dexas1* potlačuje citlivost cirkadiálního pacemakeru k nesvětelným stimulům a zároveň posiluje jeho citlivost ke světelným stimulům (Cheng *et al.*, 2004). Společným výsledkem i dalších studií bylo zjištění, že u zvířat s genetickou delecí *Dexas1* se zvyšuje odpověď cirkadiálního systému na nesvětelné stimuly (Cheng *et al.*, 2004; Koletar *et al.*, 2011; Bouchard-Cannon & Cheng, 2012). Pozdější studie téhož autora a

spolupracovníků (2006) dále odhalila roli *Dexas1* ve vrátkování citlivosti cirkadiálního pacemakeru na světelné podněty z prostředí (Cheng *et al.*, 2006).

Světlo je zásadním synchronizačním stimulem (*německy Zeitgeber*) savčích cirkadiálních hodin, sloužícím k seřízení vnitřní fáze cirkadiálního pacemakeru s časem v okolním prostředí (Pittendrigh & Daan, 1974; Ding *et al.*, 1994, 1997; Chen *et al.*, 1999; Kawaguchi *et al.*, 2003). Informace o světle je vedena z fotosenzitivních gangliových buněk sítnice přes RHT přednostně do vlSCN (Moore *et al.*, 1995; Gooley *et al.*, 2001; Gamlin *et al.*, 2007), kde na synapsích dochází k uvolňování neurotransmiterů glutamátu (Castel *et al.*, 1993; de Vries *et al.*, 1993) a PACAP (*z angl. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (Hannibal *et al.*, 1997, 2000). Glutamát po vazbě na NMDA receptory iniciuje vtok vápenatých iontů do buněk, které ve vazbě na kalmodulin spouští signální dráhy vedoucí k aktivaci MAP-kinázové dráhy (Ding *et al.*, 1994; Obrietan *et al.*, 1998). MAPK fosforyluje transkripční faktor CREB (Ginty *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1997), který vazbou na CRE oblasti (*z angl. cAMP response element*) v promotoru hodinových genů *Per1,2* specificky spouští jejich transkripci (Trávníčková-Bendová *et al.*, 2002). Tímto mechanismem světlo resetuje fázi cirkadiálního pacemakeru. PACAP se v SCN váže na své receptory PAC1, nebo VPAC2 receptory (Cagampang, Piggins, *et al.*, 1998; Cagampang, Sheward, *et al.*, 1998), ke kterým se může vázat také VIP (Shivers *et al.*, 1991). Vazba PACAP k PAC1 receptorům v SCN vede k aktivaci cAMP signální dráhy, zakončené indukci transkripce genu *Per1* (Hannibal *et al.*, 1997, 2001; Kawaguchi *et al.*, 2003). PACAP se takto účastní mechanismu fázového předběhnutí cirkadiálních hodin indukovaného světelnou stimulací v pozdní noci (Kawaguchi *et al.*, 2003). Synchronizace cirkadiálního pacemakeru probíhá pomocí indukovaných fázových posunů vnitřního rytmu. Je-li organismus chován ve stálé tmě, jeho vnitřní rytmus stále běží a rozděluje se na dvě hlavní fáze, tzv. subjektivní den a subjektivní noc. Dopadne-li světelný stimul do časně subjektivní noci, indukuje fázové zpoždění vnitřních oscilací, dopadne-li do doby pozdní subjektivní noci, vyvolá fázové předběhnutí. Světlo, které dopadá do doby subjektivního dne, nevyvolá žádnou fázovou změnu vnitřních cirkadiálních oscilací (Czeisler *et al.*, 1989; Illnerová *et al.*, 1989).

Cheng a kolegové (2006) ukázali, že myši s genetickým odstraněním *Dexas1* mají přenastavenou citlivost cirkadiálního pacemakeru ke světlu. Aplikace světelného pulzu uprostřed subjektivního dne překvapivě vyvolá u těchto myší fázové předběhnutí cirkadiálního pacemakeru. Světelný pulz aplikovaný v časně subjektivní noci způsobí u myší s odstraněným *Dexas1* menší fázové zpoždění oproti wild-type myším, zatímco

světlo v pozdní části subjektivní noci vede k většímu fázovému předběhnutí, než bylo pozorováno u wild-type myši. Mechanismus, kterým Dexras1 mění citlivost cirkadiálního pacemakeru na světelnou stimulaci během dne, zřejmě zahrnuje specifickou aktivaci, nebo inhibici ERK/MAP-kinázové dráhy v závislosti na denní době. V časně noci Dexras1 aktivovaný dráhou NMDA-nNOS-NO spouští MAP-kinázovou kaskádu, zatímco v pozdní noci Dexras1 potlačuje aktivaci MAP-kinázové dráhy přes inhibici signalizace PAC1 receptorů spřažených s $G_{\beta\gamma}$ komplexu a jedním z inhibic AC aktivované $G_{\alpha s}$ podjednotkou (obr. 3) (Cheng *et al.*, 2006).



Obr. 3: Předpokládaný model mechanismu Dexras1 zajišťujícího vrátkování světelné citlivosti cirkadiálního pacemakeru. (1) Dexras1 v časně noci aktivuje MAP-kinázovou dráhu vedoucí k resetování fáze cirkadiálního pacemakeru. V pozdní noci Dexras1 inhibuje signalizaci PAC1 receptoru na úrovni $G_{\beta\gamma}$ komplexu (2) i AC, aktivované $G_{\alpha s}$ -GTP (3). +/+ značí wild-type myši, -/- značí myši s geneticky odstraněným Dexras1 (Převzato a upraveno z Cheng *et al.*, 2006).

Doi a spolupracovníci (2011) nedávno navrhli nový model komunikace mezi pacemakery v SCN, kdy mezibuněčnou synchronizaci a rytmus SCN neuronů řídí cirkadiální regulace G-proteinové signalizace v neuronech. Autoři studie pozorovali

cirkadiánní rytmus v expresi regulátoru G-proteinové signalizace 16 (*Rgs16*) v SCN, s maximem kolem CT4 (v pozdní noci) (Doi *et al.*, 2011). Jelikož bylo zjištěno dříve, že RGS16 působí jako inhibitor signalizace řízené $G_{\alpha i}$ podjednotkou (Beadling *et al.*, 1999), autoři spekulují o možné cirkadiánní regulaci signalizace řízené $G_{\alpha i}$ podjednotkou v SCN neuronech založené na časově specifických a protichůdných účincích Dexras1 a RGS16. RGS16 aktivací cAMP dráhy v pozdní části noci urychluje indukci exprese *Per1* v dmSCN a působí tak fázové předběhnutí (Doi *et al.*, 2011).

Nedávno byla zjištěna také interakce Dexras1 s NonO v buněčném jádře (Ong *et al.*, 2011). NonO je multifunkční protein, který může asociovat s proteiny PER1, na které má antagonistické účinky, čímž ovlivňuje cirkadiánní rytmy (Brown *et al.*, 2005). NonO je také transkripčním koaktivátorem CREB (Amelio *et al.*, 2007). Jeho interakce s Dexras1 vyžaduje hydrolýzu GTP a vede ke změně jeho funkce z transkripčního koaktivátoru na korepresor transkripce některých cílových genů, spouštěné dráhou cAMP-PKA-CREB. Dexras1 přitom sám o sobě nemá inhibiční účinek na transkripci těchto genů (Ong *et al.*, 2011).

2.3 Senzorická deprivace

Z předchozích kapitol vyplývá, že Dexras1 je modulační molekula, která ovlivňuje buněčnou signalizaci na různých úrovních, pravděpodobně v kooperaci s aktivitou NMDA receptorů. Může tak mít vliv na homeostatické procesy v neuronech, nebo se účastnit neuroplastických změn vyplývajících ze zvýšené, či snížené aktivity neuronálních okruhů. Pro studování míry zastoupení genetického základu a bazální aktivity neuronů ve formování struktur se často využívá model senzorické deprivace, jejímž následkem dochází k utlumení bazální aktivity příslušných senzorických okruhů, ze kterého vyplývají různé funkční změny v mozku.

Mnoho senzorických systémů mozku dozrává až po narození, a jsou proto v časném postnatálním vývoji nejcitlivější ke stimulům modulujícím jejich aktivitu, což vede k mnoha strukturním i funkčním změnám (Friedman & Price, 1986; Fagiolini *et al.*, 1994; Evers *et al.*, 1996; Lendvai *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Majewska & Sur, 2003). Toto krátké časové okno, během kterého může neuronální aktivita ovlivnit vývoj senzorických systémů, se nazývá kritická perioda (Greenough *et al.*, 1987). Nástup i délka trvání kritické periody se mezi senzorickými systémy liší a liší se i mezi živočišnými druhy (Olson &

Freeman, 1980; Friedman & Price, 1986; Fagiolini *et al.*, 1994; Lendvai *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002).

U sensoricky deprivovaných zvířat se zpomaluje vývoj příslušných struktur a vyvíjí se kompenzační mechanismy posilující zbývající sensorické systémy. Deprivovaná mozková kůra může být například částečně přeorganizována procesem cross-modální plasticity, který umožní její zapojení do zpracování sensorických vstupů nedeprivovaných sensorických systémů (Nishimura *et al.*, 1999). Tento mechanismus byl pozorován také u lidí, například u slepců při čtení Braillova písma dochází k aktivaci primární zrakové kůry (Sadato *et al.*, 1996).

Zraková deprivace může být navozená buď monokulární deprivací, anebo neinvazivně chovem zvířat již od narození ve stálé tmě (*angl. dark rearing*). Bylo prokázáno, že chov mláďat potkanů od narození ve stálé tmě vede k menší hustotě neuronů a astrocytů ve zrakové kůře, z důvodu degradace neaktivních buněk během vývoje programovanou buněčnou smrtí (Argandoña & Lafuente, 2000; Argandoña *et al.*, 2003). Chov potkanů ve stálé tmě opoždí vývoj primární zrakové kůry, a to v takovém rozsahu, že primární zraková kůra deprivovaných potkanů v 60. postnatálním dni (P60) odpovídá spíše stavu primární zrakové kůry normálních potkanů ve věku P19 až P21 (Fagiolini *et al.*, 1994).

Ze studií zrakové deprivace chovem zvířat ve stálé tmě vyplývá, že zakončení kritické periody největší plasticity zrakového systému je regulováno epigenetickými změnami transkripce genů řízené CREB (Medini & Pizzorusso, 2008). Toto zjištění podporují nálezy vyšší hladiny G-proteinů účastnících se cAMP dráhy i vyšší hladiny cAMP a některých podjednotek PKA během kritické periody (Reid *et al.*, 1996; Dahlhaus *et al.*, 2011). V protikladu k sensorické deprivaci je v experimentu využíván model tzv. obohaceného prostředí (*angl. environmental enrichment*). Bylo prokázáno, že chov potkanů v takovém komplexním prostředí ve stálé tmě reaktivuje zrakovou kůru. Klíčovým regulátorem pozitivních účinků obohaceného prostředí na vývoj zrakové kůry byl určen IGF (*z angl. insuline-like growth factor*) (Ciucci *et al.*, 2007). Dexas1 byl nedávno rozpoznán jako nezbytný mediátor mezi glukokortikoidní a IGF-1 signalizací v adipocytech vedoucí k adipogenezi. Tyto výsledky jsou příkladem změn v signalizačních kaskádách spojených se sensorickou deprivací, jichž se Dexas1 také účastní a je tedy možné, že modulací neuronální aktivity v časně ontogenezi se může měnit i hladina exprese *Dexas1* v sensorických strukturách (Kim *et al.*, 2016).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce si kladla za cíl podat detailní charakteristiku exprese *Dexras1* mRNA v mozku potkana v průběhu přirozené ontogeneze a za vývoje ve stálé tmě, tedy při zrakové sensorické deprivaci. Většina mozkových struktur, ve kterých byla zjištěna vysoká exprese *Dexras1* v našich předběžných studiích, je funkčně spjata se zpracováním a vedením sensorických informací. Proto byla navržena hypotéza, že by ontogenetický vývoj exprese *Dexras1* mRNA mohl záviset na aktivitě vyvíjející se struktury a její potlačení, například sensorickou deprivací, by mohlo ovlivnit míru exprese *Dexras1* v této struktuře. Jelikož každá buňka má svůj vlastní cirkadiánní oscilátor a exprimuje kanonické hodinové geny, zkoumali jsme v těchto strukturách také změnu exprese hodinových genů *Per1* a *Rev-erba*. Dále jsme se zaměřili i na kvantifikaci exprese *Bdnf* mRNA (z angl. *brain-derived neurotrophic factor*), jako markeru nervové plasticity.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Experimentální zvířata

K experimentům byli použiti laboratorní potkani kmene Wistar (Velaz s.r.o.). Potkani byli krmeni standardním granulovaným krmivem a měli neomezený (*ad libitum*) přístup k pitné vodě a potravě. Potkani byli chováni při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$, v regulovaných světelných podmínkách udržovaných automatickými spínacími hodinami. Intenzita osvětlení dosahovala od 150 do 250 lux, v závislosti na umístění chovných boxů ve zvěřinci.

4.2 Experimentální paradigma

Světelný režim ve zvěřinci byl nastaven na 12 hodin světla a 12 hodin tmy (LD 12:12, z *angl. light-dark*). Světlo se rozsvěcelo v 6 hodin ráno a zhasínalo v 18 hodin, pokud není v experimentech uvedeno jinak. Poslední den experimentu byla zvířata usmrcena rychlou dekapitací pod anestézií mezi 9:00 a 10:30 h.

4.2.1 Ontogenetický experiment

Na experiment bylo použito 8 dospělých samic potkana kmene Wistar. Samice byly v den pro-estru připuštěny k samcům na jednu noc a druhý den jim byla provedena poševní cytologie. Na základě cytologických preparátů byly vybrány úspěšně oplodněné samice. Den zabřeznutí byl stanoven jako den 0 embryonálního vývoje (E0). V E20 byla uspana jedna z březích samic éterovou anestézií a usmrcena rychlou dekapitací. Embrya byla ihned zamrazena na jemně rozdrčeném suchém ledu, aby nedošlo k jejich deformaci, a byla uchována zmražená při -80°C . Mozky pěti embryí byly postupně nakrájeny na kryostatu od rostrálních struktur po mozeček na koronární řezy o tloušťce $12\ \mu\text{m}$, které byly přichyceny na skla s úpravou *SuperFrost*, a uchovávány při -80°C až do zpracování metodou *in situ* hybridizace. Pro orientaci při krájení sloužily webové stránky <http://brainmaps.org> a atlasy mozku potkana (Paxinos, 2004; Paxinos & Watson, 2009).

Zbýlých pět samic bylo ponecháno v klidu do porodu. Mláďata jim byla odebírána v P1, P5, P10, P16 a P20 a byla zabita rychlou dekapitací. Odebrané mozky byly zpracovány obdobným způsobem, jako je popsáno výše. Z každé věkové skupiny bylo v rostro-kaudální ose postupně nakrájeno na kryostatu pět mozků mláďat na přibližně 25 různých řezů. K orientaci sloužil atlas (Paxinos & Watson, 2009). Jednotlivé koronární řezy

o tloušťce 12 μm byly přichyceny na skla s úpravou *SuperFrost*, a uchovávány při -80°C až do zpracování metodou *in situ* hybridizace.

4.2.2 Experiment světelné deprivace mlád'at

Dvě dospělé samice potkanů kmene Wistar byly ihned po zabřeznutí v E1 přesunuty do stálé tmy (DD; z *angl. dark-dark*). Do místnosti byla dočasně nainstalována lampička s tlumeným infračerveným světlem, která sloužila pouze pro kontrolu dostatku potravy a pití a pro kontrolu narození a přibližného počtu mlád'at. V den narození mlád'at bylo infračervené světlo zhasnuto a mlád'ata byla ponechána u samic v DD až do P16. Mezitím byly v místnosti s obvyklými světelnými podmínkami LD 12:12 chovány jiné dvě březí kontrolní samice, dokud jejich mlád'ata nedorostla téhož věku jako deprivovaná mlád'ata. V P16 byla mlád'ata zabita rychlou dekapitací, přičemž zvířata chovaná v DD byla usmrcena v DD pouze při slabém červeném světle. Odebrané mozky byly ihned zamrazeny na jemně rozdrceném suchém ledu a následně uchovány zmražené při -80°C . Na kryostatu bylo nakrájeno šest mozků kontrolních zvířat a šest mozků deprivovaných zvířat, přičemž byly vybrány stejné struktury jako v ontogenetickém experimentu. Postup při krájení na kryostatu byl totožný jako u ontogenetického experimentu a pro orientaci posloužil atlas (Paxinos & Watson, 2009). Řezy byly uchovávány při -80°C až do zpracování metodou *in situ* hybridizace.

4.3 Stanovení exprese *Dexras1* mRNA metodou *in situ* hybridizace

Pro detekci *Dexras1* mRNA, ale také *Rev-erba* mRNA, *Per1* mRNA a *Bdnf* mRNA v mozkových řezech jsme zvolili metodu *in situ* hybridizace s příslušnými cDNA sondami označenými radioaktivní sírou ^{35}S inkorporovanou do uridin trifosfátu (UTP). Pro detekci *Dexras1* byla použita cDNA sonda dlouhá 916 bp, odpovídající nukleotidům 91-1006 sekvence v GenBank uložené pod číslem: XH_340809. Pro detekci *Rev-erba* byla použita cDNA sonda dlouhá 325 bp, odpovídající nukleotidům 33-357 sekvence v GenBank registrované pod číslem: NM_001113422. Pro detekci *Period1* byla použita cDNA sonda dlouhá 980 bp, odpovídající nukleotidům 581–1561 sekvence v GenBank uložené pod číslem: AB002108, a pro detekci *Bdnf* byla použita cDNA sonda dlouhá 945 bp, odpovídající nukleotidům 1005-1950 sekvence v GenBank registrované pod číslem XM_006234684.3.

