

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Fyziologie živočichů



**Bc. Leona Hrubcová**

Expresie enzymů kynureninové a methoxyindolové dráhy v epifýze, játrech a srdci potkana v cirkadiálním profilu a po aplikaci lipopolysacharidu

Expression of enzymes of kynurenine and methoxyindole pathway in the rat pineal gland, liver and heart in circadian profile and after lipopolysaccharide administration

Diplomová práce

Školitel:

doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2021

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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,

Bc. Leona Hrubcová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za cenné rady při psaní diplomové práce i při provádění pokusů, a za její obdivuhodnou trpělivost a pochopení. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Simoně Moravcové a všem členům laboratoře za pomoc během experimentů a zaškolení ve všech využitých metodách. Dokončení této práce by nebylo možné bez nich.

## Abstrakt

Tryptofan je aminokyselina, která má v těle mnoho funkcí. Kromě účasti na produkci proteinů figuruje jako substrát pro kynureninovou a methoxyindolovou metabolickou dráhu. Kynureninová dráha končí produkcí nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD<sup>+</sup>), který je potřeba pro buněčnou energetickou produkci. Při zvýšené poptávce po energii, např. během aktivace imunitního systému je tedy aktivita kynureninové dráhy zvýšena. Při zvýšené aktivitě produkuje více imunoaktivní a neuroaktivní metabolity, jako jsou kyselina kynurenová a kyselina chinolinová. Tyto metabolity se účastní mnoha procesů v těle a ovlivňují patologii mnoha onemocnění. Studie ukazují, že regulace hladiny těchto metabolitů by mohla být klíčová v inovaci léčby nádorových, kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních onemocnění. Methoxyindolová dráha je další důležitá dráha zpracovávající tryptofan. Její nejznámější metabolity jsou serotonin, který působí jako neurotransmitter, a melatonin, hormon s imunomodulačními účinky regulovaný cirkadiálními hodinami.

Tato práce se zabývá cirkadiální rytmicitou exprese enzymů těchto dvou metabolických drah. Také popisuje účinek systémového podání endotoxinu lipopolysacharidu (LPS) na expresi genů těchto enzymů. Naše pokusy využívaly potkany kmene Wistar ve stáří 30 dnů. Lipopolysacharid byl podán experimentální skupině čtyři hodiny před zhasnutím a odběry tkání, byly prováděny během 24 hodin ve tříhodinových intervalech. Pro účely této práce byly odebrány vzorky epifýz, jater a srdcí. Míra exprese měřených genů byla stanovena metodou RT-qPCR. Výsledky této práce potvrdily přítomnost cirkadiálního rytmu některých genů kynureninové dráhy v játrech a změny v expresi genů kynureninové dráhy a měřených genů transkripčních faktorů a hodinových genů.

*Klíčová slova:* kynureniny, melatonin, pineální žláza, játra, srdce, lipopolysacharid, cirkadiální systém, potkan

## **Abstract**

Tryptophan is an amino acid which has many functions in the body. Besides its participation in the production of proteins, it acts as a substrate for the kynurenine and methoxyindole metabolic pathways. The kynurenine pathway ends with the production of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), which is needed for the production of cellular energy. Thus, with increased energy demand during immune system activation, the activity of the kynurenine pathway is increased. Due to increased activity, it produces more immunoreactive and neuroactive metabolites such as kynurenic acid and quinolinic acid. These metabolites are involved in many processes in the body and affect the pathology of many diseases. Studies show that regulation of these metabolites could be a key innovation in the treatment of cancer, cardiovascular or neurodegenerative diseases. The methoxyindole pathway is another important tryptophan processing pathway. Its best-known metabolites are serotonin, which acts as a neurotransmitter, and melatonin, a hormone with immunomodulatory effects regulated by the circadian clock.

