

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Bakalářská práce

Periferní cirkadiánní hodiny savců, jejich  
molekulární mechanismus a synchronizace

Lenka Polidarová

V Praze 2006

vedoucí práce  
PharmDr. Alena Sumová, CSc.

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat mojí školitelce PharmDr. Aleně Sumové, CSc. za její odborné vedení při sepisování této práce. Děkuji také mému kolegovi z laboratoře neurohumorálních regulací Martinovi Sládkovi za jeho cenné teoretické a praktické rady. Děkuji rodině a přátelům za jejich podporu. Velký dík patří mojí kamarádce Tereze Köppelové za přečtení primární verze tohoto textu.

## Abstrakt

Obecným cílem této bakalářské práce je shrnout základní poznatky o fungování biologických hodin uvnitř živých organismů, s podrobnějším zaměřením na jejich roli v periferních orgánech savců.

U savců se centrální oscilátor nachází v suprachiasmatických jádrech předního hypothalamu. Centrální oscilátor je vstupními signály, především světelnými, synchronizován s vnějším prostředím. Výstupní dráhy vedou ze suprachiasmatických jader do různých částí hypothalamu a dalších důležitých oblastí mozku, které regulují četné fyziologické procesy a změny v chování organismu. Kromě suprachiasmatických jader se další oscilátory nacházejí také v periferních orgánech. Periferní oscilátory jsou autonomní, jejich fungování může být odprázněno od centrálního oscilátoru změnou doby příjmu potravy. Periferní orgány neobsahují fotoreceptory, úkolem suprachiasmatických jader je tedy pomocí neuronálních a humorálních signálů synchronizovat jednotlivé periferní oscilátory s vnějšími podmínkami a zajistit vzájemné spřažení fází jejich oscilací.

Základní molekulární mechanismus biologických hodin tvoří tzv. hodinové geny propojené transkripčními/translačními zpětnovazebnými smyčkami. Porozumění buněčnému a molekulárnímu mechanismu biologických hodin může být využito pro léčbu chorob spojených s poruchou cirkadiánního systému.

## Seznam použitých zkratek

Ara-C	-cytosin $\beta$ -D arabinofuranosid
AVP	-arginin vasopresin (z angl. arginin vassopresine)
bHLH	-DNA vazebná doména basic helix-loop-helix
bZIP	-DNA vazebná doména leucinový zip
Ca <sup>2+</sup>	-vápenaté ionty
cAMP	-cyklický adenosinmonofosfát
CCGs	-hodinami kontrolované geny (z angl. clock controlled genes)
cGMP	-cyklický guanosinmonofosfát
CKI $\delta$	-kasein kináza I delta (z angl. casein kinase I delta)
CKI $\epsilon$	-kasein kináza I epsilon (z angl. casein kinase I epsilon)
CLD	-cytoplasmatická lokalizační doména (z angl. cytoplasmatic localization domain)
CREB	-z angl. cAMP response element binding protein
Cry	-Cryptochrome gen
CT	-cirkadiánní čas (z angl. circadian time)
DBP	-albumin D-element vázající protein (z angl. albumin D-element binding protein)
Dbt	-Doubletime gen
DD	-světelný režim stálá tma (z angl. dark-dark)
Dm	-dorsomediální
DMH	-dorsomediální jádro hypothalamu (z angl. dorsomedial hypothalamic nucleus)
ENK	-enkefalin
FASPS	-dědičný syndrom posunutí spánku (z angl. familial advanced sleep phase syndrom)
Frq	-Frequency gen
GABA	-kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC	-guanylát cykláza
GHT	-genikulohypothalamický trakt
GRP	-gastrin uvolňující peptid (z angl. gastrin releasing peptide)
HLF	-z angl. hepatic leukocyte factor
IEG	-okamžitý časný gen (z angl. immediate early gene)
IGL	-intergenikulární listek thalamu

Kpb	-kilopárů bází
LD	-světelný režim světlo-tma (z angl. light-dark)
LL	-světelný režim stálé světlo (z angl. light-light)
MAP kináza	-mitogeny aktivovaná protein kináza (z angl. mitogen activated protein kinase)
mRNA	-messenger ribonukleová kyselina
NAD(P) <sup>+</sup>	-oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidů
NAD(P)H	-redukováná forma nikotinamid adenin dinukleotidů
NAT	-N-acetyltransferáza
NMDA	-N-methyl-D-aspartát
NO	-oxid dusnatý
NPAS2	-z angl. neuronal PAS domain protein 2
NPY	-neuropeptid Y
PACAP	-hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (z angl. pituitary adenylate cyclase-activating peptide)
PAS	-akronym názvů tří proteinů PER, ARNT, SIM
Per	-Period gen
PER2::LUC	-PERIOD2::LUCIFERÁZA
PKC	-protein kináza C
PRC	-fázově responzní křivka (z angl. phase response curve)
PVN	-paraventriculární jádro hypothalamu (z angl. paraventricular nucleus of the hypothalamus)
RF	-z angl. restricted feeding
RHT	-retinohypothalamický trakt
RTKs	-tyrozin kinázové receptory (z angl. receptor-tyrosine kinases)
SCN	-suprachiasmatická jádra (z angl. suprachiasmatic nucleus)
SP	-substance P
$\tau$ (tau)	-vnitřní perioda oscilátoru
TEF	-z angl. thyrotropic embryonic factor
Tim	-Timeless gen
VIP	-vasointestinální peptid (z angl. vasoactive intestinal polypeptide)
VI	-ventrolaterální

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. BIOLOGICKÉ RYTMY</b> .....	<b>7</b>
<b>3. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM</b> .....	<b>9</b>
3.1. SUPRACHASMATICKÁ JÁDRA (SCN) .....	9
3.2. VSTUPNÍ A VÝSTUPNÍ DRÁHY CENTRÁLNÍHO OSCILÁTORU.....	10
<b>4. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ</b> .....	<b>12</b>
4.1. STRUKTURNÍ MOTIVY HODINOVÝCH GENŮ .....	13
4.2. OBECNÉ SCHÉMA .....	13
<b>5. HODINOVÉ GENY</b> .....	<b>15</b>
5.1. PERIOD GENY.....	15
5.2. CRYPTOCHROME GENY .....	17
5.3. CLOCK GEN.....	17
5.4. BMAL1 GEN .....	18
5.5. KASEIN KINÁZA I EPSILON .....	19
5.6. HODINAMI KONTROLOVANÉ GENY (CCGs) .....	20
<b>6. PERIFERNÍ ORGÁNY</b> .....	<b>21</b>
6.1. SYNCHRONIZACE PERIFERNÍCH ORGÁNŮ ZMĚNOU SVĚTELNÝCH PODMÍNEK .....	23
6.2. SYNCHRONIZACE PERIFERNÍCH ORGÁNŮ PŘÍJMEM POTRAVY .....	24
6.3. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM V REÁLNÉM SVĚTĚ .....	27
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>28</b>
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	29

# 1. Úvod

Všechny živé organismy jsou vystaveny neustále se měnícím podmínkám vnějšího prostředí. U všech organismů také dochází k pravidelným změnám vnitřního prostředí těla. Chronobiologie je obor fyziologie zabývající se zkoumáním periodických změn v živých organismech. Tyto změny jsou známy jako biologické rytmy. Za nejdůležitější biologické rytmy jsou považovány rytmy cirkadiánní, jejichž perioda je přibližně 24 hodin. Cirkadiánní oscilace jsou generovány centrálním oscilátorem uloženým v suprachiasmatických jádrech hypothalamu, další oscilátory nalezneme i v periferních orgánech. Základní princip vzniku cirkadiánních oscilací je založen na rytmické expresi tzv. hodinových genů. S objevem hodinových genů v 90. letech minulého století je spojeno výrazné zvýšení zájmu o tento obor. Výjimečný rozvoj chronobiologie je umožněn využitím moderních metod molekulární biologie. Velký důraz je kladen na odhalení vzájemných vztahů oscilátorů a mechanismu jejich synchronizace s vnějším prostředím.

## 2. Biologické rytmy

Biologické rytmy se rozdělují podle délky periody do tří skupin:

- a) ultradiánní rytmy mají periodu výrazně kratší než 24 hodin, patří sem například dýchací rytmus, rytmy v srdeční a nervové činnosti a další;
- b) cirkadiánní rytmy mají periodu přibližně 24 hodin, sem patří rytmus spánku a bdění, rytmus v pohybové aktivitě, rytmus v tělesné teplotě, rytmus v hladině hormonů v krvi apod.;
- c) infradiánní rytmy mají periodu výrazně delší než 24 hodin, patří mezi ně menstruační a estrální rytmus a další (Illnerová, 1995).

Rytmem nazýváme jev, kdy libovolná biologická proměnná opakovaně prochází určitou hodnotou. Perioda je doba mezi opuštěním a návratem rytmu do stejné fáze (Illnerová, 1995). Fáze rytmu je okamžitý stav proměnné. Amplituda je hodnota označující polovinu rozdílu mezi maximem a minimem daného rytmu (Ali *et al.*, 1992).

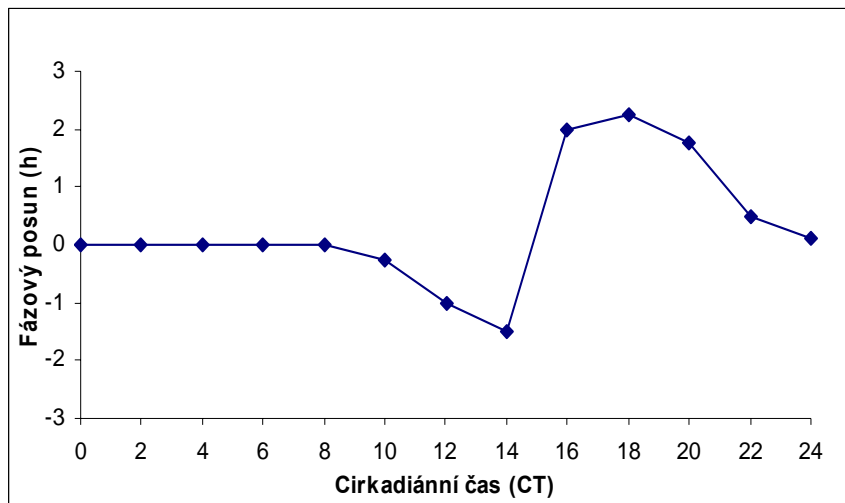
Cirkadiánní rytmy jsou rytmy endogenní. Jsou řízeny vnitřním oscilátorem neboli pacemakerem. Přetrvávají i ve zcela neperiodických podmínkách, ve kterých volně běží se svojí vnitřní periodou  $\tau$  (tau). Délka periody  $\tau$  je přibližně 24 hodin a je charakteristická pro



každý druh (Illnerová, 1995). Vnitřní, subjektivní čas organismu v neperiodických podmínkách se označuje jako cirkadiánní čas (circadian time, CT). Cirkadiánní hodina je dlouhá  $\tau/24$  hodin. CT0 – CT12 označuje subjektivní den, CT12 – CT24 označuje subjektivní noc. Světelný režim, kterému je organismus vystaven, může být světlo-tma (light-dark, LD), stálá tma (dark-dark, DD) nebo stálé světlo (light-light, LL) (Ali *et al.*, 1992).