4.3.1.1 *Potřebné vybavení a chemikálie*

Potřebné vybavení:

kryostat *Leica*, centrifugy, pH metr *Denver Instruments BASIC 32*, termobloky *Biometra TBI*, vodní lázně *Memmert*, třepačka, beta counter *Beckman LS 6500*, spektrofotometr *Eppendorf*, vyvolávačka *Optimax x-raj procesor*, stereolupa *Olympus SZX12*

Potřebné chemikálie:

- restrikční enzymy *SacII*, *SallI*, *NCoI* s odpovídajícími pufrými (*Thermo Scientific*) na linearizaci plazmidu
- kit *MAXIscript SP6/T7 In Vitro Transcription Kit (Invitrogen)* obsahující roztoky nukleotidů adenosin trifosfátu (ATP), cytidin trifosfátu (CTP), guanosin trifosfátu (GTP) a uridin trifosfátu (UTP), polymerázy SP6/ T7, *nuclease-free H₂O* a 10X transkripční pufr
- izotop α -³⁵S uridin-5'-thiotrifosfát (³⁵S UTP), 18,5 MBq (*Hartmann Analytic*)
- scintilační roztok *Rotiszint eco plus (Carl Roth)*

- Roztoky na linearizaci plazmidu:
3M octan sodný (*Sigma*), 96% etanol, 70% etanol (*Fisher Scientific*)

- Zásobní roztoky:
DEPC-H₂O: promíchat 1 ml dietylpyrokarbonátu (DEPC) (*Sigma*) v 1 l destilované vody, autoklávovat
20x SSC: smíchat 175,3 g NaCl a 88,2 g kyseliny citronové, upravit na pH 7,0
1M Tris-HCl: smíchat 60,55 g *Trizma base (Sigma)* a 400 ml destilované vody a 21 ml HCl, upravit na pH 8,0 a doplnit destilovanou vodou do objemu 500 ml
0,5M EDTA: 9,305 g etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) promíchat ve 40 ml destilované vody, upravit na pH 8,0 a doplnit destilovanou vodou do objemu 50 ml
5% NaPP_i: rozpustit 5 g pyrofosforečnanu sodného (NaPP_i) ve 100 ml DEPC-H₂O

- Roztoky na TCA precipitaci:
10% TCA: naředit trichloroctovou kyselinu (TCA) v DEPC-H₂O

- Roztoky na prehybridizaci:
 - DEPC-PBS: smíchat 8,77 g NaCl a 0,36 g Na₂HPO₄ a promíchat v 1 l DEPC-H₂O, upravit na pH 7,4
 - 4% DEPC-PFA: 20 g paraformaldehydu (PFA) promíchat v 500 ml DEPC-H₂O a zahřát na teplotu 60-65°C, po rozpuštění nechat zchladnout a upravit pH na 7,4
 - 0,2M DEPC-HCl: smíchat 16,67 ml 12M HCl a 1 l DEPC-H₂O
 - 0,1M DEPC-TEA: rozpustit 18,57 g trietanolaminu (TEA) v 1 l DEPC-H₂O, upravit na pH 8,0 přidáním koncentrovaného NaOH
 - 0,25% acetanhydrid v TEA: 1,25 ml acetanhydridu smíchat s 500 ml DEPC-TEA
 - 70% etanol: 350 ml 96% etanolu smíchat se 130 ml DEPC-H₂O
 - 96% etanol (*Penta*)
- Roztoky na odmývání:
 - 2x SSC: smíchat 200 ml 20x SSC a 20 ml 5% NaPP_i a 4 ml 0,5M EDTA a 1779 ml destilované vody
 - 0,1x SSC: smíchat 10 ml 20x SSC a 20 ml 5% NaPP_i a 4 ml 0,5M EDTA a 1966 ml destilované vody
 - RNáza A (*Sigma*) naředit v 10mM Tris-HCl (pH 7,4) na výslednou koncentraci 420 units/ 400 ml RNázového pufru
 - RNázový pufr: promíchat 29,2 g NaCl a 10 ml Tris-HCl (pH 8,0) v 990 ml destilované vody
 - 70% etanol, 96% etanol
- Roztoky na hybridizaci:
 - 0,5M dithiothreitol (DTT)(*Sigma*): 0,1542 g DTT rozmíchat ve 2 ml DEPC-H₂O a přefiltrovat přes 0,22μm filtr
 - hybridizační pufr:
 - deionizovaný formamid: smíchat 2,5 g *mixed bed resine* (*Bio-Rad*) a 50 ml formamidu, nechat míchat ve tmě 30 minut na rotujícím kole, přefiltrovat přes 0,22μm filtr, skladovat v -20°C zabalený v alobalu
 - DEPC-H₂O
 - dextran sulfát (*Sigma*)
 - 20x SSPE: rozmíchat 12,62 g NaCl a 1,66 g NaH₂PO₄ a 2,4 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) ve 40 ml DEPC-H₂O, doplnit DEPC-H₂O do objemu 60 ml

- 100x Denhardt's: smíchat 200 mg hovězího sérového albuminu (*Sigma*) a 200 mg *Ficoll-400* (*Sigma*) a 200 mg *PVP-360* (*Sigma*) a 10 ml DEPC-H₂O, opatrně míchat, poté rozpipetovat na 1ml alikvoty, skladovat v -20°C
 - kvasinková tRNA (25mg/ml): smíchat 25 mg kvasinkové tRNA (*Sigma*) v 1 ml DEPC-H₂O a stočit na centrifuze, skladovat v -20°C
 - DNA lososích spermíí (10mg/ml)(*Sigma*), skladovat v -20°C
 - 10% SDS: smíchat 10 g SDS a 100 ml DEPC-H₂O, zahřát na 50°C a rozpustit, poté rozpipetovat na 0,5ml alikvoty, skladovat v -20°C
 - 5% NaPP_i
- V 50ml sterilní zkumavce smíchat 25 ml deionizovaného formamidu, 5 ml DEPC-H₂O a 5 g dextran sulfátu, zabalit alobalem a míchat při 4°C přes noc na rotujícím kole. Druhý den přidat do zkumavky 12,5 ml 20x SSPE, 1 ml 100x Denhardt's, 1 ml kvasinkové tRNA (25mg/ml), 2,5 ml DNA lososích spermíí (10 mg/ml), 0,5 ml 10% SDS, 1 ml 5% NaPP_i a doplnit DEPC-H₂O do objemu 50 ml. Promíchat a poté rozpipetovat filtrovanými špičkami na 1ml alikvoty do sterilních mikrozkuavek. Skladovat v -20°C.

4.3.1.2 Postup detekce mRNA v mozku metodou *in situ* hybridizace

1) Linearizace plazmidu

- a. Ze 40 µl DNA, 5 µl pufru a 5 µl enzymu (*SacII*, *Sall*, *NCoi*) stvořit master mix. Promíchat pipetou a inkubovat minimálně 3 hodiny v termobloku při 37°C.
- b. Upravit pH přidáním 5 µl studeného 3M octanu sodného a následně přidat 165 µl ledového 96% etanolu a nechat přes noc v -20°C.
- c. Stočit v centrifuze na 10 000 otáček, 20 minut, při 4°C. Poté odsát.
- d. Přidat 150 µl ledového 70% etanolu a stočit na 10 000 otáček, 20 minut, při 4°C. Poté odsát. Tento krok poté dvakrát zopakovat.
- e. Nechat vyschnout a poté rozpustit v 12 µl H₂O.

2) Značení próby:

- a. Do sterilní mikrozkuavky napipetovat 1 µg linearizovaného plazmidu, 2 µl 10x transkripčního pufru, 1 µl 10mM ATP, 1 µl 10mM CTP, 1 µl 10mM GTP, 1 µl 200µM UTP, 5 µl³⁵S UTP, 2 µl polymerázy (T7 polymeráza pro *Dexas1* a pro *Per1*; SP6 polymeráza pro *Rev-erba* a *Bdnf*). Doplnit sterilní *nuclease-free* H₂O do 20 µl. Promíchat pipetováním a inkubovat v termobloku při 37°C 1 hodinu.

- b. Přidat 1 μ l Dnázy I. Promíchat pipetou a krátce zvertexovat. Inkubovat při teplotě 37°C 20 minut.
- c. Mezitím si připravit kolonky stočením na centrifuze na 800 x g, 5 minut, při 23°C. Stočené kolonky nasadit na čisté mikrozkušavky a přidat 1 μ l 0,5M EDTA, pH 8. Přidat 20 μ l připravené próby (a-c) a 20 μ l *RNase-free* H₂O. Stočit na centrifuze na 1000 x g, 5 minut, při 23°C.
- d. Stanovit inkorporaci izotopu do próby TCA precipitací:
 - i. Odebrat 1 μ l próby do čisté mikrozkušavky a naředit 19 μ l H₂O. Zbytek próby uschovat v mrazáku při -20°C až do hybridizace.
 - ii. Z každého odebraného vzorku napipetovat po 2 μ l na kousky filtračního papíru. Pro rozlišení vytvořit pro každou пробу jiný tvar papírků. Nechat uschnout. Část filtračních papírků od každé próby navíc promýt ve zkumavce natřikrát v 10% TCA (4°C), 5 minut. Opatrně slít a na konec přidat 96% etanol (4°C) na 5 minut. Opatrně slít a nechat papírky uschnout.
 - iii. Do připravených scintilačních lahvíček dát 5 ml scintilačního roztoku. Jelikož první lahvička představuje blank, přidat pouze čistý kousek filtračního papíru, poté seřadit lahvičky nejprve s filtračními papírky pouze s naředěnou próbou a poté filtrační papírky s téže próbou precipitovanou v TCA. Scintilační lahvičky vložit do beta counteru a z výsledků kvantifikovat cpm ve vzorcích. Z poměru cpm v 1 μ l próby a cpm v 1 μ l pročištěné próby TCA spočítat procenta inkorporace ³⁵S UTP do próby.

3) Prehybridizace

- a. Skla ve sterilních stojácích nejprve fixovat ve 4% DEPC-PFA 40 minut.
- b. Promýt v DEPC-PBS 2x 5 minut. A následně deproteinovat v 0,2M HCl 20 minut.
- c. Opět promýt v DEPC-PBS 5 minut. Inkubovat v 0,1M trietanolaminu 2 minuty za současného třepání. Poté rovnou nechat acetylovat v 0,25% acetanhydridu (TEA) 10 minut za současného třepání.
- d. Promýt v DEPC-PBS 5 minut. Dehydratovat postupně v 70% etanolu 5 minut a pak v 96% etanolu 5 minut. Skla vyskládat ze stojánek na čistý filtrační papír a nechat uschnout.

4) Hybridizace

- a. K 1 ml hybridizačního pufru přidat 100 μ l 0,5M DTT a promíchat sterilní špičkou.
- b. Přidat $1-5 \times 10^7$ cpm značené próby/1 ml hybridizačního pufru.
- c. Denaturovat při 85°C 5 minut a poté přesunout do jiného termobloku s hybridizační teplotou 60°C, dokud nebude nanесena všechna próba na příslušná skla. Mezitím předehřátou próbu nanést na krycí sklo a přiložit příslušné podložní sklo s řezy.
- d. Takto připravená skla inkubovat v hybridizačních krabicích obalených alobalem při hybridizační teplotě 18-20 hodin.

5) Promývání a autoradiografie

- a. V 2x SSC odmyt krycí sklo a poté podložní skla naskládat do stojánků.
- b. Promýt v 2x SSC 30 minut při pokojové teplotě.
- c. Ve vodní lázni o teplotě 42°C inkubovat s RNázou A (10 μ g/ml RNázového pufru) 60 minut.
- d. Promýt v 2x SSC 30 minut při pokojové teplotě.
- e. Promýt v 0,1x SSC, ve vodní lázni s hybridizační teplotou (60°C) 2x 30 minut.
- f. Dvakrát promýt v 0,1xSSC 20 minut při pokojové teplotě.
- g. Postupně dehydratovat při pokojové teplotě nejprve v 70% etanolu 5 minut, poté v 96% etanolu 5 minut. Skla vyskládat ze stojánků na čistý filtrační papír a nechat uschnout.
- h. Setřít skla do autoradiografických kazet a ve tmě k nim přiložit filmy *Kodak Bio Max Cassette*. Kazety pečlivě obalit alobalem, aby dovnitř neproniklo světlo a uschovat při -20°C po dobu 10 dní.
- i. Po deseti dnech expozice vyjmout v temnici filmy z kazet a vyvolat ve vyvolávače.

4.3.1.3 Detekce signálu z *in situ* hybridizace

Autoradiografické otisky řezů byly nafoceny a následně v programu *NIH ImageJ* byla vyhodnocena intenzita specifického signálu ve vybraných mozkových strukturách jako rozdíl hodnot relativní optické denzity otisku v oblasti zájmu (*z angl. region of interest*) a relativní optické denzity pozadí snímku. V případě bilaterálních struktur byla relativní optická denzita otisku průměrem relativní optické denzity v levé a v pravé části struktury.

4.3.1.4 *Statistická analýza*

Z naměřených dat z obou experimentů byl vytvořen aritmetický průměr ($\bar{x} = \sum x_i / n$) a vypočítána střední chyba průměru (S.E.M.; $S.E.M. = SD/n^{1/2}$)

$$SD = [(1/n - 1) * \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}$$

Výsledky ontogenetického pokusu měly být hodnoceny jednosměrnou ANOVA, avšak z důvodu nízkého „n“ v různých věkových skupinách, nemohl být test proveden. Výsledky sensorické deprivace byly hodnoceny nepárovým Studentovým t-testem. Za statisticky významné jsou považovány rozdíly kde $P < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

Naše předchozí experimenty s dospělými potkany ukázaly vysokou expresi *Dexas1* v mnoha oblastech mozku, zejména ve strukturách účastnících se zpracování a převádění sensorických informací. Nižší expresi jsme našli v talamických jádrech, v gyru dentatu či v amygdaloidních jádrech. *Tabulka 1* poskytuje seznam mozkových struktur, ve kterých byl detekován hybridizační signál u dospělých potkanů a slouží jako výchozí informace pro hledání oblastí exprimujících *Dexas1* v ontogenezi.

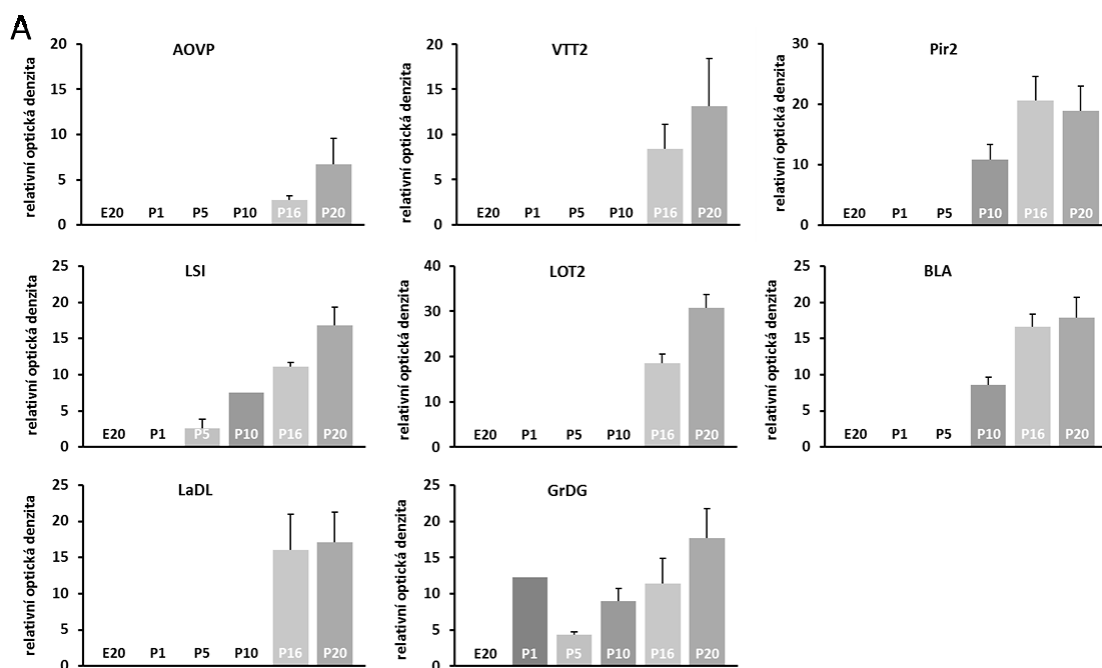
frontální asociační kůra	dorsální endopiriformní jádro
piriformní kůra	basolaterální amygdaloidní jádro
ventrální tenia tecta	mediální amygdaloidní jádro
anteriorní olfaktorické jádro	laterální amygdaloidní jádro
laterální septální jádro	ventromediální jádro hypotalamu
jádro horizontální větve diagonální skupiny	ventrální posteromediální jádro talamu
suprachiasmatická jádra	ventrální posterolaterální jádro talamu
supraoptické jádro	laterální genikulární jádro talamu
jádro laterálního olfaktorického traktu	substantia nigra pars compacta
paraventriculární jádro talamu	mediální genikulární jádro talamu
subfornikální orgán	granulární vrstva gyru dentatu
paraventriculární jádro hypotalamu	retrosplenální granulární kůra
anterodorsální jádro talamu	primární zrková kůra
anteroventrální jádro talamu	retikulotegmentální jádro mostu
ventrální anteriorní jádro talamu	superiorní vestibulární jádro
ventrolaterální jádro talamu	dorsální kochleární jádro
ventrální část klaustra	