This work deals with the circadian rhythmicity of enzyme expression of these two metabolic pathways. It also describes the effect of systemic administration of lipopolysaccharide endotoxin on the expression of genes of these enzymes. Our experiments used Wistar rats at 30 days of age. The lipopolysaccharide was administered to the experimental group before tissue collection, which was performed at 24-hour intervals for 24 hours. For the purposes of this work, samples of the pineal gland, liver and heart were taken. The expression level of the measured genes was determined by the RT-qPCR method. The results of this work confirmed the presence of a circadian rhythm of some kynurenine pathway genes in the liver and changes in the expression of kynurenine pathway genes and measured transcription factor genes and circadian clock genes.

*Key words:* kynurenins, melatonin, pineal gland, liver, heart, lipopolysaccharide, circadian system, rat

## Seznam zkratek

AANAT - aralkylamin N-acetyltransferáza  
AhR – aryl hydrocarbon receptor  
AMPA – isoxazolepropionic acid receptor  
L-DOPA - levodopa  
ANOVA – analýza variance  
ATP - adenosintrifosfát  
BMAL1 – brain and muscle ARNT-like protein 1  
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát  
cDNA – komplementární DNA  
CEBP $\beta$  – CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$   
CKI – kasein kináza I  
CLOCK – circadian locomotor output cycles kaput  
CREB – cAMP-response element binding  
CRY - cryptochrome  
CT – cirkadiánní čas  
Ct – cycle threshold  
DD - dark/dark světelné podmínky  
GPR35 – G protein-coupled receptor 35  
HGPRT – hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza  
HIOMT – hydroxyindol-O-methyltransferáza  
ICER – inducible cAMP early represor  
IDO1 - indolamin 2,3-dioxygenáza 1  
IDO2 - indolamin 2,3-dioxygenáza 2  
IFN $\gamma$  – interferon  $\gamma$   
IL - interleukin  
KAT2 - Kynurenin aminotransferáza  
KMO - Kynurenin 3-monooxygenáza  
KYNU - kynurenináza  
LD - light/dark světelné podmínky  
LPS - lipopolysacharid  
MT1 – melatoninový receptor 1A  
MT2 – melatoninový receptor 1B

NAD<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid

NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NMDA receptor – N-methyl-D-aspartate receptor

*nr1d1*- gen pro jaderný receptor rodiny 1 skupiny D člen 1 (produktem je REV-ERB $\alpha$ )

PER - period

PHA - phytohemagglutinin

PAK – proteinkináza A

RHT – retinohypotalamický trakt

ROR $\alpha$  – retinoic acid-related organ receptor  $\alpha$

ROS – reaktivní formy kyslíku

RT-qPCR – real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce

SCG – horní cervikální ganglia

SCN – suprachiasmatická jádra hypotalamu

SEM – standardní chyba

STAT3 – signal transducer and activator of transription 3

TDO – tryptofan 2,3-dioxygenáza

TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$

TPH1 - Tryptofan hydroxyláza 1

TPH2 - Tryptofan hydroxyláza 2

ZT – zeitgeber time

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Cirkadiánní systém.....	2
2.1.1. Cirkadiánní rytmus a zánět.....	3
2.2. Kynureninová dráha.....	5
2.2.1. Enzymy kynureninové dráhy.....	6
2.2.2. Metabolity kynureninové dráhy.....	7
2.2.3. Kynureninová dráha a imunitní systém.....	8
2.2.4. Kynureninová dráha a neurologická onemocnění.....	10
2.2.5 Kynureninová dráha v játrech a v srdci.....	11
2.3. Methoxyindolová dráha.....	13
2.3.1. Enzymy methoxyindolové dráhy.....	13
2.3.2. Melatonin.....	15
2.3.2.1 Melatonin a cirkadiánní systém.....	15
2.3.2.2. Melatonin a imunitní systém.....	16
3. Cíle práce.....	19
4. Metody a vybavení.....	20
4.1. Laboratorní zvířata.....	20
4.2. Odběr tkání.....	20
4.3. Izolace RNA.....	20
4.4. Přepis do cDNA a preamplifikace.....	21
4.5. RT-qPCR.....	21
4.6. Vyhodnocení RT-qPCR.....	22
4.7 Statistické vyhodnocení.....	23
5. Výsledky.....	24
5.1. Bazální exprese genů.....	24