Za běžných podmínek je  $\tau$  synchronizována s 24 hodinovým dnem hlavně prostřednictvím střídání světla a tmy (Wisor, 2002). Dalšími vnějšími synchronizátory (Zeitgeber) mohou být vnější teplotní rytmus, pohybová aktivita, sociální faktory a farmakologicky účinné látky (Illnerová, 1995). Pro periferní oscilátory je nejdůležitějším synchronizátorem příjem potravy (Schibler *et al.*, 2003).

Vystavíme-li oscilátor působení světla, dojde k fázovému posunu rytmu. Velikost fázového posunu, jako důsledek vystavení oscilátoru světelnému pulzu, je vyjadřována pomocí fázově responzní křivky (phase response curve, PRC) (Takahashi *et al.*, 1984). Světelný stimul aplikovaný v první polovině subjektivní noci vyvolá fázové zpoždění (phase delay) oscilátoru. Naopak pokud vystavíme oscilátor světelnému stimulu během druhé poloviny noci, dojde k fázovému předběhnutí (phase advance). Osvětlení během subjektivního dne nevyvolá žádnou změnu ve fázi oscilátoru (Illnerová, 1995). (viz obr. 1)



**Obr. 1:** Fázově responzní křivka (PRC). Na ose x je znázorněna doba aplikace světelného pulzu. Na ose y je vyznačena velikost fázového posunu (kladné hodnoty označují fázové předběhnutí, záporné hodnoty označují fázové zpoždění oscilátoru). Zpracováno dle údajů z literatury.

Perioda cirkadiánních rytmů zůstává téměř nezměněna v širokém teplotním rozmezí, je tedy teplotně kompenzována.

Cirkadiánní rytmy tedy vykazují následující charakteristické znaky: jsou to rytmy endogenní, které přetrvávají i ve zcela neperiodických podmínkách, mohou být synchronizovány pomocí vnějšího světelného režimu a jejich perioda je teplotně kompenzována (Menaker et Wiesner, 1983).

### 3. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém se skládá z centrálního pacemakeru uloženého v mozku, z vstupních a výstupních drah a periferních oscilátorů v různých tělních tkáních. Periferní oscilátory jsou autonomní, ale vyžadují centrální pacemaker k tomu, aby mohly být navzájem synchronizovány a také synchronizovány s vnějším světelným režimem (Balsalobre, 2002).

Pacemaker je synchronizován vnějšími vstupními signály a generuje denní výstupní rytmy v chování a fyziologické aktivitě.

#### 3.1. Suprachiasmatická jádra (SCN)

U savců je centrální pacemaker umístěn v suprachiasmatických jádrech (nucleus suprachiasmaticus, SCN) předního hypothalamu. SCN je párový orgán nacházející se dorsálně od optického chiasma a laterálně od třetí mozkové komory (Leak *et al.*, 1999). Každé ze suprachiasmatických jader obsahuje shluky asi 10 000 neuronů. Většina z těchto neuronů vykazuje individuální rytmus v elektrické aktivitě a může být tudíž považována za samostatný oscilátor. Jednotlivé neurony jsou synchronizovány pomocí akčních potenciálů neuronálních synapsí a humorálních signálů. Celá suprachiasmatická jádra vykazují cirkadiánní oscilace v elektrické a metabolické aktivitě *in vivo* i *in vitro* (Welsh *et al.*, 1995). Provedení léze SCN vede ke ztrátě schopnosti generovat cirkadiánní rytmy. Obnovit tuto schopnost lze transplantací fetálních nepoškozených SCN zvířatům s provedenou lézí. Výsledkem je obnovení rytmicity u recipienta. Cirkadiánní rytmy recipienta však budou probíhat s fází dárce (Silver et Schwartz, 2005).

SCN se skládá ze dvou odlišných částí. Z ventrolaterální části (vlSCN) nazývané „core“ a z dorsomediální části (dmSCN) nazývané „shell“. Obě tyto části i obě suprachiasmatická jádra jsou vzájemně propojeny oboustrannými synapsemi. Pokusy

s herpesvirem jako nástrojem pro transsynaptickou analýzu prokázaly, že signály jsou vedeny silněji ve směru z ventrolaterální části do dorsomediální (Leak *et al.*, 1999). Pro ventrolaterální část je charakteristická produkce vasoaktivního intestinálního peptidu (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) a gastrin uvolňovacího peptidu (gastrin releasing peptide, GRP). Pro dorsomediální část je charakteristická produkce arginin vasopresinu (arginin vasopressine, AVP). Navzdory rozdílům v produkci hormonů se zdá, že všechny neurony SCN produkují kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) (Moore et Speh, 1993).

Kromě elektrické aktivity neuronů a syntézy peptidů je vhodným markerem pro sledování rytmicity také tvorba melatoninu. Melatonin je syntetizován pomocí enzymu N-acetyltransferázy (NAT) v šišince (epifýze). Jeho hladina dosahuje maximálních hodnot během subjektivní noci. V SCN byly objeveny s G-proteiny spojené receptory Mel 1a a Mel 1b, na které se melatonin váže. Melatonin působí na SCN dvěma efekty. Skrze Mel 1a receptory inhibuje neuronální aktivitu. Skrze Mel 1a i Mel 1b receptory způsobuje fázové posunutí pacemakeru (Liu *et al.*, 1997). Pomocí aplikace melatoninu lze nastavovat a synchronizovat vnitřní biologické hodiny. Podávání melatoninu zvečera způsobí předběhnutí pacemakeru, podávání melatoninu zrána způsobí zpoždění biologických hodin. Obecně melatonin informuje o vnitřním biologickém čase, nastavuje a synchronizuje biologické hodiny, zlepšuje kvalitu spánku atd. (Illnerová, 1996).

Nejvýznamnějším markerem cirkadiánní rytmicity je sledování exprese tzv. hodinových genů (clock genes), kterým se budu podrobněji věnovat v dalších kapitolách.

### **3.2. Vstupní a výstupní dráhy centrálního oscilátoru**

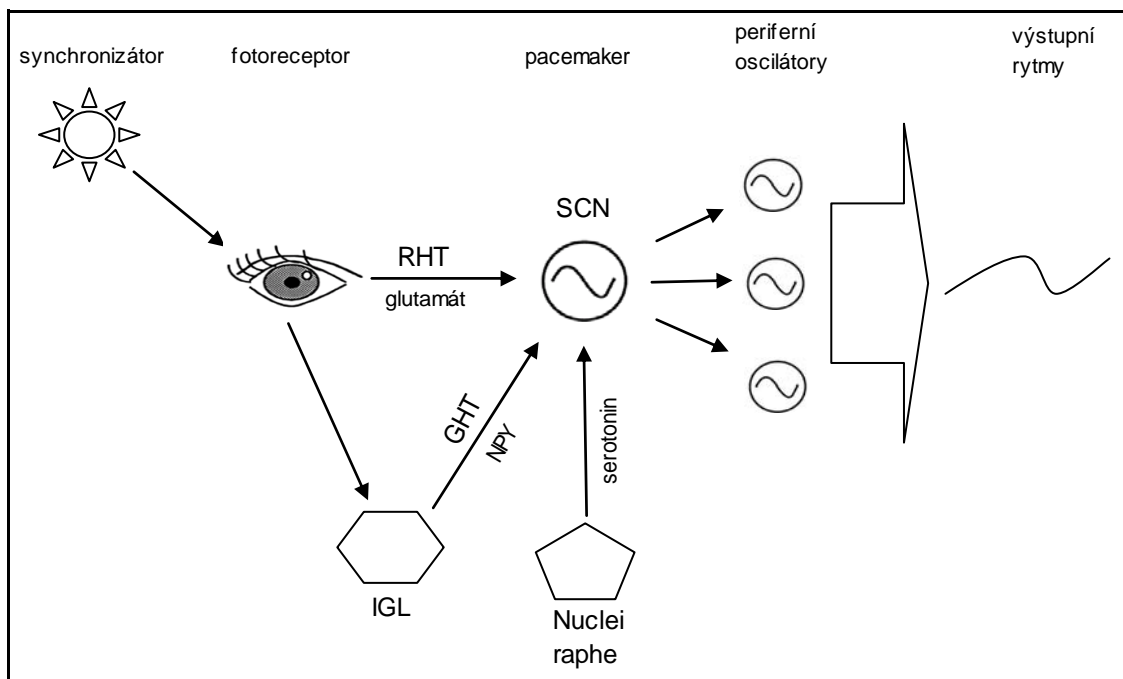
Suprachiasmatická jádra jsou synchronizována s vnějším 24 hodinovým dnem třemi cestami:

Přímý světelný signál je veden ze sítnice (retina) retinohypothalamickým traktem (RHT) do ventrolaterální části SCN. Hlavním mediátorem přenosu je zde glutamát. RHT obsahuje také hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (pituitary adenylate cyclase-activating peptide, PACAP) a substanci P (SP), které modulují synchronizační proces (Chen *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 1999).

Signál je nepřímě veden z retiny do intergenikulárního listku thalamu (IGL) a odtud genikulohypothalamickým traktem (GHT) do vlSCN. Mediátorem přenosu je zde neuropeptid Y (NPY). Dalšími uplatňujícími se zde peptidy jsou kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) a enkefalin (ENK) (Morin et Blanchard, 1995).

Třetí signál je veden také nepřímou. Z Nuclei raphe středního mozku do vlSCN. Neurotransmitterem je zde serotonin (Leak *et al.*, 1999).

Díky těmto signálům může SCN generovat cirkadiální rytmy synchronizované s vnějším 24 hodinovým dnem. Výstupní dráhy vedou ze SCN do hypothalamu a dalších důležitých oblastí mozku, které regulují mnohé fyziologické procesy a změny v chování (Silver et Schwartz, 2005). (viz obr. 2)



**Obr. 2:** Cirkadiální systém savců. SCN (suprachiasmatická jádra), RHT (retinohypothalamic trakt), IGL (intergenikulární lístek), GHT (genikulohypothalamic trakt), NPY (neuropeptid Y) a další hlavní neurotransmitery synchronizačních drah. Zpracováno dle údajů z literatury.