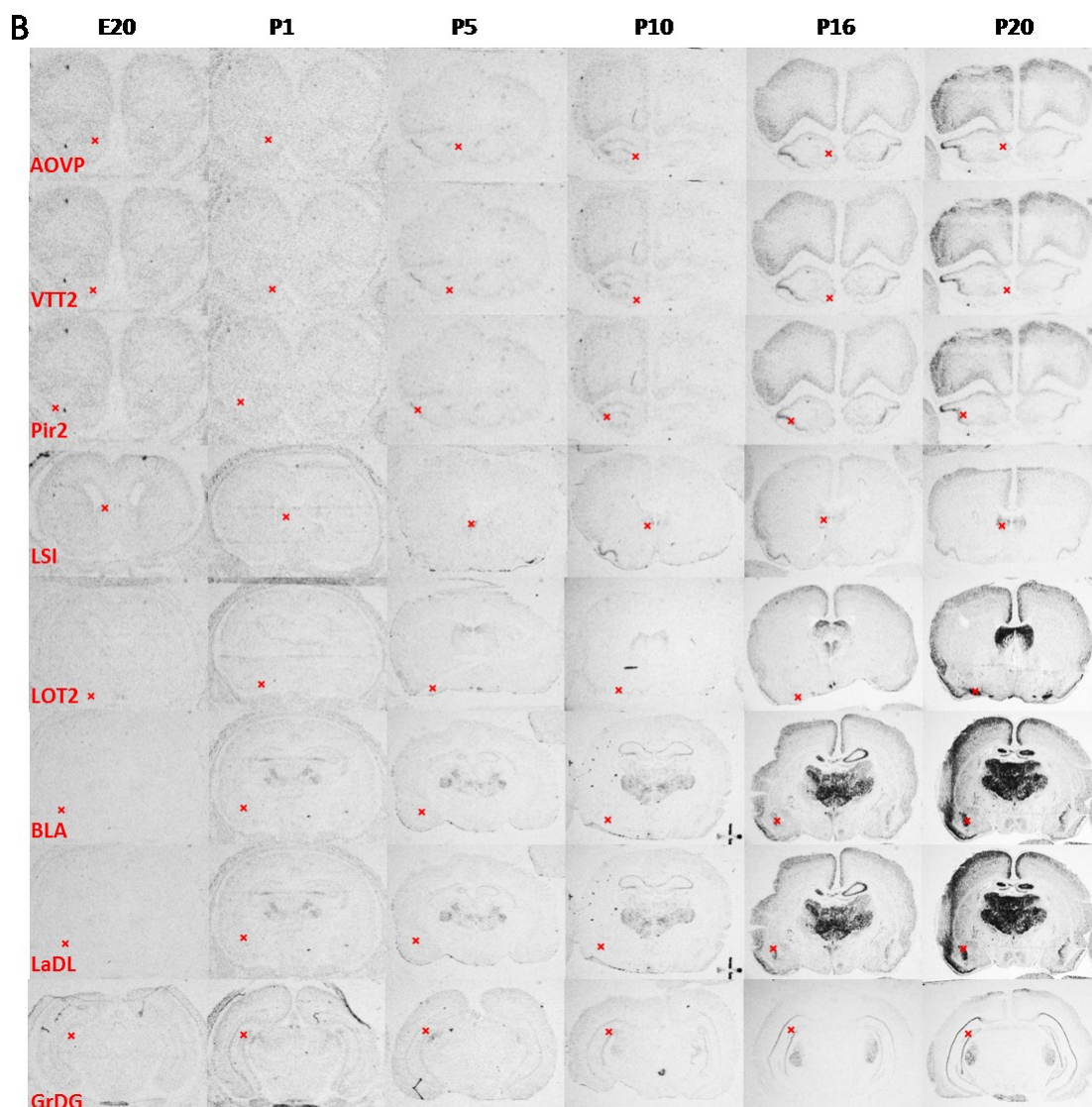
5.1 Vývoj exprese *Dexas1* mRNA v mozku potkana během ontogeneze

Metodou *in situ* hybridizace jsme zjišťovali, jak se během ontogeneze mění exprese *Dexas1* v mozku potkana. Zjišťovali jsme, ve kterých mozkových strukturách se *Dexas1* mRNA objevuje nejdříve a kde a kdy vykazuje nejvyšší naměřené hladiny. Výsledky mohou být považovány pouze za předběžné a orientační, protože u většiny struktur chybí dostatečný počet měření pro statistickou analýzu. Výsledky jsou srovnány do podkapitol podle vývojových částí mozku.

5.1.1 Vývoj v expresi *Dexras1* v telencefalických strukturách potkana

Hybridizační signál *Dexras1* mRNA jsme detekovali ve ventroposteriorní části anteriorního olfaktorického jádra (AOVP; *anterior olfactory area, ventroposterior part*) a ve druhé vrstvě čichové oblasti ventrální tenia tecta (VTT2; *ventral tenia tecta, layer 2*) až postnatálně v P16, se zvyšující se hladinou směrem k P20. Ve druhé vrstvě piriformní kůry (Pir2; *piriform cortex, layer 2*) jsme našli expresi *Dexras1* i v P10, k P16 vzrostla téměř dvojnásobně a v P20 se držela na přibližně stejné hladině. V intermediální části laterálního septálního jádra (LSI; *lateral septal nucleus, intermediate part*) jsme detekovali rostoucí expresi už od P5 k P20. Podobně narůstající expresi jsme zjistili i ve druhé vrstvě jádra laterálního olfaktorického traktu (LOT2; *nucleus of the lateral olfactory tract, layer 2*). V anteriorní části basolaterálního amygdaloidního jádra (BLA; *basolateral amygdaloid nucleus, anterior part*) jsme zjistili expresi *Dexras1* v P10 a její hladina vzrostla k P16 a udržela se přibližně stejná i v P20. Podobnou míru a vývojový profil exprese jsme objevili také v dorsolaterální části laterálního amygdaloidního jádra (LaDL; *lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral part*). V granulární vrstvě gyru dentatu (GrDG; *granular layer of the dentate gyrus*) jsme našli *Dexras1* mRNA již v P1. V P5 byla jeho hladina přibližně poloviční oproti P1, avšak od P5 k P20 opět mírně narůstala (obr. 4).





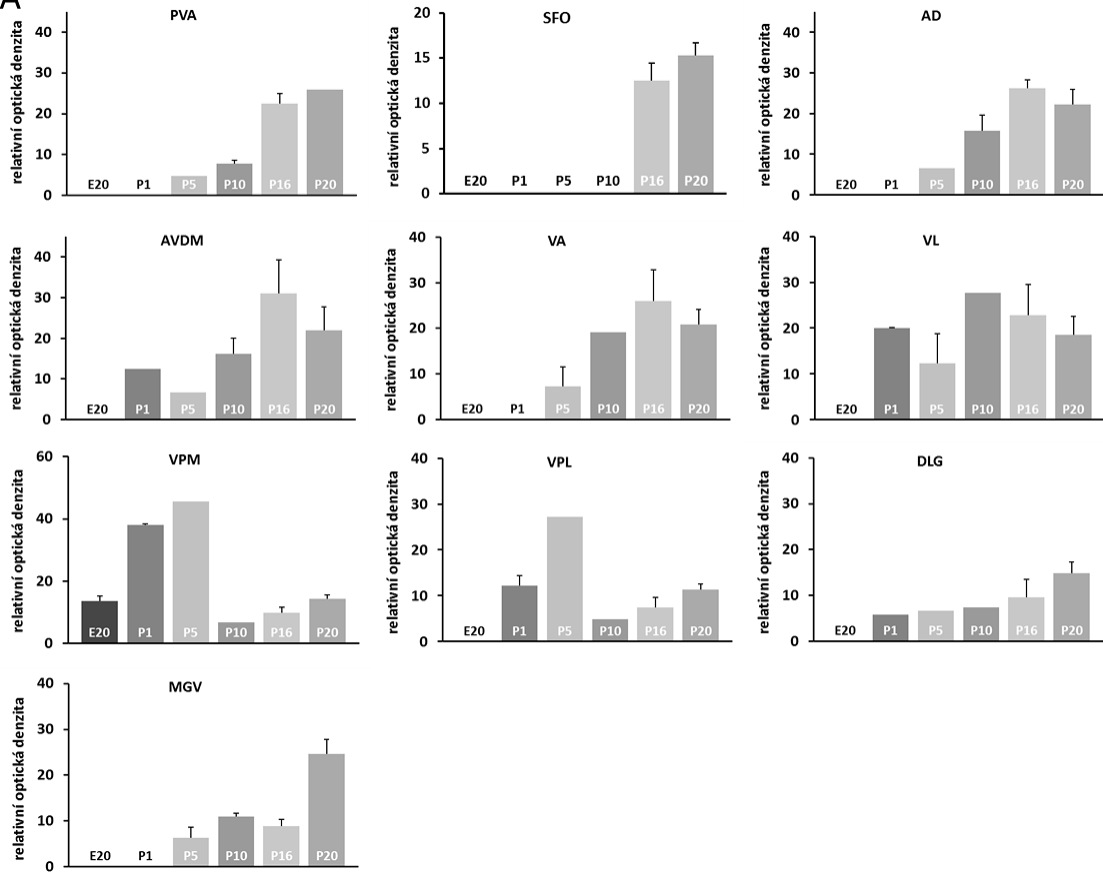
Obr. 4: Vývojové změny v expresi *Dexras1* ve strukturách telencefalonu.

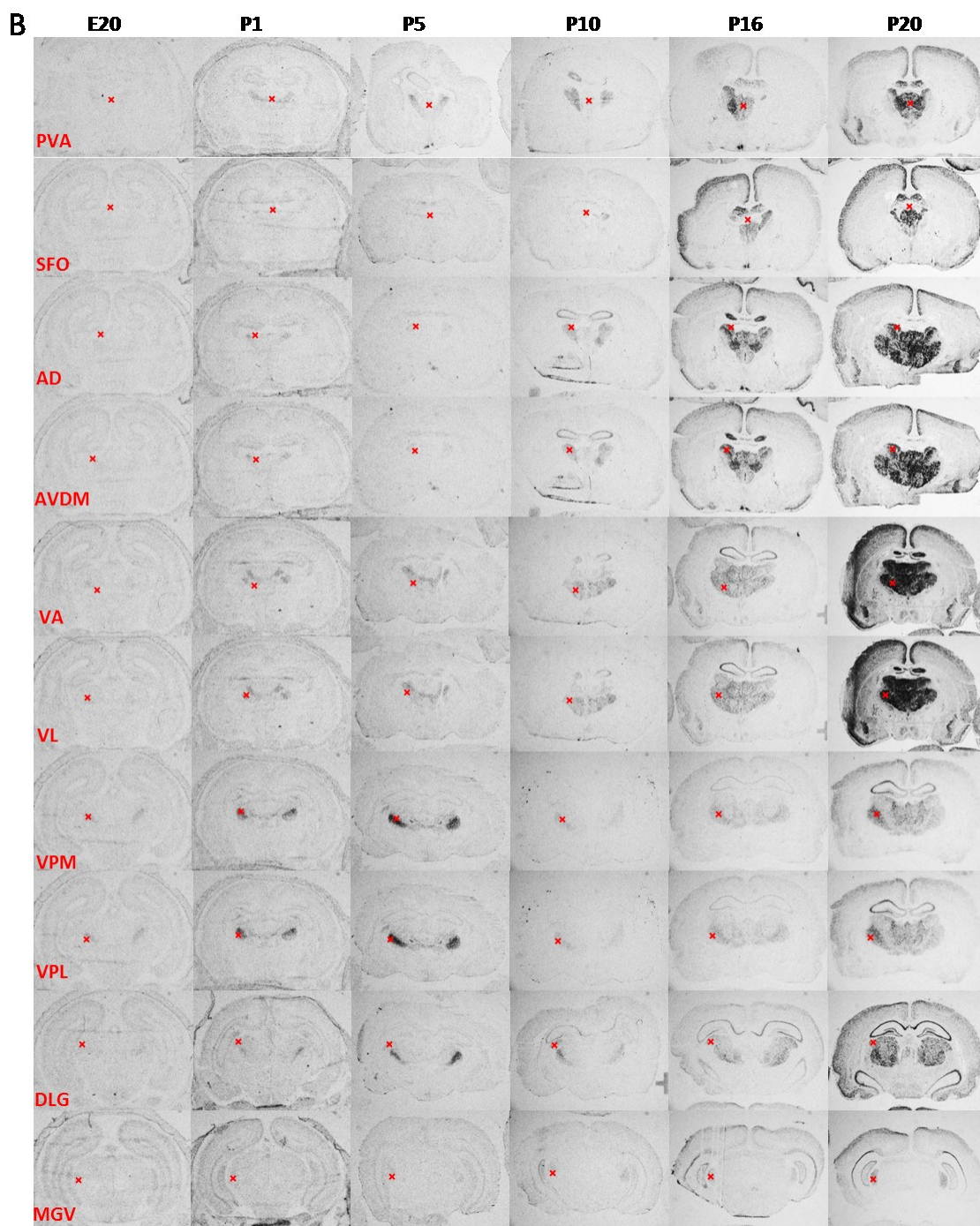
A) Souhrnný graf ukazující naměřené hodnoty relativní optické denzity (OD) *Dexras1* mRNA v AOV, VTT2, Pir2, LSI, LOT2, BLA, LaDL a GrDG u mláďat potkana ve věku E20- P20. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 1- 4 zvířat z každé věkové skupiny s vyznačenou SEM. B) Ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu měřených oblastí mozku v průběhu ontogeneze. Červené křížky vyznačují střed tzv. oblasti zájmu (ROI; z angl. "region of interest"), tj. plochu, ve které byla měřena OD.

5.1.2 Vývoj v expresi *Dexras1* v diencefalických strukturách potkana

5.1.2.1 Vývoj v expresi *Dexras1* v talamu potkana

V anteriorní části paraventriculárního jádra talamu (PVA; *paraventricular thalamic nucleus, anterior part*) jsme našli vzrůstající trend v expresi *Dexras1* od P5 k P20, s největší změnou zaznamenanou mezi P10 a P16. Dále jsme našli expresi *Dexras1* v subfornikálním orgánu (SFO; *subfornical organ*), a to pouze v P16 a P20. V obou věkových skupinách jsme detekovali přibližně stejnou hladinu *Dexras1*. V limbických talamických jádrech, anterodorsálním (AD; *anterodorsal thalamic nucleus*), v dorsomediální části anteroventrálního jádra (AVDM; *anterovent thalamic nucleus, dorsomedial part*) a motorických jádrech ventrálním anteriorním jádře (VA; *ventral anterior thalamic nucleus*) a ventrolaterálním jádře (VL; *ventrolateral thalamic nucleus*) byl však rostoucí trend v P16 zvrácen, a v P20 exprese *Dexras1* naopak mírně klesla. U AVDM a VL byla v P5 zjištěna nižší hladina než v P1, což by mohlo souviset s nízkým počtem řezů vhodných k hodnocení. V somatosenzorickém ventrálním posteromediálním jádře (VPM; *ventral posteromedial thalamic nucleus*) jsme našli expresi *Dexras1* už v E20, a poté až do P5 exprese narůstala. Mezi P5 a P10 jsme pozorovali výrazný pokles exprese *Dexras1*, která dále od P10 k P20 vzrůstala. Ve ventrálním posterolaterálním jádře (VPL; *ventral posterolateral thalamic nucleus*) jsme na rozdíl od VPM expresi *Dexras1* detekovali až v P1 a vykazovala obdobný trend jako u VPM. V dorsální části zrakového laterálního genikulárního jádra talamu (DLG; *dorsal lateral geniculate nucleus*) jsme našli vzrůstající expresi *Dexras1* od P1 k P20. Ve ventrální části sluchového mediálního genikulárního jádra (MGV; *medial geniculate nucleus, ventral part*) jsme detekovali silnější expresi také až postnatálně, v P20 dosahovala přibližně dvojnásobných hodnot oproti mladším vývojovým stádiím (obr. 5).