5.1.1. Bazální exprese genů kynureninové dráhy.....	24
5.1.2. Bazální exprese genů methoxyindolové dráhy.....	27
5.1.3. Bazální exprese transkripčních faktorů .....	29
5.2. Porovnání bazální a indukované exprese genů .....	32
5.2.1. Porovnání bazální a indukované exprese genů kynureninové dráhy .....	32
5.2.2. Porovnání bazální a indukované exprese genů methoxyindolové dráhy .....	36
5.2.3. Porovnání bazální a indukované exprese genů transkripčních faktorů .....	38
6. Diskuze .....	42
6.1. Bazální exprese genů kynureninové a methoxyindolové dráhy a transkripčních faktorů, a jejich cirkadiánní rytmy.....	42
6.2. Působení LPS na expresi genů kynureninové a methoxyindolové dráhy .....	45
7. Závěr .....	49
Seznam literatury .....	50



## 1. Úvod

Expresí celé řady genů je ve většině tkání ovlivněna rytmem cirkadiálních hodin a jejich expresí osciluje s délkou periody zhruba 24 hodin. Geny, které podmiňují udržení periodicity cirkadiálních hodin, jsou známé jako hodinové geny a slouží také jako transkripční faktory regulující tzv. hodinami-kontrolované geny. Cirkadiální mechanismus ale může řídit genovou expresí i nepřímo, např. regulovanou neuronální transmisí, jako v případě genů enzymů methoxyindolové dráhy, které se podílí na rytmické produkci melatoninu. Existuje ale velmi málo studií týkajících se cirkadiálního rytmu enzymů kynureninové dráhy. Jediné existující studie na toto téma pocházejí z šedesátých let minulého století, které nepřímo dokládají přítomnost rytmu expresí enzymu TDO2 v játrech díky potvrzení rytmicity koncentrace jeho produktu, kynureninu. Znalost rytmicity enzymů a metabolitů kynureninové dráhy může být ale užitečný nástroj pro inovaci v léčbě řady onemocnění. Enzymy kynureninové dráhy jsou odpovědné za produkci kyseliny chinolinové a kynurenové. Kyselina kynurenová působí neuroprotektivně a regulací imunitního systému dokáže působit jak prozánětlivě tak protizánětlivě. Kyselina chinolinová je naopak neurotoxická a také působí imunomodulačně. Další faktor ovlivňující expresí mnoha genů je aktivace imunitního systému. Je známo, že kynureninová metabolická dráha je indukována zvýšením produkce prozánětlivých cytokinů. Zánětlivý stav je součástí několika neurologických a kardiovaskulárních onemocnění jako je například deprese, Alzheimerova choroba, ateroskleróza a preeklampsie. Studie na těchto nemocech prokázaly, že jsou většinou doprovázené narušenou rovnováhou mezi metabolity kynureninové dráhy, a methoxyindolové dráhy.

Porozumění chování těchto metabolických drah v zánětlivých podmínkách a znalost jejich cirkadiálních rytmů je klíčovým krokem v inovaci léčby onemocnění, ve kterých byla prokázána jejich změna. Cílem této práce bylo prozkoumat účinek endotoxinu lipopolysacharidu na expresí enzymů kynureninové a methoxyindolové dráhy, hodinových genů *per2* a *nr1d1*, a transkripčních faktorů *stat3* a *icer* v epifyze, srdci a játrech potkana. Kontrolní skupiny zvířat jsme využili také k popisu cirkadiálních rytmů v expresí těchto genů ve zkoumaných tkáních. Naše výsledky mohou iniciovat další výzkum interakcí mezi cirkadiálním systémem a tryptofanovým metabolismem např. na farmakologické úrovni a vést k vylepšení léčby zmíněných onemocnění aplikací chronofarmakologických přístupů.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Cirkadiánní systém