Jako odpověď na světlo v první polovině noci způsobující fázové zpoždění oscilátoru glutamát působí přes N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a spouští MAP kinázovou (mitogen activated protein kinase) dráhu. Glutamát indukuje vyplavení intracelulárních vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Vápník navázaný na kalmodulin pomáhá aktivovat MAP kinázu, která je zodpovědná za fosforylaci cAMP response element-binding protein (CREB). CREB indukuje genovou expresi navázáním na CRE element v promotoru genu. Indukce genové exprese světelným podnětem v druhé polovině noci spočívá v glutamátě zvýšené produkci oxidu dusnatého (NO). Ten aktivuje guanylát cyklázu (GC) zodpovědnou za zvýšení

cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), následnou aktivaci cGMP-dependentní protein kinázy a fosforylaci CREB (Gillette et Tischkau, 1999). Indukcí světlem se spouští např. exprese okamžitého časného genu (immediate early gene, IEG) c-fos (Kornhauser *et al.*, 1990).

Pro savce, zvláště pro člověka, jsou oči a sítnice nezbytné pro synchronizaci s vnějším světelným režimem. Sítnice obsahuje tyčinky, čípky a gangliové buňky. Tyčinky a čípky jsou zodpovědné za vizuální fotorecepci. Při ztrátě tyčinek a čípků je organismus slepý, ale díky gangliovým buňkám retiny si zachovává schopnost nevizuální fotorecepce. Gangliové buňky obsahují fotopigment melanopsin, který je zodpovědný právě za tento druh fotorecepce (Panda *et al.*, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, cirkadiální systém se skládá také z periferních oscilátorů uložených v různých tělních tkáních. Cirkadiální oscilace tedy můžeme pozorovat např. v srdci, játrech, plicích, ledvinách, kosterních svalech a dalších periferních orgánech. Existence periferních oscilátorů byla rozpoznána až po identifikaci hodinových genů. Principu fungování a regulace cirkadiálních oscilací v periferních orgánech se budu podrobněji věnovat v samostatné kapitole.

## 4. Molekulární mechanismus cirkadiálních oscilací

Objevení hodinových genů a obecného principu jejich regulace znamenalo velké zvýšení zájmu o studium biologických hodin. Základní molekulární mechanismus cirkadiálních oscilací tvoří transkripční/translační zpětnovazebná smyčka. Mechanismu se účastní hodinové geny a jejich produkty, které představují buď pozitivní nebo negativní element ovlivňující transkripci. U různých organismů najdeme odlišné hodinové geny. U cyanobakterií byl objeven KaiC element jako klíčová komponenta mechanismu buněčných hodin (Dunlap, 1999). U *Drosophily* jsou do regulace transkripce zapojeny pozitivní regulátory dClock, dMall a negativní regulátory dPer, dTim. U savců, konkrétně u myši, se negativní element zpětnovazebné smyčky skládá ze tří homologů dPer genů, mPer1, mPer2, mPer3 a dvou Cry genů, mCry1, mCry2. Pozitivní část smyčky tvoří mCLOCK a mBMAL1 (Shearman *et al.*, 2000). Pozitivní elementy také ovlivňují transkripci hodinami řízených genů (clock controlled genes, CCGs), které generují výstupní rytmy. Patří mezi ně například již dříve zmíněný arginin vasopresin (AVP) a albumin D-element vázající protein

(albumin D-element binding protein, DBP) (Reppert et Weaver, 2001). Molekulárnímu mechanismu oscilací fungujícímu u savců se budu věnovat podrobněji.

#### 4.1. Strukturní motivy hodinových genů

Proteiny uplatňující se v mechanismu zpětnovazebné smyčky jsou charakteristické vlastnictvím strukturního motivu PAS domény. PAS je akronym názvů prvních tří proteinů, u kterých byla tato doména objevena (PER *Drosophily*, lidský ARNT a další protein *Drosophily* SIM). PAS doména má dimerizační funkci. Díky ní mohou proteiny interagovat a tvořit homodimery a heterodimery. Heterodimery CLOCK-BMAL1 se pomocí DNA vazebného motivu basic helix-loop-helix (bHLH) vážou na enhancerové oblasti v promotorech a intronech hodinových genů, tzv. E-boxy (sekvence 5'-CACGTG-3') a pozitivně nebo negativně tak regulují jejich transkripci (Jin *et al.*, 1999). Při zkoumání mPer1 promotoru byla objevena existence sekundárního iniciačního místa, tzv. D-Box, do kterého se vážou transkripční faktory (např. DBP) a usnadňují mCLOCK-mBMAL1 indukovanou transkripci genu (Okamura *et al.*, 2002).

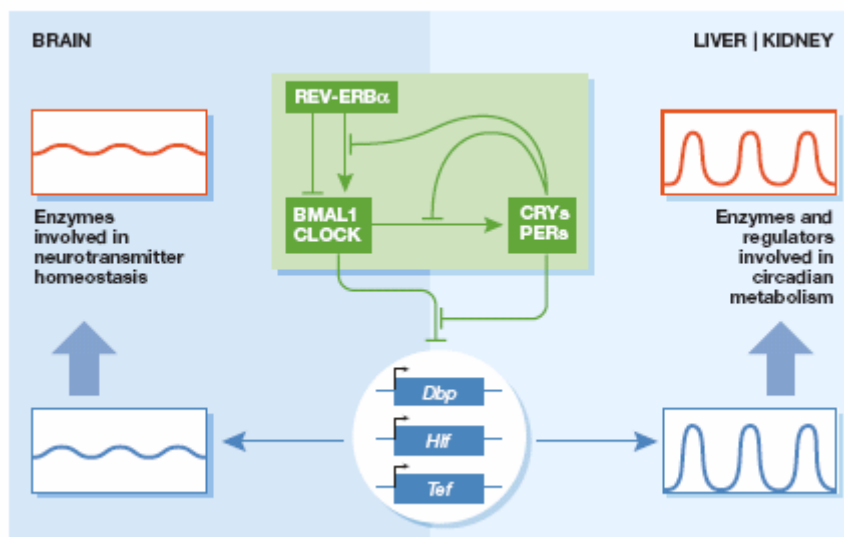
#### 4.2. Obecné schéma

Pozitivní část zpětnovazebné smyčky tvoří proteiny CLOCK a BMAL1 (někdy také nazýván jako MOP3) (Kume *et al.*, 1999). Oba tyto proteiny obsahují PAS doménu a společně tvoří heterodimery. Heterodimery CLOCK-BMAL1 jsou pozitivními regulátory rytmické exprese tří Per genů (Per1-3) a dvou Cry genů (Cry1 a Cry2). Oba tyto geny jsou exprimovány v přibližně stejnou denní dobu, a to zhruba v polovině subjektivního dne (Hastings *et al.*, 2003). Produkty těchto genů jsou zahrnuty v negativní části zpětnovazebné smyčky. Heterodimery CLOCK-BMAL1 se pomocí bHLH DNA vazebného motivu vážou na E-box promotorů těchto genů a indukují jejich transkripci. V cytoplasmě translatované produkty těchto genů, proteiny PER a CRY, tvoří pomocí PAS domény heterodimery a jsou transportovány do jádra. Zde negativně regulují svoji vlastní transkripci tím, že inhibují pozitivní transkripční faktory CLOCK-BMAL1 (Reppert et Weaver, 2001). PER proteiny mají pouze slabou schopnost samy se translokovat do jádra a inhibovat zde transkripční regulátory CLOCK-BMAL1. Esenciální pro tuto negativní regulaci je protein CRY, který se váže na heterodimer CLOCK-BMAL1 a inhibuje tak jeho interakci s promotorem transkribovaného genu. CRY je také nezbytný pro translokaci PER proteinu do jádra. Tyto

vlastnosti CRY proteinu prokázaly i pokusy s reportéřským genem luciferázou (Kume *et al.*, 1999). Exprese genů Per a Cry probíhá v opačné fázi než exprese genu Bmal1. Per a Cry dosahují maxima během subjektivního dne a Bmal1 dosahuje maxima naopak během subjektivní noci (Reppert et Weaver, 2001). Exprese genu Bmal1 je ovlivňována transkripčním faktorem Rev-erb- $\alpha$  (Preitner *et al.*, 2002). REV-ERB- $\alpha$  protein dosahuje maximálních hodnot během světlé části dne. Váže se na RORE DNA sekvenci v promotoru genu Bmal1 a posouvá tím jeho transkripci do nočních hodin. Rev-erb- $\alpha$  tak tvoří další negativní smyčku podílející se na tvorbě cirkadiálních oscilací (Hastings *et al.*, 2003).

Lokalizace a délka života hodinových proteinů během 24 hodinového dne je také ovlivňována jejich posttranskripčními modifikacemi. Koncentrace PER, CLOCK a BMAL1 proteinů je během 24 hodinového dne silně ovlivňována fosforylací. Fosforylace proteinů má vliv na jejich stabilitu a jaderný transport. Ukázalo se, že fosforylace PER1 má zásadní vliv na tvorbu PER-CRY heterodimerů a jejich následnou lokalizaci do jádra. Konkrétně fosforylace urychluje degradaci a zpomaluje transport do jádra. Za fosforylaci PER1 proteinu je zodpovědná kasein kináza I epsilon (CKI $\epsilon$ , savčí ortholog proteinu DOUBLETIME u *Drosophily*). Její homolog kasein kináza I delta (CKI $\delta$ ) má také fosforylační schopnost. Fosforylované PER proteiny tvoří dimery ochotněji než nefosforylované. Naproti tomu CLOCK a BMAL spolu vzájemně interagují ve fosforylované i nefosforylované formě. Fosforylace je tedy velice důležitý jev pro udržení fungování cirkadiálního oscilátoru (Lee *et al.*, 2001).

Také hodinovými geny kontrolované geny (clock controlled genes, CCGs) jsou regulovány na stejném principu zpětnovazebné smyčky jako hodinové geny, což potvrdily pokusy s aktivací transkripce CCGs pro arginin vasopresin (AVP) pomocí CLOCK-BMAL1 heterodimeru. Potvrdilo se tedy spojení mezi základní zpětnovazebnou smyčkou hodinových genů a CCGs, které generují výstupní rytmy (Jin *et al.*, 1999). Stejný mechanismus transkripční/translační zpětnovazebné smyčky hodinových genů a CCGs se uplatňuje i v periferních orgánech. Exprese genů je zde ale zpožděna o 7-11 hodin vůči SCN. Periferní orgány se tedy nacházejí v odlišné fázi než SCN (Yamazaki *et al.*, 2000). (viz obr. 3)



**Obr. 3:** Obecné schéma základního molekulárního mechanismu cirkadiálních oscilací v SCN a v periferních orgánech. Převzato z Schibler 2005.