A

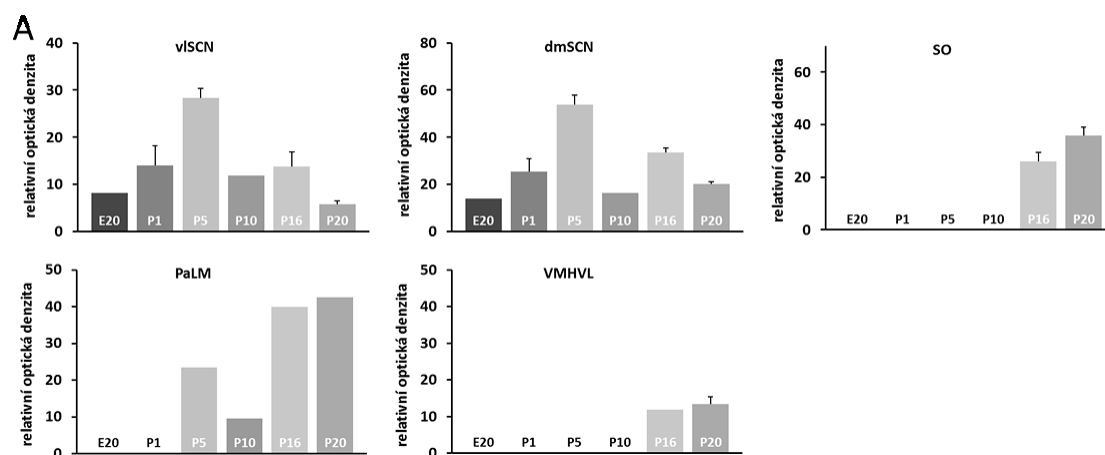


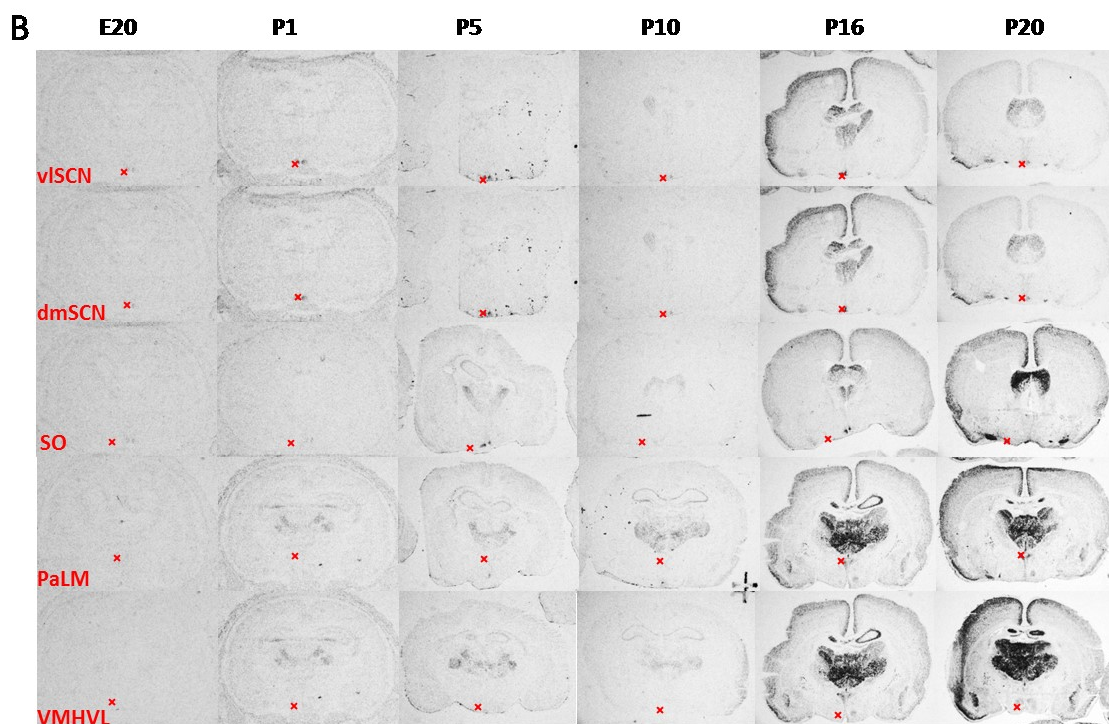
Obr. 5: Vývojové změny v expresi *Dexras1* mRNA ve strukturách talamu.

A) Souhrnný graf ukazující naměřené hodnoty relativní optické denzity (OD) *Dexras1* mRNA v SFO a v talamických jádrech PVA, AD, AVDM, VA, VL, VPM, VPL, DLG a MGV u mláďat potkana ve věku E20- P20. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 1- 3 zvířat z každé věkové skupiny s vyznačenou SEM. B) Ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu měřených oblastí mozku v průběhu ontogeneze. Červené křížky vyznačují střed tzv. oblasti zájmu (ROI; z angl. "region of interest"), tj. plochu, ve které byla měřena OD.

5.1.2.2 Vývoj v expresi *Dexas1* v hypotalamu potkana

Expres *Dexas1* v obou podoblastech SCN, ventrolaterálním (vlSCN; *ventrolateral suprachiasmatic nucleus*) i dorsomediálním SCN (dmSCN; *dorsomedial suprachiasmatic nucleus*), postupně rostla od E20 k maximální hladině v P5. V P10, P16 a v P20 byla nalezena výrazně nižší exprese než v P5. Relativní optická denzita v dmSCN byla v porovnání s vlSCN 1,5násobná. V supraoptickém jádře (SO; *supraoptic nucleus*) byla zjištěna exprese *Dexas1* až v P16 a P20. V laterální magnocelulární části paraventriculárního jádra hypotalamu (PaLM; *paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular part*) exprese *Dexas1* narůstala od P5 k P20. V P10 byl hodnocen pouze jediný řez, který měl slabší autoradiografický otisk. Ve ventrolaterální části ventromediálního jádra (VMHVL; *ventromedial hypothalamic nucleus, ventrolateral part*) byla zjištěna relativně nízká exprese *Dexas1* až v P16 a P20 (obr. 6).





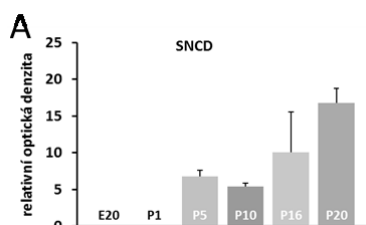
Obr. 6: Vývojové změny v expresi *Dexras1* v hypothalamických strukturách.

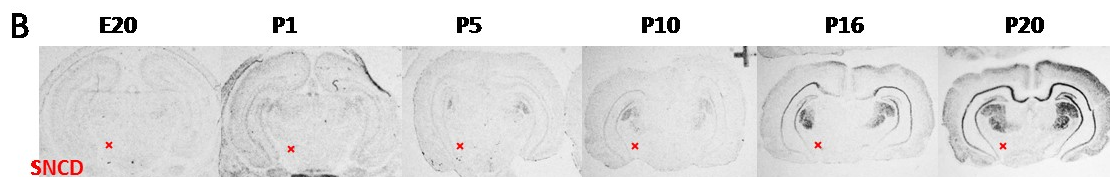
A) Souhrnný graf ukazující naměřené hodnoty relativní optické denzity (OD) *Dexras1* mRNA ve vISCN, dmSCN, SO, PaLM a VMHVL u mláďat potkana ve věku E20- P20. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 1- 4 zvířat z každé věkové skupiny s vyznačenou SEM.

B) Ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu měřených oblastí mozku v průběhu ontogeneze. Červené křížky vyznačují střed tzv. oblasti zájmu (ROI; z angl. "region of interest"), tj. plochu, ve které byla měřena OD.

5.1.3 Vývoj v expresi *Dexras1* v mesencefalonu potkana

V mesencefalonu jsme detekovali expresi *Dexras1* pouze v dorsální části substantia nigra pars compacta (SNCD; *substantia nigra, compact part, dorsal tier*). V P5 i P10 dosahovala přibližně stejné nízké hodnoty a od P10 k P20 pomalu narůstala (obr. 7).



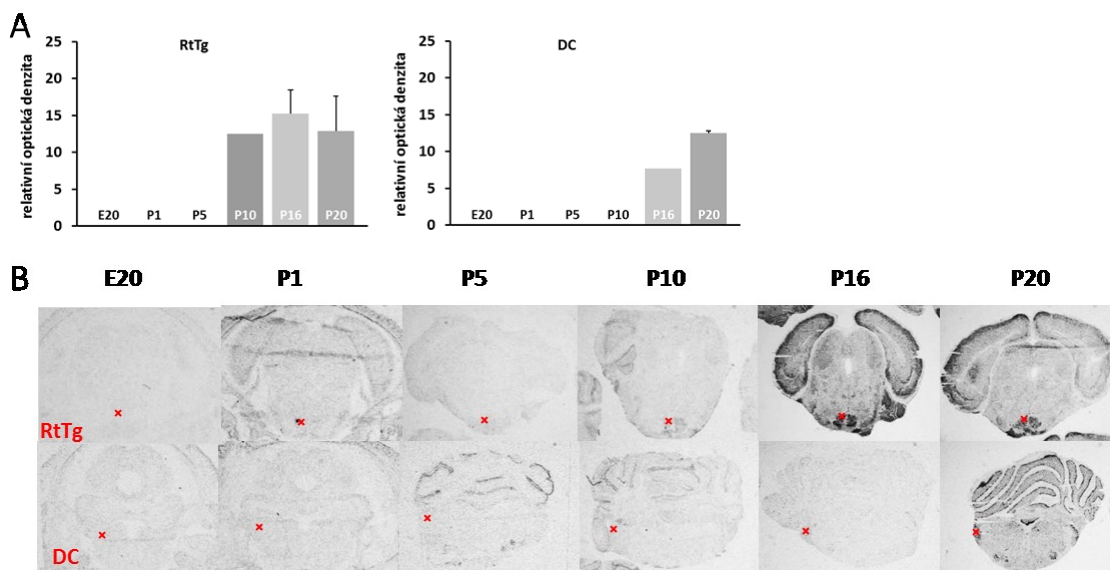


Obr. 7: Vývojové změny v expresi *Dexas1* v substantia nigra pars compacta.

A) Souhrnný graf ukazující naměřené hodnoty relativní optické denzity (OD) *Dexas1* mRNA v SNCD u mláďat potkana ve věku E20- P20. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 2 zvířat z každé věkové skupiny s vyznačenou SEM. B) Ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu měřených oblastí mozku v průběhu ontogeneze. Červené křížky vyznačují střed tzv. oblasti zájmu (ROI; z angl. "region of interest"), tj. plochu, ve které byla měřena OD.

5.1.4 Vývoj v expresi *Dexas1* v metencefalonu potkana

V retikulo-tegmentálním jádře Varolova mostu (RtTg; *reticulotegmental nucleus of the pons*) jsme našli přibližně stejnou hladinu exprese *Dexas1* ve věkových skupinách P10 až P20. Oproti tomu v dorsálním kochleárním jádře (DC; *dorsal cochlear nucleus*) jsme objevili vzrůstající expresi *Dexas1* od P16 k P20 (obr. 8).



Obr. 8: Vývojové změny v expresi *Dexas1* mRNA v metencefalonu.

A) Souhrnný graf ukazující naměřené hodnoty relativní optické denzity (OD) *Dexas1* mRNA v RtTg a v DC u mláďat potkana ve věku E20- P20. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 1- 3 zvířat z každé věkové skupiny s vyznačenou SEM. B) Ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu měřených oblastí mozku v průběhu ontogeneze. Červené křížky vyznačují střed tzv. oblasti zájmu (ROI; z angl. "region of interest"), tj. plochu, ve které byla měřena OD.

5.2 Změny v expresi *Dexras1* v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci

Světelná deprivace mláďat potkana od narození až do jejich 16. postnatálního dne a částečná světelná deprivace jejich matek od E1 ovlivnila expresi *Dexras1* mRNA v několika mozkových strukturách. *Obrázek 9* ukazuje jak statisticky významné, tak nevýznamné rozdíly v expresi *Dexras1* ve všech strukturách mozku, kde byl detekován hybridizační signál. Struktury jsou na obrázku uspořádány v rostro-kaudálním směru.

Ve vnější části anteriorního olfaktorického jádra (AOE; *anterior olfactory nucleus, external*), dále také ve frontální asociační kůře (FrA; *frontal association cortex*), ve VTT2, v posteriorní části anteriorního olfaktorického jádra (AOP; *anterior olfactory area, posterior part*), AOVp i Pir2 jsme zjistili mírně zvýšenou hladinu *Dexras1* mRNA u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními. Oproti tomu v LSI jsme našli u světelně deprivovaných potkanů nesignifikantně nižší hladinu *Dexras1* v porovnání s kontrolní skupinou. V diagonální skupině jader olfaktorického horizontálního limbu (HDB; *nucleus of the horizontal limb of the diagonal band*) jsme naměřili výrazně vyšší hladinu *Dexras1* mRNA u světelně deprivovaných potkanů než u kontrol.

Zatímco ve vlSCN jsme nenaměřili výrazný rozdíl v hladinách *Dexras1* mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany, v dmSCN byla hladina *Dexras1* u světelně deprivovaných zvířat signifikantně vyšší než u kontrolních ($P = 0,011405$). Podobně jako v ontogenezi, exprese *Dexras1* mRNA v dmSCN dosahovala minimálně dvojnásobných hodnot než ve vlSCN.

V SO způsobila světelná deprivace signifikantní snížení exprese *Dexras1* oproti kontrolám ($P = 0,003695$). Hladina *Dexras1* mRNA v LOT2 byla mírně zvýšená u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními, avšak tento nárůst nebyl signifikantní. V PVA podobně jako v SO jsme našli u světelně deprivovaných potkanů signifikantní pokles hladiny *Dexras1* ($P = 0,030986$). V SFO jsme také detekovali snížení hladiny *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů, avšak tento nález nebyl signifikantní. V PaLM jsme zjistili signifikantní čtyřnásobné snížení exprese *Dexras1* u světelně deprivovaných zvířat oproti kontrolám ($P = 0,01116$).

U světelně deprivovaných potkanů jsme dále našli v AD nesignifikantní snížení hladiny *Dexras1* na poloviční hodnotu než u kontrolní skupiny. V AVDM byla hladina *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolami také snížena. Oproti

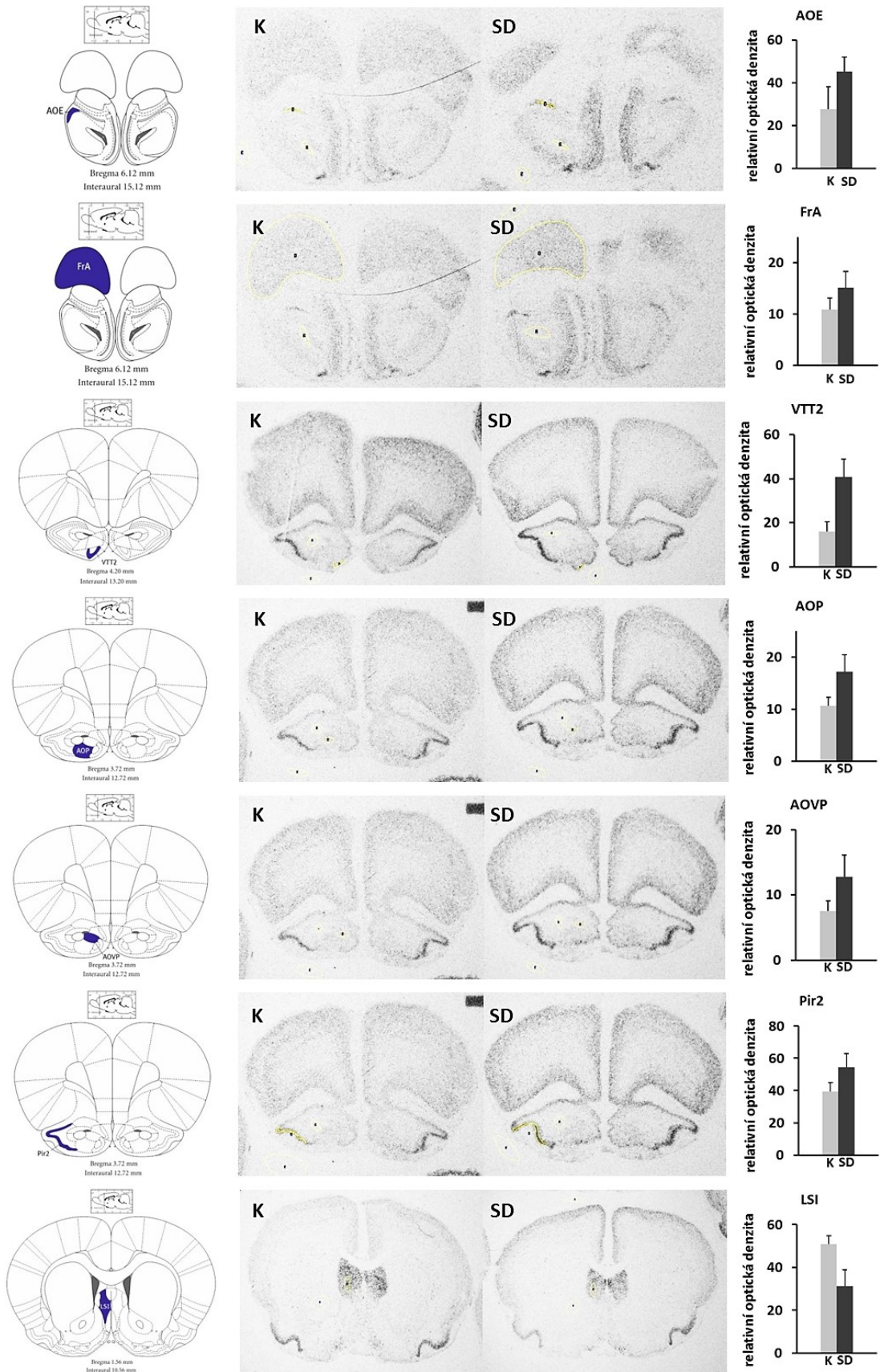
tomu ve ventrální části klaustra (VCl; *ventral part of claustrum*) nebyla detekována výrazná změna v hladině *Dexras1* mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany. Statisticky významně nižší hladina *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolami byla pozorována ve VA ($P = 0,022546$). Podobný, avšak nesignifikantní pokles hladiny *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů byl nalezen ve VL.