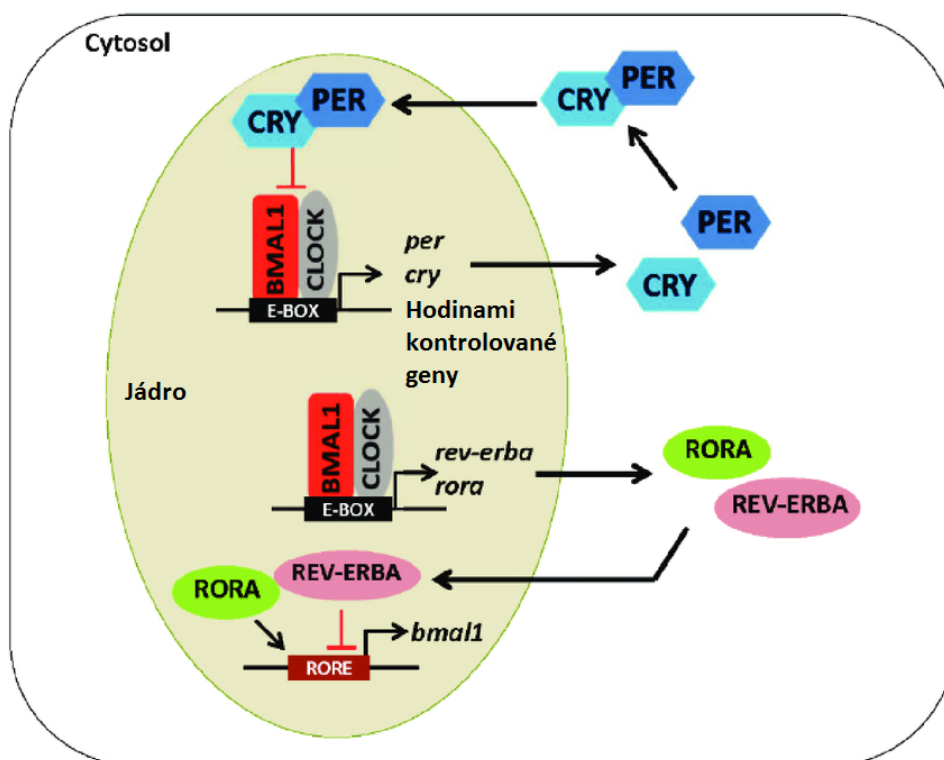
Cirkadiánní rytmus je oscilace fyziologického procesu s délkou periody zhruba 24 hodin, která je samoudržitelná a nepotřebuje vnější podněty ke svému zachování. Přítomnost tohoto endogenního rytmu u lidí byla vědecky zaznamenána v 60. letech 20. století, ve studii Jürgena Aschoffa. Studie spočívala v izolaci subjektů od veškerých venkovních známek denní doby, jako byl kontakt s vnějším světem, nebo denní světlo. Rytmus spánku a bdění a tělesné teploty navzdory této izolaci vykazovaly rytmus s periodou zhruba 24 hodin (Aschoff, 1965). Cirkadiánní rytmus je vytvářen cirkadiánními pacemakery a je synchronizován s časem vnějšího prostředí takzvanými zeitgebery, z nichž hlavním je střídání světla a tmy.

Centrálním pacemakerem cirkadiánního rytmu jsou suprachiasmatická jádra hypotalamu (SCN), která svou elektrickou a sekreční aktivitou řídí mnoho fyziologických rytmů po celém těle synchronizací periferních oscilátorů (Green & Gillette, 1982; Hakim *et al.*, 1991). Tyto oscilátory existují v mnoha různých tkáních, a některé z nich jsou schopné udržení vlastního cirkadiánního rytmu i po lézi SCN (Yamazaki *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004). Studie prokázaly, že některé periferní oscilátory v metabolicky aktivních orgánech je možné synchronizovat také dobou krmení nezávisle na rytmu SCN. Během experimentů bylo krmení potkanům podáváno v denních hodinách, tj. v době jejich klidové fáze. Jelikož potkani přirozeně přijímají potravu zejména v aktivní fázi dne, posun doby krmení způsobil i posun fáze rytmů jater, ledvin a slinivky břišní. Rytmus SCN ale nebyl změnou doby krmení ovlivněn (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001).