## 5. Hodinové geny

V 90. letech minulého století byla objevena existence hodinových genů u savců. Ukázalo se, že hodinové geny jsou základním kamenem mechanismu cirkadiálních oscilací.

Hodinové geny byly zkoumány pomocí izolace cirkadiálních mutantů, které měly abnormální délku periody. První hodinový gen savců Clock byl identifikován pomocí pokusů s Clock mutantní myší (King *et al.*, 1997). Ještě předtím byl popsán hodinový gen Frq (frequency) u houby *Neurospora Crassa* (Dunlap, 1999). Cirkadiální systém byl poprvé podrobněji popsán u *Drosophily melanogaster*. Ukázalo se, že jsou v něm zapojeny geny dPer a dTim (timeless), které negativně regulují svoji vlastní transkripci interakcí s dCLOCK-dBMAL1 heterodimery. Homology Per genů *Drosophily* byly objeveny i u savců (Jin *et al.*, 1999). V těle myši mTim neosciluje zcela pravidelně a je exprimován v malém množství. Savčí mTIM protein na rozdíl od mCRY neinteraguje s mPER a netvoří heterodimery (Kume *et al.*, 1999).

### 5.1. Period geny

U savců se vyskytují tři Per geny, mPer1, mPer2 a mPer3. Všechny tři obsahují oblasti, které jsou do určité míry homologní. Protein mPER2 vykazuje 46% homologii



s mPER1 proteinem. Protein mPER3 je ze 37% homologní s mPER1 a mPER2 proteiny (Zylka *et al.*, 1998). Kódující oblast mPer1 genu je dlouhá 16 kpb a skládá se z 23 exonů. 5' promotorová oblast mPer1 genu zahrnuje pět E-Box sekvencí (Hida *et al.*, 2000). Alternativním sestřihem mohou vzniknout dvě rozdílné varianty mPer1 RNA (Yamaguchi *et al.*, 2000). Transkripční jednotka hPer2 genu se skládá z 23 exonů (Toh *et al.*, 2001). Kódující oblast hPer3 genu je dlouhá přibližně 50 kpb a obsahuje 21 exonů (Ebisawa *et al.*, 2001). Všechny tři geny obsahují na 5' konci promotorovou oblast zahrnující E-box sekvenci CACGTG. Na tuto sekvenci se váže heterodimer mCLOCK-mBMAL1 a indukuje transkripci mPer genů (Gekakis *et al.*, 1998). Rytmus v tvorbě mPER proteinů je vůči mRNA zpožděn asi o 4-6 hodin. Všechny PER proteiny obsahují dimerizační PAS doménu, díky níž mohou tvořit homodimery (mPER-mPER) a heterodimery (mPER-mCRY). Proteiny také obsahují cytoplasmatickou lokalizační doménu (cytoplasmatic localization domain, CLD), která napomáhá jejich translokaci do jádra (Okamura *et al.*, 2002). mPER proteiny neobsahují bHLH doménu (Kume *et al.*, 1999). Myši s poškozenými geny mPer1 nebo mPer2 vykazují narušený rytmus v pohybové aktivitě. Můžeme tedy usuzovat, že geny mPer1 a mPer2 jsou nezbytné pro generování cirkadiálních rytmů. Naproti tomu mutace v genu mPer3 nezpůsobuje vážnější změny v tvorbě denních rytmů. Zdá se tedy, že gen mPer3 není pro cirkadiální systém esenciální (Okamura *et al.*, 2002). Exprese mPer3 genu není na rozdíl od exprese mPer1 a mPer2 genů indukovatelná světelným pulzem (Zylka *et al.*, 1998). mPer1 RNA dosahuje maximálních hodnot zhruba v polovině subjektivního dne, v CT4-CT6. mPer2 RNA dosahuje maxima také v průběhu subjektivního dne, v CT8. Gen mPer3 je nejvíce exprimován v čase CT4-CT8. Tyto hodnoty platí pro expresi genů v SCN, v periferních orgánech dosahují hladiny RNA daných genů maximálních hodnot o 3-9 hodin později v závislosti na druhu tkáně. mPer1-3 dosahují v periferních orgánech maximálních hodnot na přelomu subjektivního dne a noci. Zhruba v polovině cirkadiálního dne, v CT12 (v periferních orgánech o 3-6 hodin později), jsou mPER proteiny spolu s mCRY proteiny transportovány do jádra a brzdí zde svoji vlastní transkripci působením na mCLOCK-mBMAL1 heterodimer. Protein mPER1 je nezbytný pro světlem indukované fázové posunutí oscilátoru (Reppert et Weaver, 2001). mPER proteiny jsou schopny tvořit heterodimery pouze ve fosforylované formě. Fosforylace také pozitivně ovlivňuje degradaci mPER proteinů a zpomaluje tím jejich vstup do jádra (Lee *et al.*, 2001).

## 5.2. Cryptochrome geny

U savců najdeme dva Cry geny, homology mCry1 a mCry2. Tyto dva geny jsou orthology genů rostlinných cirkadiálních receptorů. Hrají důležitou roli v cirkadiální fotoreceptci *Drosophily* (Wisor, 2002). mCry geny obsahují pro rostliny charakteristickou pterinovou a flavinovou skupinu. Jsou to strukturní homology DNA opravného enzymu DNA fotolyázy, ale postrádají její opravnou funkci. Cry geny obsahují funkční CACGTG E-box sekvenci. mCry1 gen vykazuje jasný cirkadiální rytmus a je exprimován téměř synchronně s genem mPer2 pomocí pozitivní regulace transkripčního faktoru mCLOCK-mBMAL1. mCry1 RNA dosahuje maximálních hodnot během subjektivního dne, v CT10. Naproti tomu mCry2 nevykazuje v SCN pravidelný cirkadiální rytmus, zatímco v periferních orgánech je exprimován rytmicky. Produkty Cry genů, CRY proteiny, tvoří pomocí PAS domény heterodimery s PER proteiny, jsou transportovány do jádra a inhibují zde transkripci svoji vlastní i transkripci Per genů. mCRY protein je nezbytný pro fungování negativní části zpětnovazebné smyčky, sám mPER protein inhibuje heterodimer mCLOCK-mBMAL1 pouze velmi slabě a má i slabou translokační schopnost (Kume *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že mCRY protein inhibuje ubiquitinaci a následnou degradaci mPER proteinu v proteasomu (Okamura *et al.*, 2002). mCRY protein také ovlivňuje stabilitu mPER2 proteinu (Cermakain *et al.*, 2002). Cílená delece genu mCry1 má za následek zkrácení periody rytmů. Zatímco delece genu mCry2 má naopak vliv na prodloužení periody rytmů. Proteiny mCry1 nebo mCry2 mutantů mají také pozměněnou schopnost tvořit heterodimery s mPER proteiny. Mutace v obou dvou genech má za následek totální ztrátu cirkadiální rytmicity. Tyto geny se tudíž zdají být esenciální pro fungování oscilátoru (Kume *et al.*, 1999).

## 5.3. Clock gen

Gen Clock byl prvním nalezeným hodinovým genem u savců. mClock tvoří rozsáhlou transkripční jednotku o velikosti 100 kpb s 24 exony (King *et al.*, 1997). Expresí mClock genu mohou pomocí alternativního sestřihu vzniknout dva různé mCLOCK proteiny o molekulové hmotnosti 120 kDa a 105 kDa (Lee *et al.*, 1999). Protein CLOCK obsahuje PAS doménu, pomocí které je schopen tvořit heterodimery s BMAL1 proteinem. CLOCK obsahuje bHLH DNA vazebnou doménu. S její pomocí se spolu s BMAL1 váže na E-boxy promotorů genů Per a Cry a funguje jako jejich pozitivní transkripční faktor. PER a CRY potom zpětně inhibují svoji vlastní transkripci skrze odstranění CLOCK-BMAL1 heterodimeru z E-boxu

svých genů (Reppert et Weaver, 2001). Zdá se, že koncentrace mClock mRNA i proteinu mCLOCK zůstává v SCN během 24 hodin konstantní (Lee *et al.*, 1999). Zatímco v periferních orgánech, například ve vejcovodu, byly prokázány cirkadiánní oscilace tohoto genu (Kennaway *et al.*, 2003). Jak již bylo zmíněno výše, aktivita hodinových proteinů je ovlivňována fosforylací. Bylo zjištěno, že jak fosforylovaný, tak nefosforylovaný protein CLOCK je schopen tvořit heterodimery s proteinem BMAL1. Interagovat s PER a CRY proteiny je ale schopný pouze fosforylovaný CLOCK (Lee *et al.*, 2001). U Clock/Clock mutantní myši nebyl pozorován rytmus v expresi mCry1 RNA, z čehož vyplývá, že rytmus mCry1 genu je závislý na funkčním mCLOCK proteinu. Tato teorie byla potvrzena v SCN i v periferních orgánech (Kume *et al.*, 1999). Obdobně bylo zjištěno, že amplituda rytmů všech tří mPer mRNA je značně redukována u Clock/Clock mutantní myši (Jin *et al.*, 1999). Bylo objeveno, že Clock mutace je způsobena delecí 51 aminokyselin z transkripčně aktivační domény. Mutované mCLOCK proteiny mohou sice dále tvořit heterodimery s mBMAL1, ale mají sníženou schopnost aktivovat transkripci. Z toho vyplývá, že mCLOCK protein je esenciální pro transkripční aktivitu komplexu mCLOCK-mBMAL1 (King *et al.*, 1997). Transkripční faktor NPAS2 (neuronal PAS domain protein 2) je strukturně příbuzný CLOCK proteinu. Pokusy s NPAS2-BMAL1 heterodimery prokázaly, že NPAS2 může fungovat jako funkční zástupce CLOCK proteinu. Ve spolupráci s BMAL1 je schopen indukovat transkripci Per, Cry genů a inhibovat transkripci Bmal1 genu (Reick *et al.*, 2001). Pracovní skupina DeBruyne *et al.* ve své nejnovější studii zpochybňuje základní molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací s CLOCK proteinem fungujícím jako pozitivní transkripční faktor Per a Cry genů. Překvapivě zjistili, že u Clock/Clock mutantní myši přetrvává jasný cirkadiánní rytmus v pohybové aktivitě. Přestože molekulární mechanismus zpětnovazebné smyčky u Clock/Clock mutantní myši dále funguje, hladiny mRNA hodinových genů a jejich proteinů v SCN i v periferních orgánech vykazují změny oproti hodnotám u nemutovaných myši. Tyto výsledky naznačují, že mCLOCK protein pravděpodobně ovlivňuje velikost amplitudy exprese hodinových genů. Výsledek zároveň zpochybňuje nezbytnost mCLOCK-mBMAL1 heterodimerů pro fungování mechanismu zpětnovazebné smyčky (DeBruyne *et al.*, 2006).