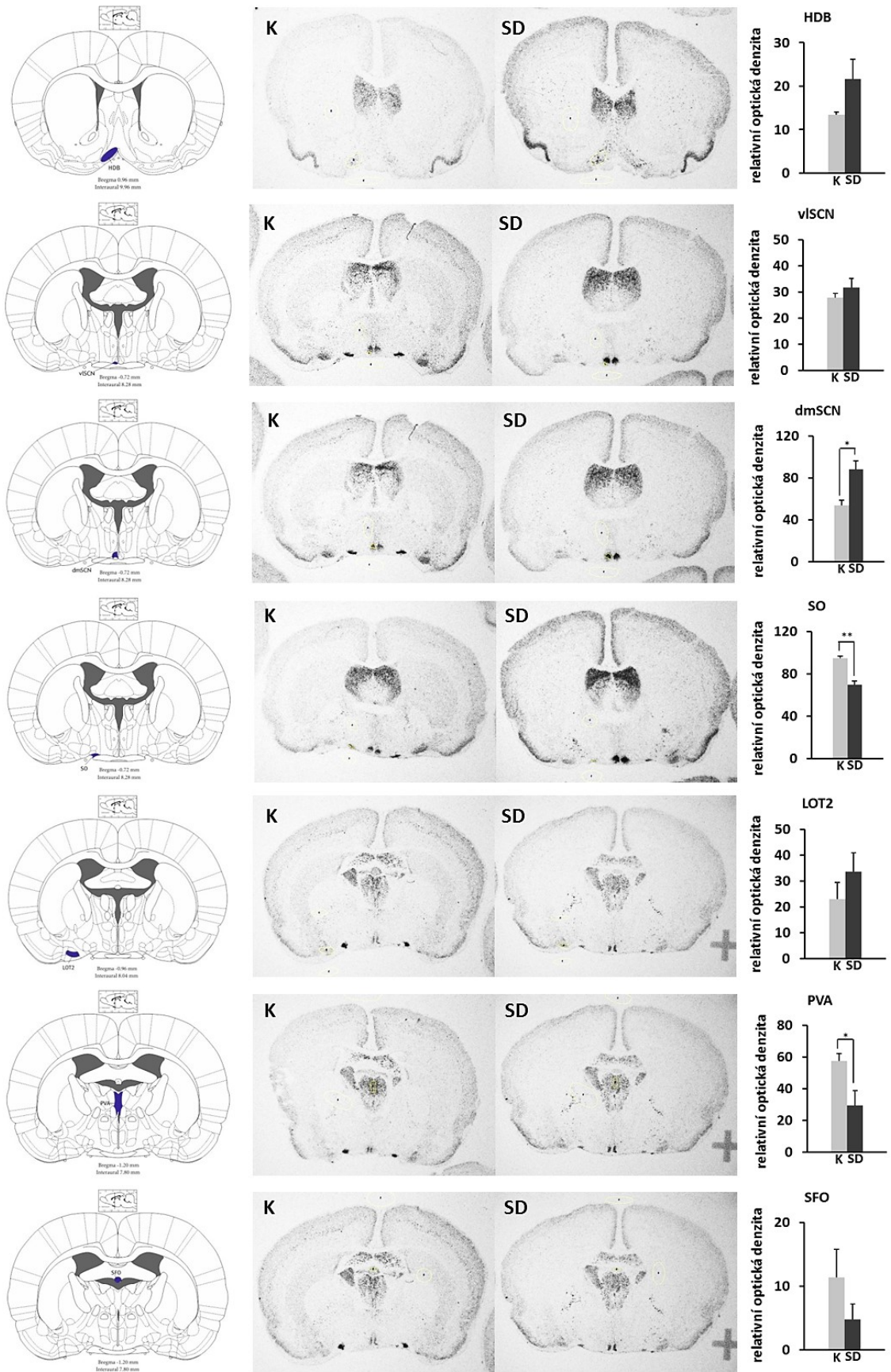
V dorsálním endopiriformním jádře (DEn; *dorsal endopiriform nucleus*) nebyla detekována výrazná změna v hladině *Dexras1* mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany. V BLA i v anteroventrální části mediálního amygdaloidního jádra (MeAV; *medial amygdaloid nucleus, anteroventral part*) jsme pozorovali nesignifikantní zvýšení exprese *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolami. Ve VMHVL jsme nenalezli výraznou změnu v hladině *Dexras1* mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany.

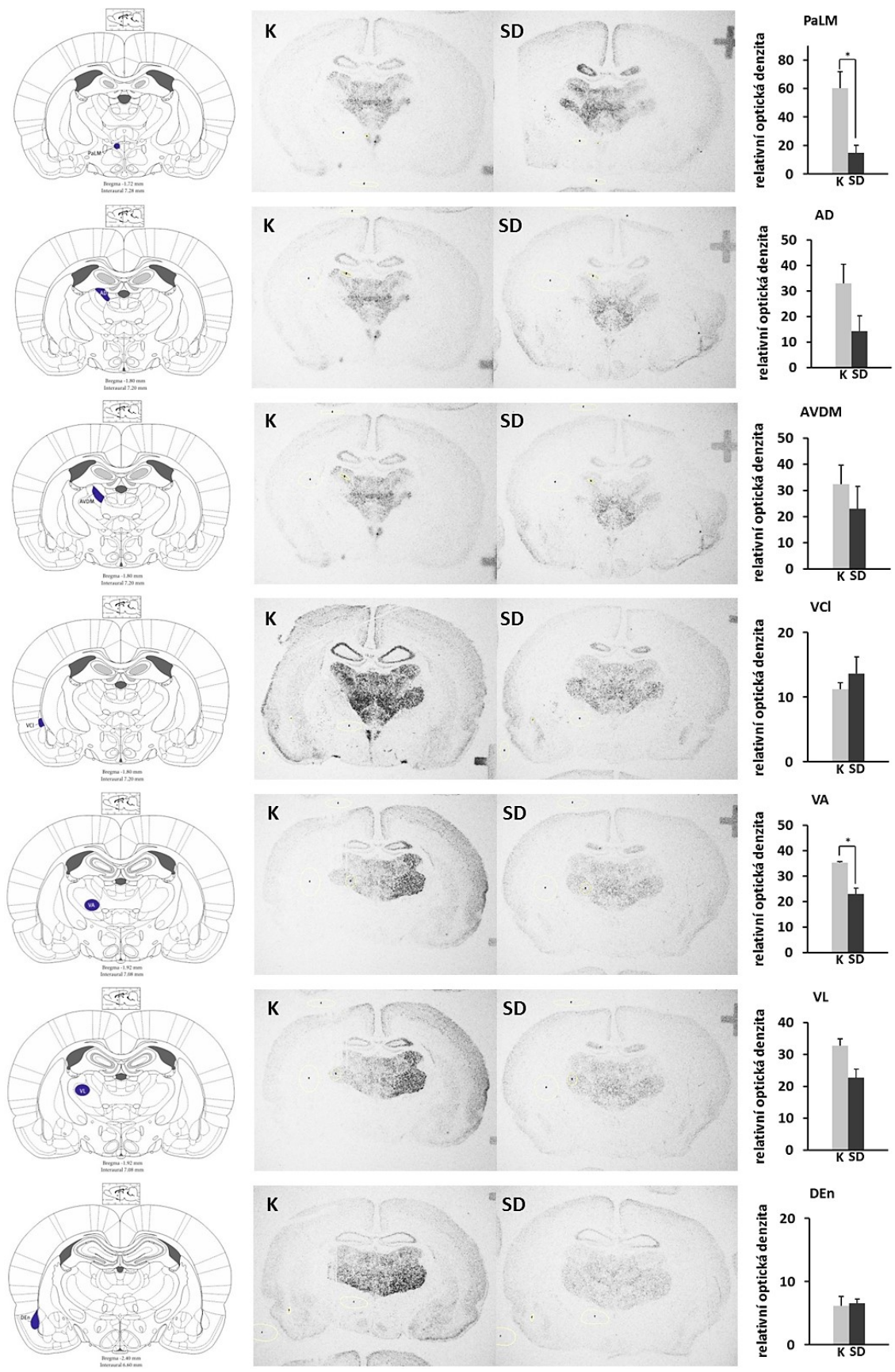
V DLG vedla světelná deprivace k signifikantnímu snížení exprese *Dexras1* ($P = 0,032492$). V SNCD jsme detekovali poloviční hladinu *Dexras1* mRNA u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními ($P = 0,003711$). Ve struktuře sluchové dráhy, v MGV, byla hladina *Dexras1* mRNA u světelně deprivovaných potkanů taktéž signifikantně snížena oproti kontrolní skupině ($P = 0,021426$). Mírný pokles hladiny *Dexras1* mRNA jsme pozorovali také v GrDG.

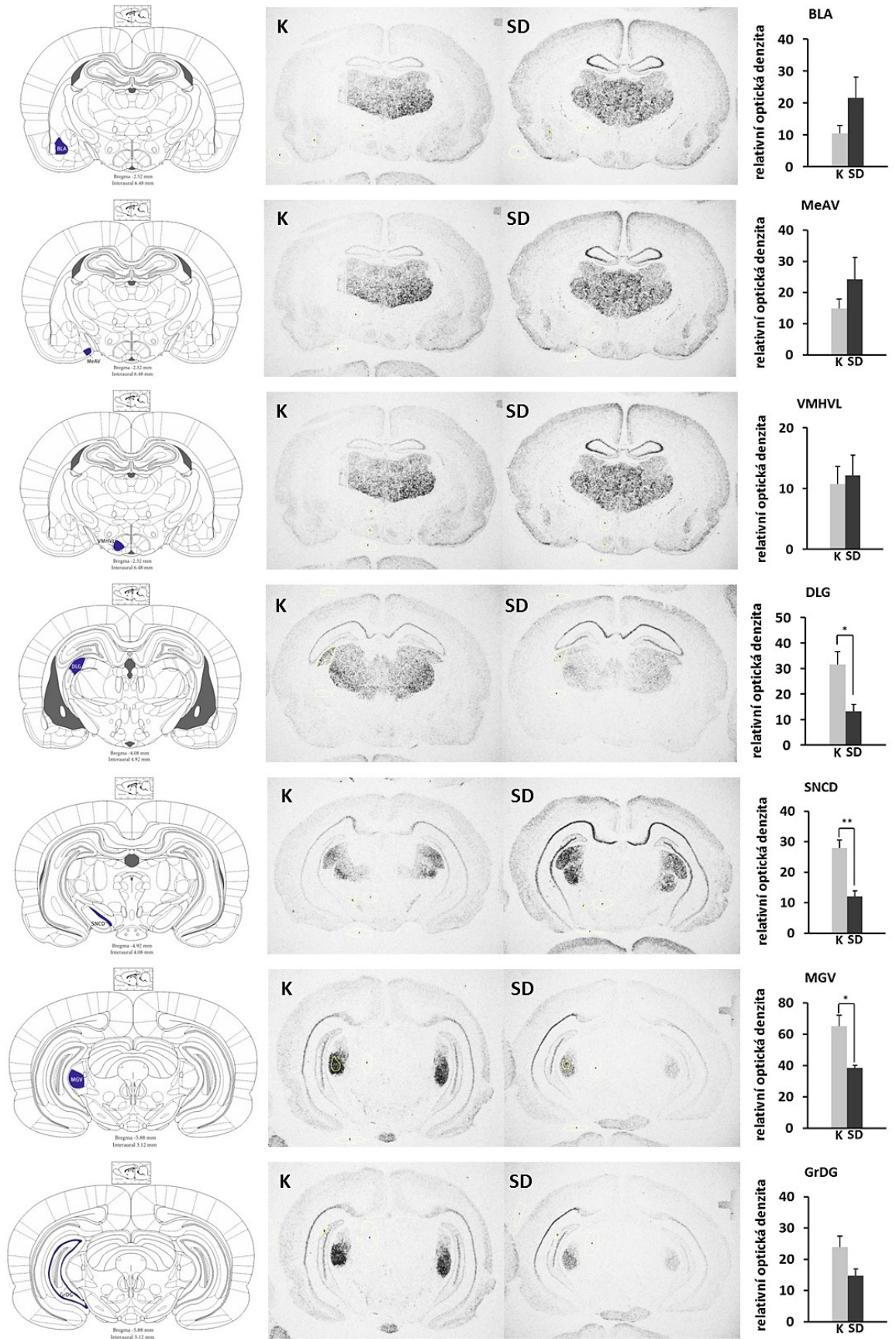
V retrosplenální granulórní kůře (RSG; *retrosplenial granular cortex*) byla u světelně deprivovaných potkanů hladina *Dexras1* mRNA nepatrně snížena oproti kontrolám. V primární zrakové kůře jsme nenalezli žádnou patrnou změnu v hladinách *Dexas1* mRNA mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany.

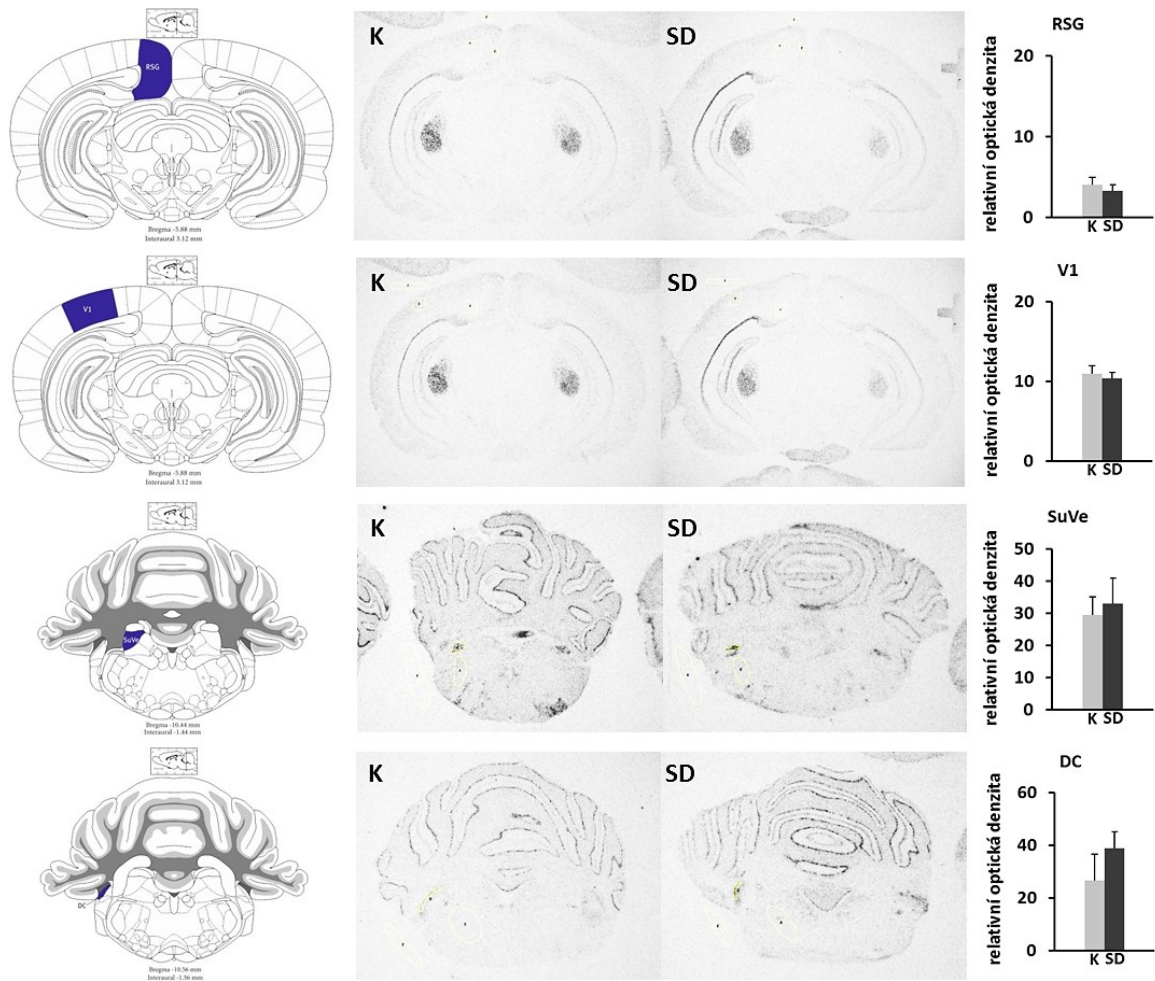
V superioriálním vestibulárním jádře (SuVe; *superior vestibular nucleus*) jsme nezjistili výraznou změnu v expresi *Dexras1* u světelně deprivovaných a kontrolních potkanů. V DC jsme naměřili mírný nárůst hladiny *Dexras1* mRNA u světelně deprivovaných potkanů oproti kontrolám.











Obr. 9: Změny v hladině *Dexras1* mRNA v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci.

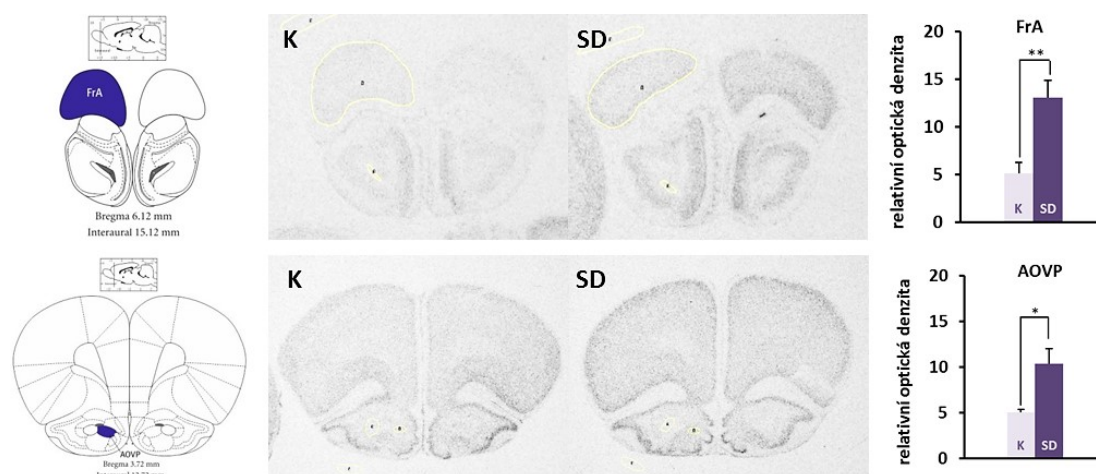
Výsledky měření relativní optické denzity (OD) *Dexras1* mRNA v mozkových strukturách srovnaných v rostro-kaudálním směru. Nalevo ilustrační schéma z atlasu s modře vyznačenými měřenými strukturami (Převzato a upraveno z Paxinos & Watson, 2009), uprostřed ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu s vyznačenými tzv. oblastmi zájmu (ROI; z angl. "region of interest") v měřených strukturách a s oblastmi definujícími intenzitu pozadí. Napravo odpovídající graf s hodnotami relativní OD hybridizačního signálu v daných strukturách u kontrolních (K) a světelně deprivovaných (SD) mládřat potkanů. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní optické denzity 3-5 zvířat s vyznačenou SEM. * značí statistickou významnost $P < 0,05$. ** značí statistickou významnost $P < 0,01$.