Endogenní rytmus s periodou přibližně 24 hodin vzniká díky zpětnovazebné transkripčně-translační smyčce takzvaných hodinových genů a jejich proteinů, navzájem ovlivňujících svou expresi, a také expresi hodinami kontrolovaných genů (Panda *et al.*, 2002). Smyčku tvoří řada hodinových genů, jejichž proteiny působí jako transkripční faktory (viz obrázek č. 1). Proteiny CLOCK a BMAL1 působí jako pozitivní transkripční faktory. Po translaci tyto dva proteiny tvoří heterodimer, který vstupuje do jádra, kde působí jako transkripční aktivátor pro geny *per* a *cry* (Gekakis *et al.*, 1998). Proteiny těchto dvou genů, PER a CRY, působí ve smyčce jako negativní transkripční faktory. V cytoplasmě se akumulují během dne, tvoří spolu heterodimer, a po vstupu do jádra brání heterodimeru CLOCK/BMAL1 v indukci transkripce jejich genů (Sangoram *et al.*, 1998). Zabráněním transkripce svých vlastních genů a jejich odbouráváním ubiquitinilací díky fosforylaci

kinázami CKI $\epsilon$  a CKI $\delta$ , se hladina koncentrace PER a CRY snižuje, dokud znovu neumožní dimeru CLOCK/BMAL1 indukovat jejich transkripci (Camacho *et al.*, 2001; Eide *et al.*, 2002).

Heterodimer CLOCK/BMAL1 také funguje jako transkripční faktor pro jaderné receptory REV-ERBa a ROR $\alpha$ , které působí na transkripci *bmal1*. Tyto proteiny vůči sobě působí antagonisticky. REV-ERBa inhibuje transkripci genu *bmal1*, a ROR $\alpha$  transkripci naopak indukuje, a je nezbytný pro jeho normální expresi. Účinek REV-ERBa je tedy prodloužení periody cirkadiálního systému, a účinek ROR $\alpha$  je zkrácení periody. Dohromady zvyšují amplitudu oscilace cirkadiálního rytmu (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).



**Obrázek č. 1: Schéma transkripčně translační smyčky cirkadiálních hodin.** Převzato a upraveno ze (Udoh *et al.*, 2015).