#### **5.4. Bmal1 gen**

Díky alternativnímu sestřihu mohou vzniknout 3 varianty mBmal1: mBmal1b, mBmal1b', mBmal1g'. U myši jsou funkční proteiny tvořeny pouze variantou mBmal1b a mBmal1b' (Yu *et al.*, 1999). Kódující oblast mBmal1 genu je dlouhá 110 kpb a je tvořena

23 exony (Yu *et al.*, 2002). Promotor mBmal1 genu obsahuje RORE sekvenci, na kterou se váže transkripční faktor REV-ERB- $\alpha$ . Rev-erb- $\alpha$  byl identifikován jako jaderný sirotčí (tzv. orphan) receptor, který je hlavním regulátorem cyklické transkripce mBmal1 genu (Preitner *et al.*, 2002). Rev-erb- $\alpha$  je gen, který je kontrolován mCLOCK-mBMAL1 heterodimerem. REV-ERB- $\alpha$  dosahuje maximálních hodnot v průběhu subjektivního dne. Svoji interakcí s RORE sekvencí genu mBmal1 posouvá jeho expresi do subjektivní noci (Hastings *et al.*, 2003). Gen mBmal1 je tedy exprimován v opačné fázi, než geny mPer a mCry. Exprese genu mBmal1 vykazuje jasný cirkadiánní rytmus a je pozitivně ovlivňována mPER2 proteinem (Cermakain et Sassone-Corsi, 2002). Hladina mBmal1 mRNA dosahuje v SCN maximálních hodnot v průběhu subjektivní noci, mezi CT15-CT18, v periferních orgánech dosahuje maxima na počátku subjektivního dne. BMAL1 protein, někdy také nazýván jako MOP3, JAP3, ARNT3 (Kume *et al.*, 1999), obsahuje PAS doménu i bHLH DNA vazebnou doménu. Tvoří heterodimery s CLOCK a váže se na E-boxy promotorů genů. Společně fungují jako pozitivní regulátory transkripce genů Per a Cry. mCLOCK-mBMAL1 heterodimer inhibuje v jádře expresi mBmal1. Proteiny PER a CRY fungují jako negativní regulační faktory heterodimeru CLOCK-BMAL1. Konkrétně CRY ruší interakci CLOCK-BMAL1 s promotorem genu. (Reppert et Weaver, 2001). U mBmal1 mutantní myši dochází k úplné ztrátě tvorby cirkadiánních rytmů (Bunger *et al.*, 2000). Aktivita heterodimerů mCLOCK-mBMAL1 může být modulována přes jaderné receptory spojené s hormony nebo redoxním potenciálem (Schibler et Naef, 2005). Heterodimerizace je též ovlivňována fosforylací. Jak fosforylovaný tak nefosforylovaný BMAL1 je schopen tvořit heterodimery s CLOCK. Z toho můžeme usuzovat, že fosforylace není pro tvorbu CLOCK-BMAL1 heterodimerů nezbytně nutná (Lee *et al.*, 2001).

## 5.5. Kasein kináza I epsilon

Savčí gen CKI $\epsilon$  je ortholog genu Dbt (doubletime) u *Drosophily*. Je to serin/threoninová protein kináza, která obsahuje C-koncovou regulační doménu (Eide et Virshup, 2001). Exprese CKI $\epsilon$  byla prokázána v SCN i v periferních orgánech, ale nevykazuje žádný cirkadiánní rytmus (Lee *et al.*, 2001). CKI $\epsilon$  je zodpovědná za regulaci fosforylace hodinových proteinů, jejich ubiquitinaci a následnou degradaci v proteasomu. Tím je omezena funkce negativní části zpětnovazebné smyčky (Wisor, 2002). Fosforylace má vliv na 24 hodinové změny v hladinách proteinů. Fosforylace PER1 a PER2 proteinů pomocí CKI $\epsilon$  ovlivňuje tvorbu heterodimerů s CRY proteiny a jejich společnou translokaci do jádra.

Preferenčně heterodimerizuje fosforylovaný PER1. Fosforylovaný PER1 zároveň ochotněji interaguje s CLOCK-BMAL1 než jeho nefosforylovaná forma. Stejně tak jako CKIε, i homologní CKIδ je schopna fosforylovat proteiny PER, CRY a BMAL1 (Lee *et al.*, 2001). Aktivita CKIε je regulována inhibiční autofosforylací (Partch *et al.*, 2006). Důležitá role fosforylace pro fungování centrálního mechanismu zpětnovazebné smyčky byla objevena pomocí pokusů s *tau* mutantním křečkem. Spontánní, semidominantní cirkadiánní mutace *tau* způsobuje výrazné zkrácení cirkadiánní periody (Ralph et Menaker, 1988). Pomocí klonování a genetické analýzy bylo zjištěno, že lokus *tau* je zodpovědný za kódování CKIε. Substitucí argininu za cystein vzniká missence mutace. Deficientní enzym CKIε je sice schopen vázat mPER proteiny, ale fosforyluje je se sníženou efektivitou. To má za následek rychlejší akumulaci mCRY-mPER komplexů v cytoplasmě a jejich brzký vstup do jádra (Lowrey *et al.*, 2000). Autosomálně dominantní mutace hPer2 genu způsobuje dědičný syndrom posunutí spánku (familial advanced sleep phase syndrom, FASPS), který se projevuje 4 hodinovým fázovým předběhnutím cirkadiánních hodin. U mutací postižených jedinců dochází k substituci serinu za glycin uvnitř CKIε vazebného místa hPER2 proteinu. CKIε hůře rozeznává mutované fosforylační místo na hPER2 proteinu a fosforyluje protein s nižší účinností. Výsledkem je narušení degradace hPER2 proteinu, jeho rychlejší vstup do jádra a zkrácení endogenní periody (Toh *et al.*, 2001). Obecně tedy fosforylace destabilizuje hodinové proteiny, snižuje jejich schopnost tvořit funkční heterodimery a translokovat se do jádra.

## 5.6. Hodinami kontrolované geny (CCGs)

Význam CCGs spočívá v řízení pozorovatelných výstupních rytmů v chování a fyziologické aktivitě. Bylo zjištěno, že exprese CCGs je regulována stejným centrálním molekulárním mechanismem jako exprese hodinových genů. Přesto existují v regulaci exprese CCGs a hodinových genů odlišnosti. Produkty CCGs nejsou na rozdíl od produktů hodinových genů pro fungování pacemakeru esenciální. Některé CCGs jsou regulovány skrze své E-boxy CLOCK-BMAL1 heterodimerem stejně jako hodinové geny (Reppert et Weaver, 2001).

Jedním z hodinami řízených genů je arginin vasopresin (AVP), který ovlivňuje hospodaření lidského těla s vodou a solemi. AVP dosahuje maximálních hodnot během subjektivního dne a je tedy synchronizován s mPer1 mRNA rytmem (Jin *et al.*, 1999). Exprese AVP je charakteristická pro dorsomediální část SCN (Leak *et al.*, 1999). Studie AVP

promotoru pomocí reportérského genu luciferázy prokázaly, že exprese je pozitivně regulována mCLOCK-mBMAL1 aktivací CACGTG sekvence E-boxu. Transkripce může být inhibována mPER a mCRY proteiny. Z toho vyplývá, že AVP gen je pod přímou kontrolou hodinových genů (Jin *et al.*, 1999). Dalším z hodinami řízených genů je albumin D-element vazebný protein (albumin D-element binding protein, DBP). DBP je typický CCGs v periferních orgánech, reguluje např. rytmickou transkripci klíčových enzymů metabolismu v hepatocytech jater (Ripperger *et al.*, 2000). Při zkoumání mPer1 promotoru se zjistilo, že DBP se váže do jeho sekundárního iniciačního místa (D-Box) a usnadňuje mCLOCK-mBMAL1 indukovanou transkripci genu. mCLOCK-mBMAL1 zároveň spouští transkripci Dbp genu skrze E-box jeho sekundárního intronu. Tento protein je charakteristický obsahem DNA vazebné domény leucinového zipu (bZIP) a PAR domény bohaté na prolin a kyselá aminokyseliny (Okamura *et al.*, 2002). Do této rodiny patří také HLF (hepatic leukocyte factor) a TEF (thyrotropic embryonic factor). Všechny tři geny vykazují cirkadiální rytmicitu v SCN i v periferních orgánech. Ztráta jednoho z těchto genů vede k malým změnám ve fenotypu jedince. Ztráta všech tří genů vede k výraznému zkrácení délky života daného jedince. DBP, HLF a TEF tedy nejsou základními komponentami oscilátoru, spíše řídí jeho výstupní rytmy (Schibler, 2005).

## 6. Periferní orgány

Expese hodinových genů probíhá nejen v SCN, ale také v periferních orgánech jako jsou kosterní svaly, srdce, játra, plíce, ledviny a další. Kromě SCN byla retina dlouhou dobu považována za jedinou další strukturu, která obsahuje biologické hodiny. Retina vykazuje jasný cirkadiální rytmus v expresi melatoninu, který je synchronizovatelný světlem. Později bylo objeveno, že i všechny tři mPer geny jsou rytmicky exprimovány v oku. Expese je o 3-6 hodin zpožděna vůči SCN (Zylka *et al.*, 1998). mPer geny jsou exprimovány také v ostatních oblastech mozku a periferních orgánech. Jejich expese i expese ostatních hodinových genů je vůči SCN zpožděna o 3-9 hodin v závislosti na druhu tkáně. Např. hladina mBmal1 RNA dosahuje maxima na začátku subjektivního dne, hladiny mPer genů dosahují maximálních hodnot na přelomu subjektivního dne a noci. Jejich rytmus je tedy v protifázi stejně jako v SCN (Balsalobre, 2002). Usuzovalo se, že periferní orgány jsou buďto přímo řízeny, nebo synchronizovány SCN. U potkanů, kterým byla provedena léze SCN, došlo v periferních orgánech k vymizení rytmu v expresi genu mPer2 a k ztrátě rytmu v pohybové aktivitě, což

naznačovalo, že periferní orgány jsou pod přímou kontrolou SCN (Sakamoto *et al.*, 1998). Nebylo však možno přesně rozlišit, zda dochází k úplné ztrátě rytmicity nebo pouze k desynchronizaci jednotlivých buněčných oscilátorů (Reppert et Weaver, 2001).