5.2.1 Změny v expresi hodinových genů *Per1* a *Rev-erba* v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci

Expres *Dexras1* je regulována cirkadiálními hodinami a v SCN vykazuje podobný rytmus jako expres hodinového genu *Bmal1* (Takahashi *et al.*, 2003). Lze tedy předpokládat, že se na její regulaci podílí protein REV-ERBa stejně jako na regulaci expres *Bmal1*. Hodinový gen *Per1* je citlivý na světlo a regulací jeho expres dochází k synchronizaci fáze cirkadiálních hodin (Trávníčková-Bendová *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2006). Proto jsme se také zajímali o to, jestli světelná deprivace ovlivní expresi hodinových genů *Per1* a *Rev-erba*.

5.2.1.1 Změny v expresi *Per1* v mozku potkanů po světelné deprivaci

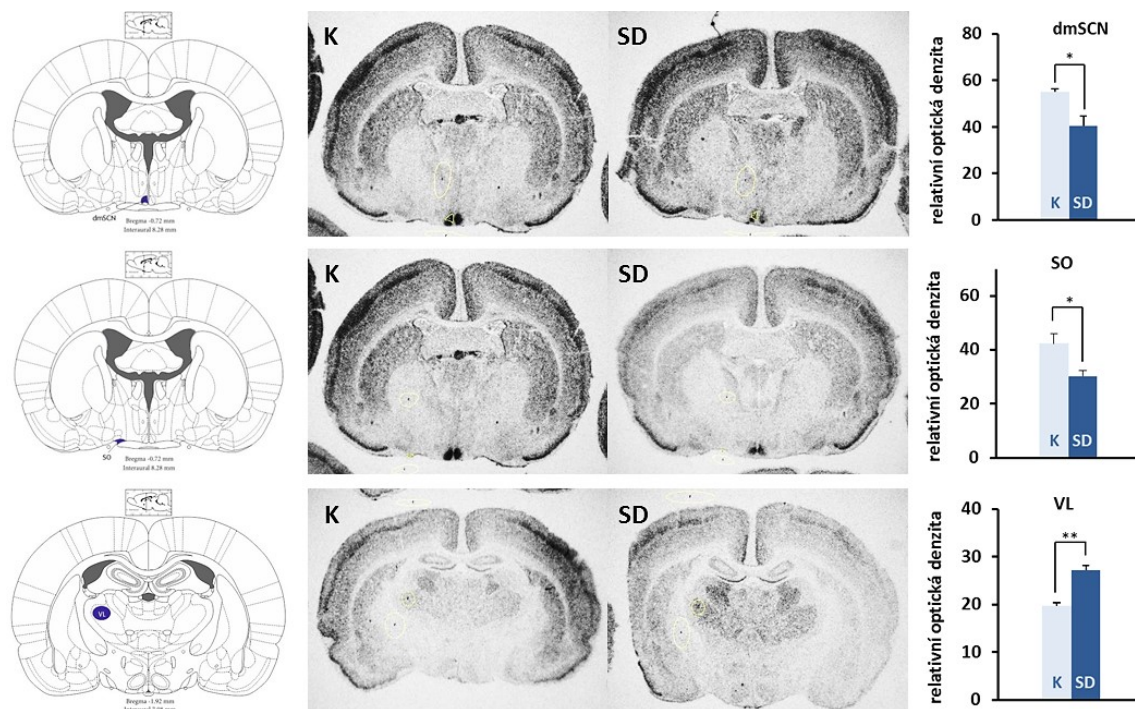
Signifikantní změny v expresi hodinového genu *Per1* vlivem světelné deprivace jsme pozorovali ve FrA ($P = 0,005019$) a v AOVP ($P = 0,028831$). V obou těchto strukturách jsme naměřili dvojnásobnou hladinu expres *Per1* u světelně deprivovaných mláďat potkanů v porovnání s kontrolními potkany (obr. 10).



Obr. 10: Změny v hladině *Per1* mRNA v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci. Signifikantní rozdíly relativní OD hybridizačního signálu *Per1* mRNA ve FrA a AOVP. Nalevo ilustrační schéma z atlasu s modře vyznačenými měřenými strukturami (Převzato a upraveno z Paxinos & Watson, 2009), uprostřed ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu s vyznačenými tzv. oblastmi zájmu (ROI; z angl. "region of interest") v měřených strukturách a s oblastmi definujícími intenzitu pozadí. Napravo odpovídající graf s hodnotami OD v daných strukturách u kontrolních (K) a světelně deprivovaných (SD) mláďat potkanů. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní optické denzity 4- 5 zvířat s vyznačenou SEM. * značí statistickou významnost $P < 0,05$. ** značí statistickou významnost $P < 0,01$.

5.2.1.2 Změny v expresi *Rev-erba* v mozku potkanů po světelné deprivaci

Studentův t-test odhalil signifikantní rozdíly v expresi *Rev-erba* mRNA v dmSCN ($P = 0,025775$), v SO ($P = 0,026984$) a ve VL ($P = 0,002637$). V dmSCN i v SO byla hladina *Rev-erba* u světelně deprivovaných potkanů signifikantně snížena oproti kontrolám. Zatímco ve VL jsme naopak pozorovali výrazný nárůst exprese *Rev-erba* mRNA u světelně deprivovaných zvířat v porovnání s kontrolními (obr. 11).

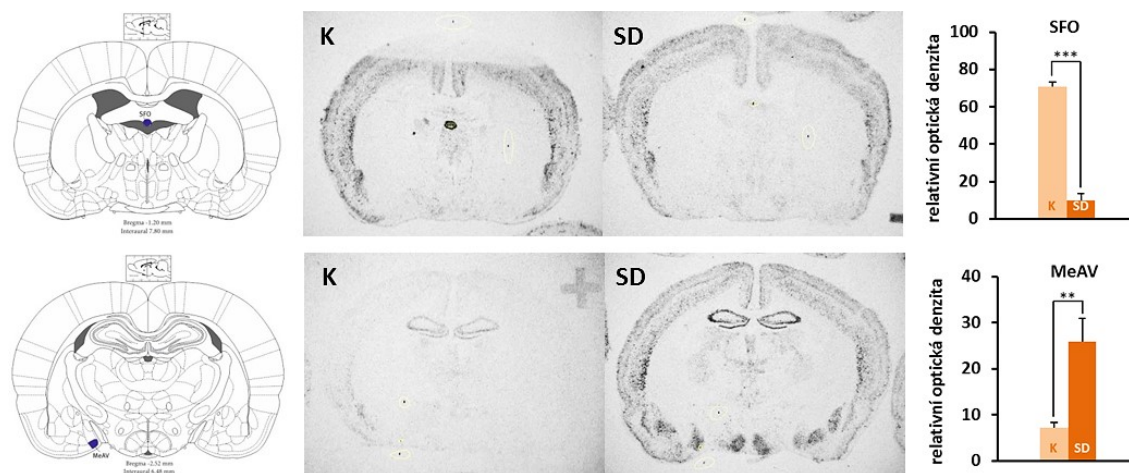


Obr. 11: Změny v hladině *Rev-erba* mRNA v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci.

Signifikantní rozdíly relativní OD hybridizačního signálu *Rev-erba* mRNA ve dmSCN, SO a VL. Nalevo ilustrační schéma z atlasu s modře vyznačenými měřenými strukturami (Převzato a upraveno z Paxinos & Watson, 2009), uprostřed ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu s vyznačenými tzv. oblastmi zájmu (ROI; z angl. "region of interest") v měřených strukturách a s oblastmi definujícími intenzitu pozadí. Napravo odpovídající graf s hodnotami OD v daných strukturách u kontrolních (K) a světelně deprivovaných (SD) mládřat potkanů. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní optické denzity 3-5 zvířat s vyznačenou SEM. * značí statistickou významnost $P < 0,05$. ** značí statistickou významnost $P < 0,01$.

5.2.2 Změny v expresi neurotrofického faktoru BDNF v mozku potkanů po světelné deprivaci

Pro detekci změn v neuronální plasticitě jsme jako marker použili mRNA neurotrofického faktoru *Bdnf*. Statisticky signifikantní rozdíl v expresi *Bdnf* mezi světelně deprivovanými a kontrolními potkany jsme našli pouze v SFO ($P = 0,000178$), a v MeAV ($P = 0,007902$). V SFO u světelně deprivovaných mláďat potkanů byla hladina *Bdnf* mRNA sedminásobně nižší než u kontrol, zatímco v MeAV jsme naměřili více než trojnásobnou hladinu *Bdnf* mRNA u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními potkany (obr. 12).



Obr. 12: Změny v hladině *Bdnf* mRNA v mozku 16denních potkanů po světelné deprivaci. Signifikantní rozdíl relativní optické denzity (OD) hybridizačního signálu *Bdnf* mRNA v SFO a v MeAV. Nalevo ilustrační schéma z atlasu s modře vyznačenými měřenými strukturami (Převzato a upraveno z Paxinos & Watson, 2009), uprostřed ukázkové autoradiografie hybridizačního signálu s vyznačenými tzv. oblastmi zájmu (ROI; z angl. "region of interest") v měřených strukturách a s oblastmi definujícími intenzitu pozadí. Napravo odpovídající graf s hodnotami OD u kontrolních (K) a světelně deprivovaných (SD) mláďat potkanů. Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu relativní OD 3-4 zvířat s vyznačenou SEM. ** značí statistickou významnost $P < 0,01$. *** značí statistickou významnost $P < 0,001$.

6. DISKUZE

Dřívější studie demonstrovaly up-regulaci exprese *Dexas1* v mozku myši a potkanů vlivem glukokortikoidů dexametazonu a kortikosteronu (Brogan *et al.*, 2001), ale také vlivem psychostimulantu amfetaminu (Schwendt & McGinty, 2010). Oproti tomu prenatální expozice alkoholu vedla ke snížení exprese *Dexas1* (Hard *et al.*, 2005). Přestože nebylo doposud prokázáno, že se hladina glukokortikoidů či jejich receptorů mění v mozku po sensorické deprivaci, tyto studie jsou dobrou ukázkou ovlivnění exprese *Dexas1* vzájemně nepříbuznými substancemi, jejichž seznam se může v budoucnu rozšiřovat. Silná exprese *Dexas1* v sensorických strukturách talamu, zejména v laterálním genikulárním jádře, a také v SCN, odhalená v našich předchozích pokusech, nás vedla k záměru sledovat změny v expresi *Dexas1* v mozku během ontogeneze a ovlivnění exprese *Dexas1* světelnou deprivací mláďat.

Výsledky ontogenetického experimentu ukázaly u většiny hodnocených struktur rostoucí hladinu *Dexas1* mRNA s věkem, například v sensorických strukturách AOP, LOT2, DLG, MGV a DC, a ve strukturách limbického systému LSI, PVA a BLA. Stoupající hladina *Dexas1* mRNA v těchto strukturách zřejmě souvisí s jejich pozvolnou maturací a funkční diferenciací. Naproti tomu ve strukturách SFO, VHMVL, LaDL a RtTg jsme v postnatálních věkových skupinách našli přibližně stálé hladiny *Dexas1* mRNA. Avšak naše výsledky mohou být mírně zkreslené menším počtem kvalitních vzorků, než je optimum pro statistické zpracování dat, a proto naměřené hodnoty exprese *Dexas1* v mozku během ontogeneze lze považovat pouze za orientační.

Nejčasněji v ontogenezi potkana, v E20, jsme detekovali expresi *Dexas1* pouze v obou podoblastech SCN, podobně jako v předchozích experimentech naší laboratoře (Hahnová *et al.*, 2016), a také ve VPM talamu. Exprese v obou podoblastech SCN dále vykazovala nárůst od E20 až do P5, avšak v P10 jsme naměřili již výrazně nižší specifický hybridizační signál, který mohl být částečně způsoben nedostatečným počtem kvalitních vzorků. V pozdějších věkových skupinách už exprese *Dexas1* dále klesala. Tento vývojový vzorec exprese *Dexas1* zhruba odpovídá vývoji exprese podjednotek NMDA receptorů v SCN potkanů (Bendová *et al.*, 2009), a naznačuje souvislost s vývojem signalizační dráhy NMDA-nNOS-NO v SCN. Význam prenatální exprese *Dexas1* v SCN však není tak zřejmý. SCN se formuje v E17 a je již prenatálně schopno generovat endogenní cirkadiánní rytmy (Reppert & Schwartz, 1984; Ohta *et al.*, 2002). Podle dosavadních experimentů se ale předpokládá, že role *Dexas1* spočívá spíše v mechanismu

světelné synchronizace než v procesu generování endogenních oscilací (Cheng *et al.*, 2004, 2006). Schopnost synchronizace s vnějšími světelnými podmínkami se ale vyvíjí jen pozvolna a u potkanů není dokonalá ještě ani v P10 (Bendová *et al.*, 2004). Silná exprese *Dexras1* v SCN v tak časně ontogenezi tedy naznačuje, že jeho význam pro maturaci a fungování cirkadiálního pacemakeru není zatím zcela objasněn.

Ve VPM talamu, jehož neurony přijímají somatosenzorické informace z oblasti hlavy a převádí je do somatosenzorické kůry, vykazovala exprese *Dexras1* nárůst mezi E20 a P5 až na trojnásobnou hladinu. Oproti tomu od P10 až k P20 se exprese *Dexras1* držela na nízkých hladinách. Tyto výsledky pravděpodobně souvisí s rozvojem somatosenzorického systému (Lendvai *et al.*, 2000) časně po narození, kdy se slepá potkaní mláďata orientují hlavně pomocí somatosenzorických vjemů a VPM zpracovává informace z hmatových vibrací a okolních oblastí hlavy důležitých pro vývoj sacího reflexu. Je zajímavé, že *Dexras1* mRNA se v jádře VPL objevuje až postnatálně. Toto talamické jádro je zodpovědné za zpracování stejných somatosenzorických informací jako VPM, ale z oblasti těla, vedených páteří míchou. Somatosenzorický systém hlavy se tedy vyvíjí jako první a naše výsledky naznačují úlohu *Dexras1* již v jeho časně ontogenezi. Teprve později začíná u potkaních mláďat narůstat také aktivita čichového a sluchového systému. Zrakový systém však u potkana dozrává ještě později (přibližně mezi P21 až P45) (Fagiolini *et al.*, 1994; Majewska & Sur, 2003) a tomu odpovídá také relativně nízká exprese *Dexras1* pozorovaná v DLG talamu. S tímto vývojovým gradientem se shodují i naše naměřené hladiny exprese *Dexras1* v dalších senzorních strukturách, jež ukazují vyšší expresi *Dexras1* ve sluchových strukturách MGv a DC, ale i v čichových strukturách AOVp, VTT2, Pir2 a LOT2 až později během ontogeneze mezi P16 a P20. Nárůst exprese *Dexras1* v MGv a DC se překrývá s obdobím kritické periody vývoje sluchového systému, který spadá přibližně mezi P9 a P28 (Zhang *et al.*, 2002). Kritická perioda vývoje čichového systému končí přibližně kolem P13 a později dochází jen k prodloužení projekčních axonů do dalších vrstev čichové kůry (Friedman & Price, 1986; Evers *et al.*, 1996).

Tyto výsledky naznačují, že by *Dexras1* mohl mít roli ve vyvíjejících se senzorních systémech. Jeho exprese se však neomezuje pouze na ně. Zajímavý je i vývoj exprese *Dexras1* v motorických jádrech talamu VA a VL. Zatímco ve VL se jeho exprese objevuje již v P1, tedy hned po porodu, ve VA až v P5 tedy v době, kdy již mláďe vykonává volní plánovaný a naučený pohyb, který toto jádro napomáhá organizovat. S organizací pohybu souvisí i RtTG jádro Varolova mostu, které komunikuje s mozečkem a je pravděpodobně

zodpovědné za posturální reflexy. Expres *Dexas1* se v něm objevuje až v P10 a drží se na přibližně stejné úrovni v obou následujících kvantifikovaných věkových skupinách.

V hypothalamickém PaLM exprese *Dexas1* vzrůstala od P5 k P20, přičemž ve dvou nejstarších kvantifikovaných věkových skupinách vykazovala nejvyšších hodnot. V P10 jsme naměřili nízkou hladinu *Dexas1*, což může být dáno nízkou kvalitou řezů v tomto věku. Vysoká exprese *Dexas1* v magnocelulárních buňkách paraventriculárního jádra hypothalamu byla u potkanů zjištěna již dříve a byla spojována s jeho inhibiční rolí v regulaci dráhy cAMP-PKA-CREB v reakci na osmotický stres (Greenwood *et al.*, 2016). Ve dvou zbývajících strukturách hypothalamu, SO a VMHVL, se exprese *Dexas1* objevila až v P16. Jádro VMHVL reguluje sexuální a agresivní chování a je tedy možné, že transkripční aktivita jeho neuronů se zvyšuje až s dospíváním zvířat. Supraoptické jádro reguluje vodní homeostázu v těle. Ačkoliv o jeho vývoji u potkana není mnoho známo, je možné, že se jeho aktivita zvyšuje s pozvolným přechodem od mateřského mléka na pevnou stravu nebo s vývojem hypofýzy či funkce ledvin. Je zajímavé, že stejný vzorec exprese *Dexas1* jako v SO má také SFO, sensorický cirkumventrikulární orgán citlivý na angiotensin a atriální natriuretický peptid, který také hraje významnou roli ve vodní homeostáze. Některé buňky SFO fungují jako osmoreceptory a projikují právě do SO a PaLM.

Poměrně silná exprese *Dexas1* byla naměřena také v řadě struktur limbického systému. Mezi ně patří také dvě asociační jádra talamu, AD a AVDM, důležitá pro učení a epizodickou paměť, a PVA, jádro regulující bdělost a pozornost, ve kterých exprese *Dexas1* graduálně roste od narození do P16. Patří mezi ně dále LSI, oblast septa vytvářející příjemné vjemy v rámci neuronálního systému odměny a trestu, ve kterých hladina *Dexas1* mRNA roste pozvolna od P5 až do P20. Graduální vývojový vzestup exprese *Dexas1* má také BLA, část amygdaly, jejíž primární funkcí je spouštění strachové reakce. Podobnou funkci má i další amygdaloidní jádro, LaDL, které se pravděpodobně podílí na ukládání paměťových stop na averzivní, strachové podněty. Granulární buňky gyru dentatu jsou významné excitační projekční neurony, které se u potkana objevují až postnatálně (Bayer & Altman, 1974). Je tedy možné, že vysoká hladina *Dexas1* v P1 odpovídá rychlému nárůstu diferenciaci těchto buněk, která se později zmírní a od P5 již roste pozvolna.

Absolutní míra exprese *Dexas1* mezi jednotlivými strukturami je obtížně srovnatelná. Je to dáno zejména jiným poměrem buněčných těl a bílé hmoty, které vytváří jiné hodnoty relativní optické denzity. Jediná struktura, u níž lze spolehlivě porovnat intenzitu

hybridizačního signálu mezi dvěma částmi je SCN. Z našich výsledků vyplývá, že hladina *Dexras1* mRNA v dmSCN byla ve všech kvantifikovaných věkových skupinách 1,5krát vyšší než ve vlSCN, což také odpovídá dříve publikovaným nálezům naší laboratoře (Hahnová *et al.*, 2016).

Diskuze o významu *Dexras1* ve vývoji mozkových struktur může být pouze spekulativní. Vaidyanathan a kolegové (2004) ve své studii popisují roli *Dexras1* v aktivaci apoptózy rakovinných buněk lidského plicního adenokarcinomu (A549 buněk). V tomto systému působí *Dexras1* v prevenci aberantního růstu A549 buněk, pravděpodobně svou účastí v mechanismu aktivace apoptózy u buněk (Vaidyanathan *et al.*, 2004). Analogicky by *Dexras1* mohl, během ontogeneze jednotlivých neuronálních systémů, regulovat odumírání přebytečných a neaktivních neuronů. Tomu odpovídá i expresní vzorec, který se objevuje u některých struktur, ve kterých byla maximální exprese *Dexras1* naměřena v časnějším vývojových stádiích a směrem k dospělosti se snižovala.

Senzorická zraková deprivace mláďat potkana vedla k signifikantnímu nárůstu v expresi *Dexras1* pouze v jedné oblasti mozku a to v dmSCN. Naopak v SO, PVA, PaLM, VA, DLG, SNCD a MGV byla exprese *Dexras1* u světelně deprivovaných potkanů významně snižena oproti kontrolám. Ačkoliv SCN patří mezi cílové struktury gangliových buněk sítnice a změna exprese *Dexras1* se v nich dá očekávat, není možné jí potvrdit porovnáváním hladin *Dexras1* pouze v jednom časovém bodě. Změna exprese v SCN může totiž souviset s částečnou desynchronizací a s tzv. volným během cirkadiánního oscilátoru v prostředí stálé tmy. Předchozí studie naší laboratoře ukázala, že v podmínkách stálé tmy hladina *Dexras1* v SCN osciluje s cirkadiánní periodou (Hahnová *et al.*, 2016). Endogenní oscilátor se sice vytváří ve velmi časně ontogenezi, vývoj jeho schopnosti synchronizace s vnějšími podmínkami je ale pozvolný. Je pravděpodobné, že v prostředí, kde chybí základní cirkadiánní synchronizátor, kterým je střídání světla a tmy, běží hodiny jednotlivých mláďat s jinou fází nebo tzv. volně běží s endogenní periodou nastavenou prenatálně jejich matkou. Doba odběru pak může spadnout do jiného vnitřního času kontrolních a světelně deprivovaných jedinců a tedy do doby vyšší či nižší, rytmicky regulované, exprese *Dexras1*.

Účinek světelné deprivace na pokles neuronální aktivity zrakových struktur by mohl být lépe demonstrován na změně exprese *Dexras1* v DLG. Ta byla u světelně deprivovaných potkanů signifikantně snižena na polovinu oproti hodnotám u kontrolních potkanů. Avšak v primární zrakové kůře k podobnému snížení nedošlo. Je však možné, že senzoricke deprivací byly zasaženy pouze některé vrstvy kortexu, které nemůžeme technikou *in situ*

hybridizace rozlišit. Korovou vrstvou, která tradičně slouží jako model morfologických změn spojených s monokulární deprivací, je čtvrtá vrstva, která může být funkčně rozdělena do celků nazývaných sloupce okulární dominance. K měření exprese *Dexras1* v těchto strukturách bychom ale potřebovali techniky, které jsou schopné rozlišit expresi mRNA na buněčné úrovni.

Naše výsledky ukázaly mírně zvýšenou hladinu *Dexras1* mRNA v čichových strukturách AOE, AOP, AOVP, VTT2, Pir2, HDB a LOT2 u světelně deprivovaných potkaních mláďat v porovnání s kontrolními potkany. Ačkoliv zvýšení není ani u jedné z těchto struktur signifikantní, je zajímavé, že se v přibližně stejné míře týká všech čichových struktur, které exprimují *Dexras1*. To by pravděpodobně mohlo souviset s posílením čichové diskriminace, kompenzující snížené zrakové vnímání deprivovaných potkanů.

Zajímavou souvislost má také signifikantní snížení exprese *Dexras1* v SO a PaLM, dvou hypotalamických jádrech regulujících produkci hormonů důležitých pro resorpci vody v ledvinách. Sensorický cirkumventrikulární orgán SFO, který je mozkovým osmotickým senzorem, vykazuje také sníženou expresi *Dexras1* po světelné deprivaci, i když statisticky nevýznamně. Zdá se tedy, že tyto tři oblasti mozku důležité pro vodní homeostázu v těle jsou citlivé na zrakovou deprivaci v časně ontogenezi a mění své signalizační molekuly.

Mírné snížení exprese *Dexras1* bylo také naměřeno v motorických jádrech VA a VL, a ve všech strukturách limbického systému s výjimkou jader amygdaly BLA a MeAV, a prefrontálního kortexu. Hledání vysvětlení pro změny v limbickém systému by mohlo začít úvahou o noční aktivitě potkanů, u nichž světlo vyvolává únikové chování. Je možné, že stálá tma mění aktivitu jejich limbického systému a odstraňuje stimul, který spouští averzivní obranu. Podobně jako když adolescentní myši vystavili stresoru v podobě omezení pohybu (*angl. restraint*) v době tmavé části světelného cyklu a pak sledovali jejich chování ve vyvýšeném bludišti a zjistili, že myši stresované v tmavé části světelného cyklu vykazovaly méně chování podobné anxietě v porovnání s myšmi testovanými v reakci na stejný stresor avšak ve světelné části cyklu (Ota *et al.*, 2015).

Světelná deprivace dále signifikantně snížila expresi *Dexras1* v SNCD a v MGV v porovnání s kontrolami. Pokles v expresi *Dexras1* v MGV u deprivovaných potkanů by mohl souviset s jejich izolací od ostatních zvířat po dobu experimentu, zatímco kontrolní skupina byla v místnosti s dalšími laboratorními potkany.

Mezi hlavní hodinové geny molekulární smyčky generující cirkadiánní oscilace patří *Per1* a *Rev-erba*, u kterých jsme také pozorovali změny v genové expresi po světelné

deprivaci. Expres *Rev-erba* byla v dmSCN a v SO signifikantně snižená u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními, zatímco ve VL jsme naopak pozorovali zvýšenou hladinu *Rev-erba* u světelně deprivovaných zvířat oproti kontrolám. Předpokládá se, že exprese *Dexras1* je regulována obdobným mechanismem jako exprese *Bmall*, proto jsme očekávali, že u světelně deprivovaných potkanů bude exprese *Rev-erba* snižená, pokud je exprese *Dexras1* zvýšená. Tato hypotéza byla ověřena pouze pro dmSCN, neplatí však pro jiné struktury.

Signifikantní nárůst exprese *Per1* jsme pozorovali ve FrA a v čichové struktuře AOVp u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními potkany. Expres genu *Per1* v SCN je zvýšená v odpovědi na světelný stimul, očekávali bychom tedy také změnu její exprese po zrakové deprivaci. Žádné signifikantní změny ve zrakových strukturách jsme však nenaměřili.

Pro detekci změn v neuronální plasticitě, způsobených světelnou deprivací mláďat, jsme také zkoumali změny v expresi *Bdnf* mRNA v mozku světelně deprivovaných potkanů. Signifikantní změny v expresi *Bdnf* mRNA jsme našli pouze v SFO a MeAV. V SFO byla exprese *Bdnf* mRNA, podobně jako u *Dexras1*, snižená u světelně deprivovaných potkanů v porovnání s kontrolními potkany. Oproti tomu v MeAV byla exprese *Bdnf* u světelně deprivovaných potkanů více než trojnásobná oproti kontrolám. Naše výsledky tedy naznačují zvýšenou nervovou plasticitu v MeAV u světelně deprivovaných mláďat potkana, což by mohlo souviset s pravděpodobným posílením čichové diskriminace a tedy i zvýšenou aktivitou neuronů mediálního amygdaloidního jádra, které se podílí na zpracování čichové informace v souvislosti s emoční složkou.

7. ZÁVĚR

Expres *Dexas1* je ve většině struktur mozku potkana detekovatelná spíše až postnatálně. Jedinou výjimku tvoří suprachiasmatická jádra a ventrální posteromediální jádro talamu, kde byla exprese zjištěna již prenatálně. V průběhu časné postnatální ontogeneze se exprese *Dexas1* postupně objevuje zejména v senzoryckých a několika motorických strukturách talamu, ve strukturách hypotalamu regulujících vodní homeostázu organismu a v řadě struktur limbického systému.

Světelná deprivace mláďat potkana od P0 až do jejich 16. dne věku způsobila pokles exprese *Dexas1* ve zřakovém laterálním genikulárním jádře talamu v porovnání s kontrolami. Podobnou citlivost ke světelné deprivaci jsme pozorovali i v supraoptickém jádře, paraventriculárním jádře hypotalamu a v subfornikálním orgánu, kde by pokles exprese *Dexas1* u světelně deprivovaných potkanů pravděpodobně mohl souviset se změnou signalizace těchto struktur. Dále jsme zjistili, že světelná deprivace snížila expresi *Dexas1* ve strukturách limbického systému, pravděpodobně v reakci na sníženou aktivitu těchto oblastí odstraněním stresoru, kterým může být pro nočního hlodavce světlo.

Společně výsledky našich experimentů navrhuji další studie pro posouzení možné role *Dexas1* v regulaci odumírání přebytečných, neaktivních nervových spojů a neuronů některých neuronálních systémů během ontogeneze.

8. LITERATURA

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., & Block, G.D. (2002) Circadian Rhythms in Isolated Brain Regions. *J. Neurosci.*, **22**, 350–356.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002) Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1693–1703.
- Amelio, A.L., Miraglia, L.J., Conkright, J.J., Mercer, B.A., Batalov, S., Cavett, V., Orth, A.P., Busby, J., Hogenesch, J.B., & Conkright, M.D. (2007) A coactivator trap identifies NONO (p54 nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway. *PNAS*, **104**, 20314–20319.
- Argandoña, E.G. & Lafuente, J. V. (2000) Influence of visual experience deprivation on the postnatal development of the microvascular bed in layer IV of the rat visual cortex. *Brain Res*, **855**, 137–142.
- Argandoña, E.G., Rossi, M.L., & Lafuente, J. V. (2003) Visual deprivation effects on the s100 β positive astrocytic population in the developing rat visual cortex: a quantitative study. *Brain Res Dev Brain Res*, **141**, 63–69.
- Baba, K., Sengupta, A., Tosini, M., Contreras-Alcantara, S., & Tosini, G. (2010) Circadian regulation of the PERIOD 2::LUCIFERASE bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium- choroid. *Mol. Vis.*, **16**, 2605–2611.
- Bayer, S.A. & Altman, J. (1974) Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol*, **158**, 55–79.
- Beadling, C., Druey, K.M., Richter, G., Kehrl, J.H., & Smith, K.A. (1999) Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes. *J Immunol*, **162**, 2677–2682.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Illnerová, H. (2004) Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res*, **148**, 105–112.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Mikkelsen, J.D. (2009) Circadian and developmental regulation of N-methyl-D-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-D-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **159**, 599–609.
- Bouchard-Cannon, P. & Cheng, H.-Y.M. (2012) Scheduled feeding alters the timing of the suprachiasmatic nucleus circadian clock in Dexras 1-deficient mice. *Chronobiol Int.*, **29**, 965–981.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *PNAS*, **87**, 682–685.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., Mcgee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., & Bredt, D.S. (1996) Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and α 1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell*, **84**, 757–767.
- Brogan, M.D., Behrend, E.N., & Kempainen, R.J. (2001) Regulation of Dexras1 expression by endogenous steroids. *Neuroendocrinology*, **74**, 244–250.
- Brown, S.A., Ripperger, J., Kadener, S., Fleury-Olela, F., Vilbois, F., Rosbash, M., & Schibler, U. (2005) PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. *Science*, **308**, 693–696.
- Brück, W. & Stadelmann, C. (2005) The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol*, **18**, 221–224.
- Buijs, R.M., Wortel, J., Heerikhuizen, J.J. Van, Feenstra, M.G.P., Horst, G.J. Ter, Romijn, H.J., & Kalsbeek, A. (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1535–1544.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I.H., Draetta, G.F., & Pagano, M. (2007) SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, **316**, 900–904.
- Cabib, S., Castellano, C., Cestari, V., Filibeck, U., & Puglisi-Allegra, S. (1991) D1 and D2 receptor antagonists differently affect cocaine-induced locomotor hyperactivity in the mouse.

- Psychopharmacol. (Berl.)*, **105**, 335–339.
- Cagampang, F.R.A., Piggins, H.D., Sheward, W.J., Harmar, A.J., & Coen, C.W. (1998) Circadian changes in PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic and supraoptic nuclei. *Brain Res.*, 218–222.
- Cagampang, F.R.A., Sheward, W.J., Harmar, A.J., Piggins, H.D., & Coen, C.W. (1998) Circadian changes in the expression of vasoactive intestinal peptide 2 receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Mol. Brain Res.*, 108–112.
- Castel, M., Belenky, M., Cohen, S., Ottersen, P., & Storm-Mathisen, J. (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, **5**, 368–381.
- Cismowski, M.J., Ma, C., Ribas, C., Xie, X., Spruyt, M., Lizano, J.S., Lanier, S.M., & Duzic, E. (2000) Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a Ras-related protein. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23421–23424.
- Cismowski, M.J., Takesono, A., Bernard, M.L., Duzic, E., & Lanier, S.M. (2001) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci.*, **68**, 2301–2308.
- Cismowski, M.J., Takesono, A., Ma, C., Lizano, J.S., Xie, X., Fuernkranz, H., Lanier, S.M., & Duzic, E. (1999) Cismowski et al. *Nat Biotechnol*, **17**, 878–883.
- Ciucci, F., Putignano, E., Baroncelli, L., Landi, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2007) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One*, **2**, e475.
- Coogan, A.N. & Wyse, C.A. (2008) Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain Res*, **1232**, 104–112.
- Crumbley, C., Wang, Y., Kojetin, D.J., & Burris, T.P. (2010) Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB α /ROR α target gene. *J. Biol. Chem.*, **285**, 35386–35392.
- Czeisler, C.A., Kronauer, R.E., Allan, J.S., Duffy, J.F., Jewett, M.E., Brown, E.N., & Ronda, J.M. (1989) Bright Light Induction of Strong (Type 0) Resetting of the Human Circadian Pacemaker. *Science*, **244**, 1328–1333.
- Dahlhaus, M., Li, K.W., van der Schors, R.C., Saiepour, M.H., van Nierop, P., Heimel, J.A., Hermans, J.M., Loos, M., Smit, A.B., & Levelt, C.N. (2011) The synaptic proteome during development and plasticity of the mouse visual cortex. *Mol Cell Proteomics*, **10**, M110.005413.
- Dardente, H., Poirel, V.-J., Klosen, P., Pévet, P., & Masson-Pévet, M. (2002) Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res*, **958**, 261–271.
- de Vries, M.J., Nunes Cardozo, B., van der Want, J., de Wolf, A., & Meijer, J.H. (1993) Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Res*, **612**, 231–237.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., & Reppert, S.M. (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosci.*, **10**, 543–545.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, T.F., Agid, T.Y., Jenner, P., & Marsden, C.D. (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **52**, 1830–1836.
- Ding, J.M., Faiman, L.E., Hurst, W.J., Kuriashkina, L.R., & Gillette, M.U. (1997) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci*, **17**, 667–675.
- Ding, J.M., Webber, T.E., Faiman, L.E., Rea, M.A., & Gillette, M.U. (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*, **266**, 1713–1717.
- Doi, M., Ishida, A., Miyake, A., Sato, M., Komatsu, R., Yamazaki, F., Kimura, I., Tsuchiya, S., Kori, H., Seo, K., Yamaguchi, Y., Matsuo, M., Fustin, J.-M., Tanaka, R., Santo, Y., Yamada, H., Takahashi, Y., Araki, M., Nakao, K., Aizawa, S., Kobayashi, M., Obrietan, K., Tsujimoto, G., & Okamura, H. (2011) Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.*, **2**, 327.

- Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., & Virshup, D.M. (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . *J. Biol. Chem.*, **277**, 17248–17254.
- Eide, E.J., Woolf, M.F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E.L., Giovanni, A., & Virshup, D.M. (2005) Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI ϵ -Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2795–2807.
- Etcheagaray, J.-P., Yu, E.A., Indic, P., Dallmann, R., & Weaver, D.R. (2010) Casein kinase 1 Delta (CK1 δ) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One*, **5**, e10303.
- Evers, S.M., Hendricks, K.R., Kott, J.N., Lee, M.E., Gregov, M.E., & Westrum, L.E. (1996) Recovery of olfactory function in thirteen-day-old rats after olfactory bulb transplantation but not after olfactory bulb ablation. *Brain Res*, **724**, 129–135.
- Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., & Maffei, L. (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res.*, **34**, 709–720.
- Fang, M., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., & Snyder, S.H. (2000) Dexas1: a G Protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron*, **28**, 183–193.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M., & Hastings, M.H. (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, **25**, 437–447.
- Friedman, B. & Price, J.L. (1986) Plasticity in the olfactory cortex: age-dependent effects of deafferentation. *J Comp Neurol*, **246**, 1–19.
- Gamlin, P.D.R., McDougal, D.H., Pokorny, J., Smith, V.C., Yau, K.-W., & Dacey, D.M. (2007) Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Res.*, **47**, 946–954.
- Gao, H., Gao, Y., Li, X., & Shen, A. (2010) Spatiotemporal Patterns of Dexamethasone-Induced Ras Protein 1 Expression in the Central Nervous System of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Mol Neurosci*, **41**, 198–209.
- Garrick, M.D., Kuo, H.-C., Vargas, F., Singleton, S., Zhao, L., Smith, J.J., Paradkar, P., Roth, J.A., & Garrick, L.M. (2006) Comparison of mammalian cell lines expressing distinct isoforms of divalent metal transporter 1 in a tetracycline-regulated fashion. *Biochem J*, **398**, 539–546.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., & Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, **280**, 1564–1569.
- Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M., & Otulakowski, G. (1994) Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.*, **8**, 538–553.
- Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M.A., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S., & Greenberg, M.E. (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, **260**, 238–241.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., & Saper, C.B. (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.*, **4**, 1165.
- Graham, T.E., Key, T.A., Kilpatrick, K., & Dorin, R.I. (2001) Dexas1/AGS-1, a steroid hormone-induced guanosine triphosphate-binding protein, inhibits 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-stimulated secretion in AtT-20 corticotroph cells. *Endocrinology*, **142**, 2631–2640.
- Graham, T.E., Prossnitz, E.R., & Dorin, R.I. (2002) Dexas1/AGS-1 inhibits signal transduction from the Gi-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 10876–10882.
- Graham, T.E., Qiao, Z., & Dorin, R.I. (2004) Dexas1 inhibits adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **316**, 307–312.
- Granados-Fuentes, D., Saxena, M.T., Prolo, L.M., Aton, S.J., & Herzog, E.D. (2004) Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 898–906.
- Greenough, W.T., Black, J.E., & Wallace, C.S. (1987) Experience and brain development. *Child*

- Dev.*, **58**, 539–559.
- Greenwood, M.P., Greenwood, M., Mecawi, A.S., Antunes-Rodrigues, J., Paton, J.F.R., & Murphy, D. (2016) Rasd1, a small G protein with a big role in the hypothalamic response to neuronal activation. *Mol. Brain*, **9**, 1.
- Griffin, E.A., Staknis, D., & Weitz, C.J. (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, **286**, 768–772.
- Gubin, D.G., Weinert, D., Rybina, S. V., Danilova, L.A., Solovieva, S. V., Durov, A.M., Prokopiev, N.Y., & Ushakov, P.A. (2017) Activity, sleep and ambient light have a different impact on circadian blood pressure, heart rate and body temperature rhythms. *Chronobiol Int.*, **34**, 632–649.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms*, **20**, 391–403.
- Gutteridge, J.M.C. (1994) Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **738**, 201–213.
- Hahnová, K., Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Žurmanová, J., & Bendová, Z. (2016) Circadian Dexas1 in rats: development, location and responsiveness to light. *Chronobiol. Int.*, **33**, 141–150.
- Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U., & Mikkelsen, J.D. (1997) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci*, **17**, 2637–2644.
- Hannibal, J., Jamen, F., Nielsen, H.S., Journot, L., Brabet, P., & Fahrenkrug, J. (2001) Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *J Neurosci*, **21**, 4883–4890.
- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O.P., & Fahrenkrug, J. (2000) PACAP and Glutamate Are Co-Stored in the Retinohypothalamic Tract. *J. Comp. Neurol.*, **155**, 147–155.
- Hard, M.L., Abdolell, M., Robinson, B.H., & Koren, G. (2005) Gene-expression analysis after alcohol exposure in the developing mouse. *J Lab Clin Med*, **145**, 47–54.
- Harrison, L.M. & He, Y. (2011) Rhes and AGS1/Dexas1 affect signaling by dopamine D1 receptors through adenylyl cyclase. *J Neurosci Res.*, **89**, 874–882.
- Hasler, B.P., Buysse, D.J., Kupfer, D.J., & Germain, A. (2010) Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression. *Psychiatry Res*, **178**, 205–207.
- Hastings, M.H., Field, M.D., Maywood, E.S., Weaver, D.R., & Reppert, S.M. (1999) Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci*, **19**, 1–7.
- Hirsch, E.C., Brandel, J.-P., Galle, P., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J. Neurochem.*, **56**, 446–451.
- Cha, J.Y., Kim, H.J., Yu, J.H., Xu, J., Kim, D., Paul, B.D., Choi, H., Kim, S., Lee, Y.J., Ho, G.P., Rao, F., Snyder, S.H., & Kim, J.-W. (2013) Dexas1 mediates glucocorticoid-associated adipogenesis and diet-induced obesity. *PNAS*, **110**, 20575–20580.
- Cheah, J.H., Kim, S.F., Hester, L.D., Clancy, K.W., Patterson, S.E., Papadopoulos, V., & Snyder, S.H. (2006) NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*, **51**, 431–440.
- Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J., & Gillette, M.U. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *PNAS*, **96**, 13468–13473.
- Chen, Y., Khan, R.S., Cwanger, A., Song, Y., Steenstra, K., Bang, S., Cheah, J.H., Dunaief, J., Shindler, K.S., Snyder, S.H., & Kim, S.F. (2013) Dexas1, a small GTPase, is required for glutamate-NMDA neurotoxicity. *J Neurosci*, **33**, 3582–3587.
- Chen, Y., Mathias, L., Falero-Perez, J.M., & Kim, S.F. (2015) PKA-mediated phosphorylation of Dexas1 suppresses iron trafficking by inhibiting S-nitrosylation. *FEBS Lett.*, **589**, 3212–

- Cheng, H.-Y.M., Dziema, H., Papp, J., Mathur, D.P., Koletar, M., Ralph, M.R., Penninger, J.M., & Obrietan, K. (2006) The molecular gatekeeper *Dexas1* sculpts the photic responsiveness of the mammalian circadian clock. *J Neurosci*, **26**, 12984–12995.
- Cheng, H.-Y.M., Obrietan, K., Cain, S.W., Lee, B.Y., Agostino, P. V., Joza, N.A., Harrington, M.E., Ralph, M.R., Penninger, J.M., Avenue, W., Street, S.G., & Ms, O. (2004) *Dexas1* potentiates photic and suppresses nonphotic responses of the circadian clock. *Neuron*, **43**, 715–728.
- Illnerová, H., Vaněček, J., & Hoffmann, K. (1989) Different mechanisms of phase delays and phase advances of the circadian rhythm in rat pineal N-acetyltransferase activity. *J Biol Rhythm.*, **4**, 187–200.
- Jaffrey, S.R., Fang, M., & Snyder, S.H. (2002) Nitrosopeptide mapping: a novel methodology reveals S-nitrosylation of *Dexas1* on a single cysteine residue. *Chem. Biol.*, **9**, 1329–1335.
- Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J.L., Cohen, N.A., & Snyder, S.H. (1998) CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*, **20**, 115–124.
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., De Vries, G.J., & Reppert, S.M. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, **96**, 57–68.
- Kalsbeek, A., la Fleur, S., & Fliers, E. (2014) Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab*, **3**, 372–383.
- Kalsbeek, A., La Fleur, S., Van Heijningen, C., & Buijs, R.M. (2004) Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J. Neurosci.*, **24**, 7604–7613.
- Kawaguchi, C., Tanaka, K., Isojima, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., & Nagai, K. (2003) Changes in light-induced phase shift of circadian rhythm in mice lacking PACAP. *Biochem Biophys Res Commun*, **310**, 169–175.
- Kempainen, R.J. & Behrend, E.N. (1998) Dexamethasone rapidly induces a novel Ras gene in AtT-20 cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3129–3131.
- Kempainen, R.J., Cox, E., Behrend, E.N., Brogan, M.D., & Ammons, J.M. (2003) Identification of a glucocorticoid response element in the 3'-flanking region of the human *Dexas1* gene. *Biochim Biophys Acta*, **1627**, 85–89.
- Kim, H.-S., Kim, E.-M., Lee, J.-P., Park, C.H., Kim, S., Seo, J.-H., Chang, K.-A., Yu, E., Jeong, S.-J., Chong, Y.H., & Suh, Y.-H. (2003) C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression. *FASEB J*, **17**, 1951–1953.
- Kim, H.J., Cha, J.Y., Seok, J.W., Choi, Y., Yoon, B.K., Choi, H., Yu, J.H., Song, S.J., Kim, A., Lee, H., Kim, D., Han, J.Y., & Kim, J.-W. (2016) *Dexas1* links glucocorticoids to insulin-like growth factor-1 signaling in adipogenesis. *Sci Rep*, **6**, 28648.
- Koletar, M.M., Cheng, H.-Y.M., Penninger, J.M., & Ralph, M.R. (2011) Loss of *dexas1* alters nonphotic circadian phase shifts and reveals a role for the intergeniculate leaflet (IGL) in gene-targeted mice. *Chronobiol Int.*, **28**, 553–562.
- Kornau, H.-C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., & Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**, 1737–1740.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., & Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193–205.
- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F., Levi, R., & Novogrodsky, A. (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7017–7020.
- Lau, K.F., Chan, W.M., Perkinson, M.S., Tudor, E.L., Chang, R.C.C., Chan, H.Y.E., McLoughlin, D.M., & Miller, C.C.J. (2008) *Dexas1* interacts with FE65 to regulate FE65-amyloid precursor protein-dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, **283**, 34728–34737.
- Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S., & Lee, C. (2009) Essential roles of CKI δ and CKI ϵ in the mammalian circadian clock. *PNAS*, **106**, 21359–21364.

- Lendvai, B., Stern, E.A., Chen, B., & Svoboda, K. (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*, **404**, 876–881.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.-M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S., Woodgett, J.R., & Miller, C.C.J. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol.*, **4**, 1077–1086.
- Majewska, A. & Sur, M. (2003) Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation. *PNAS*, **100**, 16024–16029.
- Medini, P. & Pizzorusso, T. (2008) Visual experience and plasticity of the visual cortex: a role for epigenetic mechanisms. *Front Biosci*, **13**, 3000–3007.
- Moore, R.Y. & Card, J.P. (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*, **344**, 403–430.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., & Card, J.P. (1995) The retinohypothalamic tract originates from distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, 351–366.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., & Leak, R.K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.*, **309**, 89–98.
- Moore, R.Y., Weis, R., & Moga, M.M. (2000) Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, **420**, 398–418.
- Nguyen, C.H. & Watts, V.J. (2005) Dexras1 blocks receptor-mediated heterologous sensitization of adenylyl cyclase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 913–920.
- Nguyen, C.H. & Watts, V.J. (2006) Dexamethasone-induced Ras protein 1 negatively regulates protein kinase C δ : implications for adenylyl cyclase 2 signaling. *Mol Pharmacol*, **69**, 1763–1771.
- Nishimura, Hi., Hashikawa, K., Doi, K., Iwaki, T., Watanabe, Y., Kusuoka, H., Nishimura, T., & Kubo, T. (1999) Sign language “heard” in the auditory cortex. *Nature*, **397**, 1999.
- O'Neill, J.S. & Reddy, A.B. (2011) Circadian clocks in human red blood cells. *Nat Rev Neurosci*, **469**, 498–503.
- Obrietan, K., Impey, S., & Storm, D.R. (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci*, **1**, 693–700.
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., & Honma, K. (2002) Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci*, **15**, 1953–1960.
- Olson, C.R. & Freeman, R.D. (1980) Profile of the sensitive period for monocular deprivation in kittens. *Exp Brain Res*, **39**, 17–21.
- Ong, S.A., Tan, J.J., Tew, W.L., & Chen, K.-S. (2011) Rasd1 modulates the coactivator function of NonO in the cyclic AMP pathway. *PLoS One*, **6**, e24401.
- Ota, Y., Ago, Y., Tanaka, T., Hasebe, S., Toratani, Y., Onaka, Y., Hashimoto, H., Takuma, K., & Matsuda, T. (2015) Anxiolytic-like effects of restraint during the dark cycle in adolescent mice. *Behav Brain Res*, **284**, 103–111.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., & Hogenesch, J.B. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, **109**, 307–320.
- Paxinos, G. (2004) *The Rat Nervous System*, 3rd edn. Academic Press. pp.1328.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2009) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Sixth Edition*, 6th edn. Academic Press. pp. 400.
- Phillips, M. & Tashjian, A.H.J.R. (1982) Characterization of an early inhibitory effect of glucocorticoids on stimulated adrenocorticotropin and endorphin release from a clonal strain of mouse pituitary cells. *Endocrinology*, **110**, 892–900.
- Pittendrigh & Daan (1974) Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science*, **186**, 548–550.
- Preitner, N., Damiola, F., Molina, L.L., 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**, 251–260.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., & Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, **247**, 975–978.

- Ralph, M.R. & Menaker, M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, **241**, 1225–1227.
- Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C., & McKnight, S.L. (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*, **293**, 506–509.
- Reid, S.N.M., Daw, N.W., Gregory, D.S., & Flavin, H. (1996) cAMP levels increased by activation of metabotropic glutamate receptors correlate with visual plasticity. *J Neurosci*, **16**, 7619–7626.
- Reppert, S.M. & Schwartz, W.J. (1984) The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci*, **4**, 1677–1682.
- Ruan, G.-X., Zhang, D.-Q., Zhou, T., Yamazaki, S., & McMahon, D.G. (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *PNAS*, **103**, 9703–9708.
- Sadato, N., Pascual-Leone, A., Grafman, J., Ibañez, V., Deiber, M.-P., Dold, G., & Hallett, M. (1996) Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature*, **380**, 526–528.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L.M., Nuñez, M.T., Garrick, M.D., Raisman-Vozari, R., & Hirsch, E.C. (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *PNAS*, **105**, 18578–18583.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H., & Reppert, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, **288**, 1013–1019.
- Shivers, B.D., Görös, T.J., Gottschall, P.E., & Arimura, A. (1991) Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology*, 3055–3065.
- Schmutz, I., Ripperger, J.A., Baeriswyl-Aebischer, S., & Albrecht, U. (2010) The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev.*, **24**, 345–357.
- Schwendt, M. & McGinty, J.F. (2010) Amphetamine up-regulates activator of G-protein signaling 1 mRNA and protein levels in rat frontal cortex: the role of dopamine and glucocorticoid receptors. *Neuroscience*, **168**, 96–107.
- Sieppka, S.M., Yoo, S.-H., Park, J., Lee, C., & Takahashi, J.S. (2007) Genetics and Neurobiology of Circadian Clocks in Mammals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 251–259.
- Stephan, F.K. & Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *PNAS*, **69**, 1583–1586.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H., & Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, **417**, 78–83.
- Takahashi, H., Umeda, N., Tsutsumi, Y., Fukumura, R., Ohkaze, H., Sujino, M., van der Horst, G., Yasui, A., Inouye, S.-I.T., Fujimori, A., Ohhata, T., Araki, R., & Abe, M. (2003) Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Mol. Brain Res.*, **110**, 1–6.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., & Yamaguchi, H. (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25 – 35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.*, **31**, 317–323.
- Takeda, Y., Jothi, R., Birault, V., & Jetten, A.M. (2012) ROR γ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8519–8535.
- Takesono, A., Nowak, M.W., Cismowski, M., Duzic, E., & Lanier, S.M. (2002) Activator of G-protein signaling 1 blocks GIRK channel activation by a G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13827–13830.
- Thomas, M. & Jankovic, J. (2004) Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. *Curr Opin Neurol*, **17**, 437–442.
- Tosini, G., Davidson, A.J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., & Castanon-Cervantes, O. (2007) Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J*, **21**, 3866–3871.

- Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., & Sassone-Corsi, P. (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *PNAS*, **99**, 7728–7733.
- Vaidyanathan, G., Cismowski, M.J., Wang, G., Vincent, T.S., Brown, K.D., & Lanier, S.M. (2004) The Ras-related protein AGS1/RASD1 suppresses cell growth. *Oncogene*, **23**, 5858–5863.
- Van den Pol, A.N. (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol. J.*, **191**, 661–702.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.-H., & Virshup, D.M. (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I ϵ . *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4888–4899.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S., & Sancar, A. (1999) Differential regulation of mammalian Period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *PNAS*, **96**, 12114–12119.
- von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., & Konietzko, U. (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*, **117**, 4435–4448.
- White, R.S., Bhattacharya, A.K., Chen, Y., Byrd, M., McMullen, M.F., Siegel, S.J., Carlson, G.C., & Kim, S.F. (2016) Lysosomal iron modulates NMDA receptor-mediated excitation via small GTPase, Dexas1. *Mol. Brain*, **9**, 38.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682–685.
- Yu, W., Nomura, M., & Ikeda, M. (2002) Interactivating Feedback Loops within the Mammalian Clock: BMAL1 Is Negatively Autoregulated and Upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **941**, 933–941.
- Zhang, L.I., Bao, S., & Merzenich, M.M. (2002) Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *PNAS*, **99**, 2309–2314.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., & Reppert, S.M. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, **20**, 1103–1110.