U transgenních potkanů, kterým byl za mPer1 promotor vložen reportéřský gen luciferáza, došlo v kultuře buněk *in vitro* k snížení amplitudy rytmů v periferních orgánech po 2-7 dnech. V kultuře buněk SCN přetrvával jasný rytmus až po dobu 32 dnů. Výměna média při kultivaci buněk periferních orgánů vedla k obnovení rytmicity. Reiniace je pravděpodobně zapříčiněna odstraněním toxických látek a šokem spojeným se změnou teploty, pH atd. v důsledku výměny média. *In vitro* rytmus v periferních orgánech vykazoval fázové zpoždění 7-11 hodin za SCN stejně jako *in vivo* (Yamazaki *et al.*, 2000).

Mechanismus regulace exprese hodinových genů sice funguje v SCN a periferních orgánech na stejném principu, ale pravděpodobně zde existují jisté odlišnosti (Oishi *et al.*, 2000). U Clock/Clock mutantní myši je v periferních orgánech hladina mBmal1 mRNA zvýšena, ale v SCN se hladina dané mRNA snižuje. Na rozdíl od SCN, které může přijímat informace o světle z retiny, periferní orgány savců neobsahují fotoreceptory schopné zachytit světelnou informaci. Jsou tedy závislé na SCN, které jim předává informaci o vnějším světelném režimu a tím je synchronizuje (Brandstaetter, 2004). Děje se tak pomocí dosud nespecifikovaných neuronálních a humorálních signálů. Mononukleární leukocyty periferních tkání potkana neobsahují neuronální synapse, přesto v nich probíhá rytmická exprese mPer2 genu. Zdá se tedy, že humorální signály jsou na rozdíl od neuronálních signálů pro synchronizaci některých periferních orgánů nezbytné (Oishi *et al.*, 1998).

Nová éra pohledu na synchronizaci oscilací v periferních orgánech začala spolu s pokusy s fibroblasty potkana. V kultuře fibroblastů potkana *in vitro* dochází k úplnému vymizení rytmicity exprese genů po 3-4 dnech. Aplikace séra k buněčné kultuře fibroblastů vyvolá rytmus v expresi genů mPer1, mPer2, Rev-Erb- $\alpha$ , DBP a TEF i bez přítomnosti SCN. Rytmus přetrvává nejméně 3 cykly (dny) s průměrnou délkou periody 22,5 hodiny. Každý z genů je však exprimován v jiné fázi. Potenciální inhibitor genové exprese cytosin  $\beta$ -D arabinofuranosid (Ara-C) nemá na sérovým šokem indukovanou genovou expresi vliv. Sérový šok stimuluje expresi okamžitých časných genů c-Fos a mPer podobnou světlem indukované expresi genů v SCN. Spouštěcí signální dráha se tedy zdá být podobná v neuronech SCN i v buňkách stimulovaných sérovým šokem. Všechny tyto výsledky naznačovaly, že periferní orgány sice mají své vlastní oscilátory, ale pro udržení oscilací je nutné, aby byly synchronizovány centrálními hodinami v SCN (Balsalobre *et al.*, 1998). Později se zjistilo, že sérovým šokem indukovaná exprese genů mPer1 a mPer2 v kultuře

fibroblastů je pravděpodobně aktivována přímou signální dráhou zahrnující cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), protein kinázu C (PKC), vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ), tyrozin kinázové receptory (RTKs) a glukokortikoidní hormony. Zdálo se tedy, že SCN synchronizuje periferní orgány hlavně prostřednictvím humorálních signálů (Balsalobre *et al.*, 2000).

Odlišné výsledky než všechny předešlé práce získala v roce 2004 pracovní skupina Yoo *et al.*, když pro sledování exprese genů v kulturách buněk periferních orgánů myši použila PERIOD2::LUCIFERÁZA (PER2::LUC) fúzní protein. Ukázalo se, že SCN i periferní orgány např. plíce, játra, ledviny a tkáň ocásku jsou schopny rytmicky oscilovat po dobu více jak 20 dnů. Po několika cyklech však dochází ke snižování amplitudy rytmů pravděpodobně v důsledku vyčerpání zásob živin a luciferinu. Výměnou média lze amplitudu rytmů opět zvýšit. *In vitro* dosahovala hladina exprese PER2::LUC v SCN maxima ve stejnou dobu jako *in vivo*, v CT12. Zároveň všechny periferní orgány vykazovaly jasné fázové zpoždění vůči SCN stejně jako v živém organismu. Jednotlivé periferní orgány vykazovaly tkáňově specifické rozdíly v délce periody a fázi rytmu. Překvapivě u myši, kterým byla provedena léze SCN, nedochází v periferních orgánech ke ztrátě rytmicity. Dochází pouze k vnitřní desynchronizaci buněčných oscilátorů v jednotlivých tkáních. Periferní orgány tedy můžeme považovat za tkáňově specifické a také za schopné tvořit rytmické oscilace i bez přítomnosti SCN. Úkolem SCN je synchronizovat periferní orgány, jelikož v jeho nepřítomnosti dochází k desynchronizaci jednotlivých tkáňových oscilátorů (Yoo *et al.*, 2004).

## **6.1. Synchronizace periferních orgánů změnou světelných podmínek**

Vnější světelný režim ovlivňuje nejen genovou expresi v SCN, ale i v periferních orgánech. Při fázovém posunutí světelného režimu (např. při přeletu přes více časových pásem) dochází k synchronizaci SCN téměř okamžitě, mnohem rychleji, než v periferních orgánech. Pracovní skupina Yamazaki *et al.* vystavila potkany 6 hodinovému fázovému zpoždění a poté sledovala rytmickou expresi genů v SCN, játrech, plicích a kosterních svalech. SCN bylo synchronizováno již po 1. cyklu (dnu) nového světelného režimu. U periferních orgánů se fázovému zpoždění přizpůsobovala každá z tkání odlišným způsobem. Všem ale synchronizace trvala delší dobu než SCN. V některých případech, např. v kosterním svalu, posun světelného režimu dokonce na několik cyklů zcela potlačil rytmickou expresi genů v periferních orgánech. Plíce a kosterní sval byly po 1. cyklu posunuty o 4 hodiny.



Po 6. cyklu byly tkáně posunuty o 6 hodin, byly tedy synchronizovány úplně. U jater trvala synchronizace nejdéle. Po 1. cyklu u nich nedošlo k žádnému fázovému posunu. Po 6. cyklu byly posunuty o 3,5 hodiny. Po 16. cyklu byla játra stále posunuta pouze o 4 hodiny. Poté byly tkáně naopak vystaveny 6 hodinovému fázovému předběhnutí. Fázovému předběhnutí se velice složitě přizpůsobovaly plíce a kosterní sval. Po 1. cyklu byla většina tkáňových kultur kosterního svalu a plic arytmiická. Kosterní svaly i plíce byly kompletně synchronizovány po 6. cyklu. Naproti tomu žádná z tkáňových kultur jater nereagovala na fázové předběhnutí ztrátou rytmicity. Po 1. cyklu byla játra předběhnuta o 2 hodiny. Po 6. cyklu byla játra synchronizována o celých 6 hodin. Pokus s 9 hodinovým fázovým předběhnutím a zpožděním přinesl obdobné výsledky. SCN se tedy přizpůsobuje změnám způsobeným fázovým posunem mnohem rychleji než všechny zkoumané periferní orgány. Tyto výsledky podporují hypotézu, že centrální pacemaker v SCN funguje jako synchronizátor periferních orgánů. *In vivo* periferní orgány dostávají specifické humorální a neuronální signály z SCN, pomocí kterých jsou udržovány pod specifickou fázovou kontrolou (Yamazaki *et al.*, 2000). Jelikož periferní orgány savců neobsahují fotoreceptory, úkolem SCN je synchronizovat je s vnějším světelným režimem (Reppert et Weaver, 2001).

## 6.2. Synchronizace periferních orgánů příjmem potravy

Kromě vnějšího světelného režimu hraje důležitou roli při synchronizaci periferních orgánů příjem potravy. Podobně jako u světelné synchronizace, probíhá synchronizace pomocí doby příjmu potravy různě rychle v jednotlivých periferních tkáních. Příjem potravy je pro periferní oscilátory nejdůležitějším synchronizátorem (Schibler *et al.*, 2003).

Noční živočichové jako např. myš nebo potkan přijímají potravu během subjektivní noci. Pokud těmto živočichům umožníme přístup k potravě pouze po několik hodin během subjektivního dne, jedná se o „restricted feeding“ (RF). U těchto živočichů můžeme pozorovat převrácení rytmu v expresi hodinových genů (Damiola *et al.*, 2000). RF má vliv na změnu fáze v expresi hodinových genů o 6-12 hodin v periferních orgánech jako jsou játra, ledviny, srdce a slinivka v LD i DD světelném režimu. Tento fázový posun se týká pouze periferních orgánů, RF nemá žádný vliv na změnu fáze exprese genů v SCN (Hara *et al.*, 2001). Z toho vyplývá, že metabolické změny v důsledku příjmu potravy mohou vést k odpražení periferních oscilátorů od SCN. Organismy vyžadují několik dní k přizpůsobení se novému potravnímu režimu. Náhlé změně v potravním režimu se nejrychleji přizpůsobují játra. Po 6-7 dnech jsou se změněnými potravními podmínkami synchronizovány všechny

tkáně (Damiola *et al.*, 2000). K fázovému předběhnutí periferních oscilátorů dochází i u myší, kterým byla provedena léze SCN. U myší podrobených lézi SCN můžeme také pozorovat tzv. anticipační chování, které předchází přijímání potravy (Stokkan *et al.*, 2001). Projevy anticipačního chování jsou zvýšení pohybové aktivity, zvýšení tělesné teploty, zvýšení hladiny kortikosteronu, snížení hladiny glukagonu v krevní plazmě, zvýšení hladiny ketonových látek a volných mastných kyselin několik hodin před začátkem příjmu potravy (Hara *et al.*, 2001). Nejnovější výzkumy ukazují, že dorsomediální hypothalamické jádro (DMH) hraje významnou roli při synchronizaci periferních orgánů pomocí příjmu potravy. Při provedení léze DMH, dochází k vymizení projevů anticipačního chování. RF tedy pravděpodobně způsobuje změnu fáze exprese genů v periferních orgánech skrze změnu rytmické aktivity v DMH (Gooley *et al.*, 2006). Zároveň nedojde v játrech k fázovému posunu způsobeném změnou LD režimu pokud je organismus držen v RF podmínkách a změna je provedena během noci. Naproti tomu SCN reaguje na změnu LD světelného režimu fázovým posunem exprese genů. Předpokládá se tedy, že existují dva biologické oscilátory, světlem synchronizovatelný oscilátor uložený v SCN a příjmem potravy synchronizovatelný oscilátor, jehož umístění a způsob fungování nebyly doposud prokázány (Hara *et al.*, 2001). RF ovlivňuje v játrech nejen expresi hodinových genů (mPer1, mPer2, mPer3, Cry1), ale také expresi hodinami řízených genů (Dbp, Rev-erb- $\alpha$ ) a expresi genů, které kódují enzymy a regulační proteiny účastníci se metabolismu (cytochrom P450 enzym, glykogen syntáza, glykogen fosforyláza, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza). V játrech je hlavní funkcí oscilátoru řízení absorpční a postabsorpční fáze metabolických pochodů při zpracování potravy (Damiola *et al.*, 2000).

Jak již bylo zmíněno dříve, transkripce hodinových genů je indukována navázáním heterodimeru CLOCK/NPAS2-BMAL1 do E-boxu jejich promotorů. Zdá se, že efektivitu interakce heterodimeru s příslušným DNA elementem pozitivně ovlivňuje přítomnost redukováných forem nikotinamid adenin dinukleotidů (NADH, NADPH). Naopak oxidované formy NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup> účinnost interakce snižují. Hladina NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>/NADH, NADPH závisí na metabolickém stavu buňky. Dočasná represe exprese hodinových genů může mít za následek fázové posunutí oscilátorů v periferních orgánech (Schibler *et al.*, 2003). CLOCK protein není esenciální pro změnu fáze exprese genů v periferních orgánech při RF režimu. K fázovému posunu exprese mPer2 a mBmal1 genů při RF dochází i u Clock/Clock mutantní myši (Oishi *et al.*, 2002). Také na příjmu potravy závislá sekrece hormonů pravděpodobně ovlivňuje fázové nastavení periferních oscilátorů (Stokkan *et al.*, 2001). Ještě před samotným příjmem potravy jsou v trávicím traktu uvolňovány gastrointestinální

hormony, které jsou zodpovědné za spuštění MAP kinázové dráhy. Výsledkem je fosforylace transkripčního faktoru CREB, jeho navázání na CRE element v promotorech genů a následná indukce genové exprese. (Schibler *et al.*, 2003).

Synchronizace periferních orgánů se účastní mnoho humorálních faktorů. Patří mezi ně i již dříve zmíněné glukokortikoidní hormony. Aplikace glukokortikoidů nebo jejich analogu dexamethasonu stimuluje expresi mPer genů v buněčné kultuře fibroblastů potkana. Naproti tomu rytmická exprese mPer genů zde probíhá i při blokaci glukokortikoidních receptorů. Exprese genů probíhá také v periferních tkáních, které glukokortikoidní receptory neexprimují. Z toho vyplývá, že glukokortikoidy se podílejí spíše na modulaci exprese hodinových genů než na její tvorbě (Balsalobre *et al.*, 2000). U nočních zvířat probíhá fázový posun exprese hodinových genů a hodinami kontrolovaných genů v periferních orgánech pomalu, pokud je doba příjmu potravy přesunuta ze subjektivní noci do subjektivního dne. Naopak fázový posun probíhá rychle při navrácení doby příjmu potravy zpět do subjektivní noci. Překvapivě jsou za pomalou změnu fázového posunu v játrech a v ledvinách zodpovědné glukokortikoidy. V tkáních bez přítomnosti glukokortikoidních hormonů nebo glukokortikoidních receptorů probíhá fázový posun rychle. Obrácená fáze v expresi hodinových genů se zde projeví během několika dnů po zavedení RF režimu. Z toho vyplývá, že glukokortikoidní hormony zpomalují fázový posun genové exprese v periferních orgánech v důsledku RF a inhibují tak odpřažení periferních oscilátorů od centrálního pacemakeru. Glukokortikoidy též nemají vliv na fázový posun oscilátorů v játrech a ledvinách pokud je přístup k potravě neomezený (ad libitum) nebo přesunutý do subjektivní noci. Denní hladina glukokortikoidních hormonů v těle je regulována SCN pomocí hypothalamo-hypofyzární-nadledvinkové osy. SCN tak může regulovat rychlost odpřažení periferních orgánů v důsledku změny doby příjmu potravy. U denních i nočních živočichů dosahují glukokortikoidy maximální hladiny před začátkem doby aktivity (Le Minh *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že glukokortikoidy regulují expresi transkripčního faktoru Rev-erb- $\alpha$  v játrech. 6 hodin po aplikaci dexamethasonu byl u potkanů pozorován 70% pokles hladiny Rev-erb- $\alpha$  mRNA. Exprese genu Rev-erb- $\alpha$  je tedy kontrolována cirkadiánními hodinami i hladinou glukokortikoidů v játrech (Torra *et al.*, 2000).

Synchronizace periferních orgánů může být zprostředkována také nervovými spoji mezi centrálním oscilátorem a periferními orgány. Nervová spojení jsou tvořena sympatickými a parasympatickými vlákny autonomního nervového systému pomocí preautonomních neuronů paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN) a dalších hypothalamických struktur (Kalsbeek *et al.*, 2004). Neuropeptidy (např. GABA) produkované

SCN předávají výstupní signály hypothalamickým strukturám, které ovlivňují fungování mnohých fyziologických procesů v periferních orgánech (Buijs *et al.*, 2003).

### 6.3. Cirkadiánní systém v reálném světě

Cirkadiánní systém, hojně studovaný na laboratorních zvířatech, musí být schopný se adaptovat na podmínky reálného světa. V přírodě volně žijící hraboš *Microtus arvalis*, který slouží jako potrava mnohým predátorům, si vyvinul neobvyklou antipredační strategii. Aby zmátly predátory, celé populace hrabošů se vydávají hledat potravu každé 2-3 hodiny. V této strategii můžeme nalézt jasný ultradiánní rytmus (Gerkema *et Van der Leest*, 1991). Při umístění hraboše *Microtus arvalis* do laboratorní klece s neomezeným přístupem k potravě (*ad libitum*) při LD světelném režimu můžeme zaznamenat dvě různé strategie v jeho pohybové aktivitě v závislosti na možnosti přístupu k otáčivému kolu (*running wheel*). Zvířata bez přístupu k otáčivému kolu vykazovala 2-3 hodinový ultradiánní rytmus v pohybové aktivitě a příjmu potravy během subjektivního dne i noci. Umožnění přístupu k otáčivému kolu dokonale změnilo rytmus v chování zvířat. Ultradiánní rytmus je potlačen a většina pohybové aktivity se přesouvá do doby subjektivní noci. Expresí hodinových genů a hodinami řízených genů v SCN vykazuje cirkadiánní rytmus synchronizovaný s LD světelným režimem u hrabošů s přístupem i bez přístupu k otáčivému kolu. To potvrzuje tezi, že pro SCN je dominantním synchronizátorem světlo. Naproti tomu exprese hodinových genů v játrech závisí na možnostech přístupu zvířete k otáčivému kolu, tedy na zvýšení fyzické aktivity. U zvířat bez přístupu k otáčivému kolu měla exprese genů v játrech, stejně jako pohybová aktivita, ultradiánní rytmus. S možností přístupu k otáčivému kolu lze v játrech pozorovat slabý cirkadiánní rytmus s nízkou amplitudou exprese genů. Zajímavé je, že laboratorní myš vystavená ultradiánnímu rytmu v příjmu potravy si zachovává cirkadiánní rytmus a vysokou amplitudu exprese genů v játrech. Expresí hodinových genů v játrech v závislosti na příjmu potravy je tedy druhově specifická a je též závislá na podmínkách, ve kterých zvíře žije. Van der Veen *et al.* dokonce tvrdí, že ultradiánní a cirkadiánní rytmus hraboše je každý řízen odlišnými oblastmi hypothalamu. SCN je zodpovědné za cirkadiánní rytmus. Za ultradiánní rytmus je zodpovědné tzv. *nucleus arcuatus* a *retrochiasmatická* oblast (Van der Veen *et al.*, 2006).

Cirkadiánní organizace podstupuje změny spojené s rostoucím věkem organismu. U SCN dochází s narůstajícím věkem ke zkracování délky periody. Periferní orgány reagují na stárnutí organismu různě. Některé tkáně neprojevují žádné změny, některé jsou arytmičné a

jiné jsou fázově předběhnuty vůči vnějšímu světelnému režimu. Stárnutí organismu má tedy vliv na tvorbu rytmických oscilací v některých orgánech. Dochází však zřejmě k oslabování schopnosti SCN synchronizovat periferní orgány (Yamazaki *et al.*, 2002).

## 7. Závěr

Biologické rytmy se rozdělují podle délky periody na ultradiánní, cirkadiánní a infradiánní. Z hlediska živých organismů jsou nejvýznamnější rytmy cirkadiánní, tedy přibližně 24 hodinové. Pro každý organismus je charakteristická délka jeho vnitřní periody  $\tau$  (tau). Biologické rytmy jsou rytmy endogenní. Jsou tvořeny centrálním oscilátorem uloženým v suprachiasmatických jádrech předního hypothalamu. Tento oscilátor je především pomocí světla synchronizován s vnějším prostředím. Jeho úkolem je generovat výstupní rytmy v chování a fyziologické aktivitě organismu.

Molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací tvoří transkripční/translační zpětnovazebná smyčka. Po objevení existence hodinových genů (Per, Cry, Clock, Bmal1, CK1 $\epsilon$ ) bylo zjištěno, že hodinové geny a jejich produkty fungují jako pozitivní nebo negativní elementy zpětnovazebné smyčky. Výstup z oscilátoru tvoří hodinami kontrolované geny (CCGs).

Po identifikaci hodinových genů byla zjištěna existence oscilátorů také v periferních orgánech. Oscilátory v periferních tkáních jsou autonomní, vykazují cirkadiánní oscilace i bez přítomnosti SCN a mohou být od pacemakeru odpraženy změnou doby příjmu potravy. Periferní orgány nemají schopnost fotorecepce. Jsou závislé na SCN, které je pomocí neuronálních a humorálních signálů synchronizuje s vnějším světelným režimem.

Pochopení fungování celého cirkadiánního systému je důležité pro léčbu poruch spojených s jeho oslabením. Jedná se např. o poruchy spánku, vnitřní desynchronizaci organismu v důsledku přeletu přes více časových pásem (jet lag) nebo nedostatečnou kontrolu cyklu buněčného dělení. Oslabení cirkadiánního systému také zvyšuje pravděpodobnost výskytu nádorových onemocnění. Rozvoj chronofarmakologie poskytuje naději na řešení těchto problémů.

V budoucnu bych se chtěla zabývat především ontogenezí cirkadiánních oscilací v periferních orgánech. Také bych se chtěla věnovat molekulárnímu mechanismu regulace a synchronizace hodinových genů v trávicím systému savců se zaměřením na poruchy spojené s náhlou změnou příjmu potravy v důsledku fázového posunutí světelného režimu.

## Seznam použité literatury

Ali A.M., Boujard T., Gerkema M.P., 1992, Terminology in biological rhythms, ASI vol. Plen., 5-9

Balsalobre A., 2002, Clock genes in mammalian peripheral tissues, *Cell Tissue Res.*, 301 (1): 193-199

Balsalobre A., Damiola F., Schibler U., 1998, A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells, *Cell*, 93 (6): 929-937

Balsalobre A., Marcacci L., Schibler U., 2000, Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts, *Curr. Biol.*, 10 (20): 1291-1294

Brandstaetter R., 2004, Circadian lessons from peripheral clocks: is the time of the mammalian pacemaker up?, *Proc. Atl. Acad. Sci. USA*, 101 (15): 5339-5346

Buijs R.M., van Eden C.G., Goncharuk V.D., Kalsbeek A., 2003, The biological clock tunes the organs of the body: Timing by hormones and the autonomic nervous system, *J. Endocrinol.*, 177 (1): 17-26

Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A., 2000, Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals, *Cell*, 103 (7): 1009-1017

Cermakain N., Sassone-Corsi P., 2002, Environmental stimulus perception and control of circadian clocks, *Cur. Opin. Neurobiol.*, 12 (4): 359-365

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, *Proc. Natl. Sci. USA*, 96 (23): 13468-13478

Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U., 2000, Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus, *Genes Dev.*, 14 (23): 2950-2961

DeBruyne J.P., Noton E., Lambert C.M., Maywood E.S., Weaver D.R., Reppert S.M., 2006, A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function, *Neuron*, 50 (3): 465-477

Dunlap J.C., 1999, Molecular bases for circadian clock, *Cell*, 96 (2): 271-290

Ebisawa T., Uchiyama M., Kajimura N., Mishima K., Kamei Y., Katoh M., Watanabe T., Sekimoto M., Shibui K., Kim K., Kudo Y., Ozeki Y., Suqishita M., Toyoshima R., Inoue Y., Yamada N., Nagase T., Ozaki N., Ohara O., Ishida N., Okawa M., Takahashi K., Yamauchi T., 2001, Association of structural polymorphisms in the human Period3 gene with delayed sleep phase syndrome, *EMBO Rep.*, 2 (4): 342-346

Eide E.J., Virshup D.M., 2001, Casein kinase I: another cog in the circadian clockworks, *Chronobiol. Int.*, 18 (3): 389-398

Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., 1998, Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism, *Science*, 280 (5369): 1564-1569

Gerkema M.P., Van der Leest F., 1991, Ongoing ultradian activity rhythms in the common vole, *Microtus arvalis*, during deprivations of food, water and rest, *J. Comp. Physiol.*, 168 (5): 591-597

Gillette M.U., Tischkau S.A., 1999, Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock, *Recent Prog. Horm. Res.*, 54: 33-58

Gooley J.J., Schomer A., Saper C.B., 2006, The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms, *Nat. Neurosci.*, 9 (3): 398-407

Hamada T., Yamanouchi S., Watanabe A., Shibata S., Watanabe S., 1999, Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythms *in vitro*, Brain Res., 836 (1-2): 190-193

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

Hastings M.H., Reddy A.B., Maywood E.S., 2003, A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease, Nat. Rev. Neurosci., 4 (8): 649-661

Hida A., Koike N., Hirose M., Hattori M., Sakaki I., Tei H., 2000, The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription, Genomics, 65 (3): 224-233

Illnerová H., 1996, Melatonin a jeho působení, Vesmír, 75, 266

Illnerová H., 1995, Pokroky v neurovědách, kapitola Chronobiologie, Univerzita Karlova

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 suprachiasmatic circadian clock, Cell, 96 (1): 57-68

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 (35): 7604-7613

King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tahala M., Antoch M.P., Steeves T.D., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., Turek F.W., Takahashi J.S., 1997, Positional cloning of the mouse circadian Clock gene, Cell, 89 (4): 641-653

Kennaway D.J., Varcoe T.J., Mau V.J., 2003, Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct, Mol. Hum. Reprod., 9 (9): 503-507



- Kornhauser J.M., Nelson D.E., Mayo K.E., Takahashi J.S., 1990, Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus, *Neuron*, 5 (2): 127-134
- Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E., 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 (2): 193-205
- Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G., Schibler U., 2001, Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators, *EMBO J.*, 20 (24): 7128-7136
- Leak R.K., Card J.P., Moore R.Y., 1999, Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport, *Brain Research*, 819 (1-2): 23-32
- Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang R.A., Loudon A.S., Reppert S.M., 2001, Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock, *Cell*, 107 (7): 855-867
- Liu C., Weaver D.R., Jin X., Shearman L.P., Pieschl R.L., Gribkoff V.K., Reppert S.M., 1997, Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic clock, *Neuron*, 19 (1): 91-102
- Lowrey P.L., Shimomura K., Antoch M.P., Yamazaki S., Zemenides P.D., Ralph M.R., Menaker M., Takahashi J.S., 2000, Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*, *Science*, 288 (5465): 483-492
- Menaker M., Wiesner S., 1983, Temperature-compensated circadian clock in the pineal of *Anolis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (19): 6119-6121
- Moore R.Y., Speh J.C., 1993, GABA is the principal neurotransmitter of the circadian timing system, *Neurosci. Lett.*, 150 (1): 112-116

Morin L.P., Blanchard J., 1995, Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus, *Vis. Neurosci.*, 12 (1): 57-67

Oishi K., Fukui H., Ishida N., 2000, Rhythmic expression of *Bmal1* mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268 (1): 164-171

Oishi K., Miyazaki K., Ishida N., 2002, Functional CLOCK is not involved in the entrainment of peripheral clocks to the restricted feeding: entrainable expression of *mPer2* and *BMAL1* mRNAs in the heart of Clock mutant mice on Jcl:ICR background, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 298 (2): 198-202

Oishi K., Sakamoto K., Okada T., Nagase T., Ishida N., 1998, Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (*rPer2*) mRNA in peripheral tissues, *Neurosci. Lett.*, 256 (2): 117-119

Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K., 2002, Molecular machinery of the circadian clock in mammals, *Cell Tissue Res.*, 309 (1): 47-56

Panda S., Provencio I., Tu D.C., Pires S.S., Rollag M.D., Castrucci A.M., Pletcher M.T., Sato T.K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S.A., Van Gelder R.N., Hogenesch J.B., 2003, Melanopsin is required for non-image-forming photic response in blind mice, *Science*, 301 (5632): 525-527

Partch C.L., Shields K.F., Thompson C.L., Selby C.P., Sancar A., 2006, Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5

Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U., 2002, The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator, *Cell*, 110 (2): 251-260

Ralph M.R., Menaker M., 1988, A mutation of the circadian system in golden hamsters, *Science*, 241 (4870): 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 (5529): 506-509

Reppert S.M., Weaver D.R., 2001, Molecular analysis of mammalian circadian rhythms, *Annu. Rev. Physiol.*, 63: 647-676

Ripperger J.A., Shearman L.P., Reppert S.M., Schibler U., 2000, CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP, *Genes Dev.*, 14 (6): 679-689

Sakamoto K., Nagase T., Fukui H., Horikawa K., Okada T., Tanaka H., Sato K., Miyake Y., Ohara O., Kako K., Ishida N., 1998, Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain, *J. Biol. Chem.*, 273 (42): 27039-27042

Schibler U., 2005, The daily rhythms of genes, cells and organs, *EMBO Rep.*, 6 Spec. no: S9-S13

Schibler U., Naef F., 2005, Cellular oscillators: rhythmic expression and metabolism, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17 (2): 223-229

Schibler U., Ripperger J., Brown S.A., 2003, Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food, *J. Biol. Rhythms*, 18 (3): 250-260

Silver R., Schwartz W.J., 2005, The suprachiasmatic nucleus is a functionally heterogeneous timekeeping organ, *Methods enzymol.*, 393: 451-465

Shearman L.P., Sriram S., Weaver D.R., Maywood E.S., Chaves I., 2000, Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock, *Science*, 288 (5465): 1013-1019

Stokkan K.A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., Menaker M., 2001, Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding, *Science*, 291 (5503): 490-493

Takahashi J.S., DeCoursey P.J., Bauman L., Menaker M., 1984, Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms, *Nature*, 308 (5955): 186-188

Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptacek L.J., Fu Y.H., 2001, An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome, *Science*, 291 (5506): 1040-1043

Torra I.P., Tsibulsky V., Delaunay F., Saladin R., Laudet V., Fruchart J.C., Kosykh V., Staels B., 2000, Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb $\alpha$  expression in liver, *Endocrinology*, 141 (10): 3799-3806

Van der Veen D.R., Le Minh N., Gos P., Arneric M., Gerkema M.P., Schibler U., 2006, Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus Arvalis*, a mammal with ultradian rhythms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (9): 3015-3016

Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M., Reppert S.M., 1995, Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms, *Neuron*, 14 (4): 697-706

Wisor J.P., 2002, Disorders of the circadian clock: etiology and possible therapeutic targets, *Curr. Drug Targ.- CNS & Neurological Disorders*, 1: 555-566

Yamaguchi S., Mitsui S., Miyake S., Yan L., Onishi H., Yagita K., Suzuki M., Shibata S., Kobayashi M., Okamura H., 2000, The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation, *Curr. Biol.*, 10 (14): 873-876

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 (5466): 682-685

Yamazaki S., Straume M., Tei H., Sakaki Y., Menaker M., Block G.D., 2002, Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks, *Proc. Atl. Acad. Sci. USA*, 99 (16): 10801-10806

Yoo S.H., Yamazaki S., Lowrey P.L., Shimomura K., Ko C.H., Buhr E.D., Siepkha S.M., Hong H.K., Oh W.J., Yoo O.J., Menaker M., Takahashi J., 2004, PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 (15): 5699-5700

Yu W., Ikeda M., Abe H., Honma S., Ebisawa T., Yamauchi T., Honma K., Nomura M., 1999, Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse Bmal1 gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 260 (3): 760-767

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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 290 (3): 933-941

Zylka M.J., Shearman L.P., Weaver D.R., Reppert S.M., 1998, Three period homologs in mammals: differential light response in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain, Neuron, 20 (6): 1103-1110