### 2.1.1. Cirkadiální rytmus a záněť

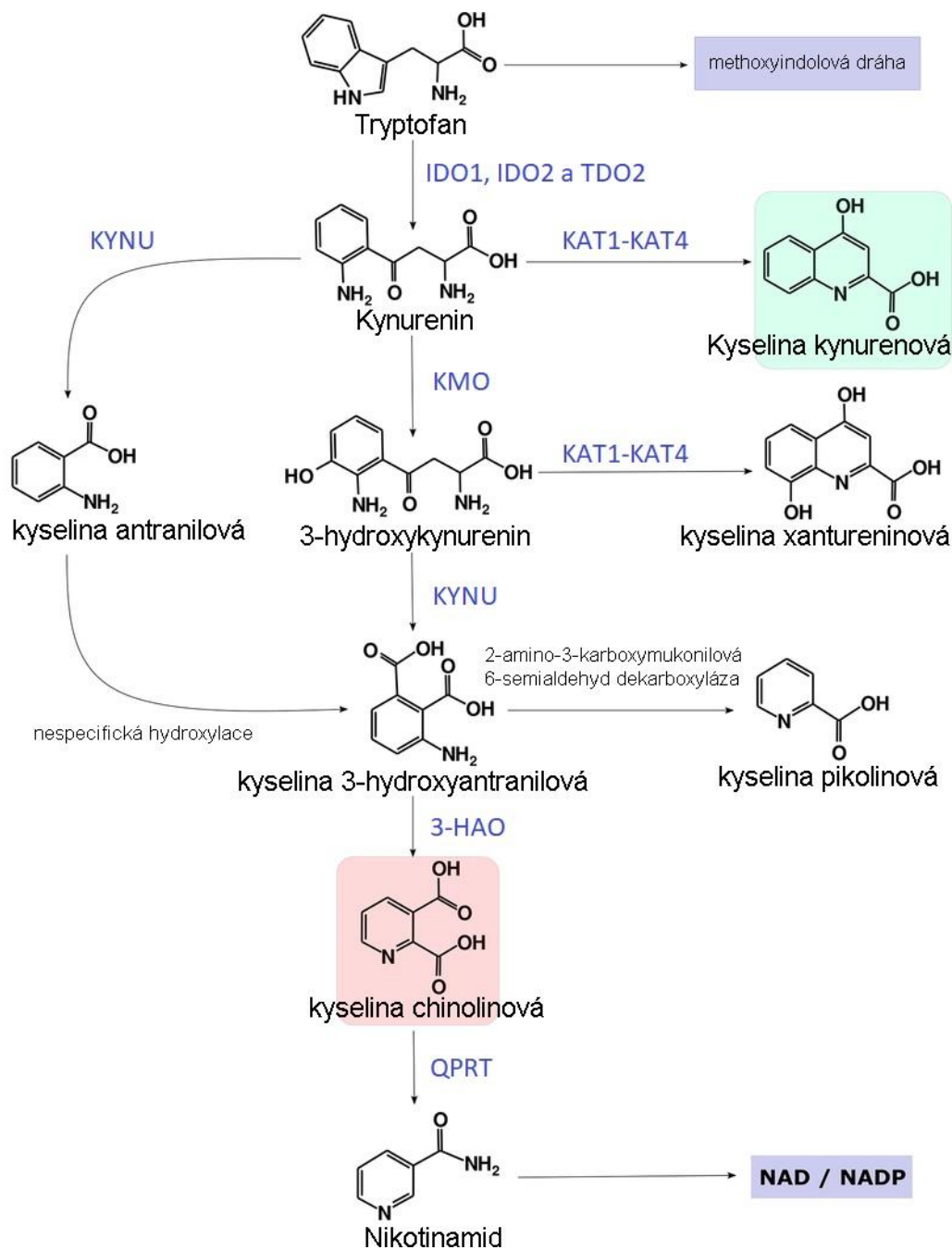
Je známo, že cirkadiální systém ovlivňuje odpověď imunitního systému na zánětlivý stav. Imunitní odpověď organismu se liší podle denní doby, kdy je imunogen zaveden do těla. Bylo prokázáno, že makrofágy vykazují vlastní cirkadiální rytmus, který ovládá zhruba 8% jejich transkriptomu. Geny se signifikantním rytmem exprese jsou geny produkující proteiny imunitní regulace, stresové odpovědi, nebo komponenty podílející se na fagocytóze. Proteiny s cirkadiálním rytmem své syntézy jsou například i prozánětlivé cytokiny tumor nekrotizující

faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a IL6, které vykazují peak během subjektivního dne (Keller *et al.*, 2009). Studie na myších potvrzující vliv cirkadiálních hodin na imunitu prokázala, že infekce parazitem *leishmania major* na konci subjektivního dne v čase CT12 způsobuje vyšší tvorbu chemokiny než při infekci na začátku subjektivního dne, což zároveň zvedá množství makrofágů a neutrofilů v místě infekce. Jelikož *L. major* tyto buňky napadá, vzniká při podání patogenu večer větší míra infekce (Kiessling *et al.*, 2017). Tyto výsledky korelují se studií, ve které po navození infekčního stavu u potkanů endotoxinem LPS byla zaznamenána dvakrát větší produkce prozánětlivých cytokinů, když byl LPS podán na začátku aktivní fáze zvířat v čase ZT14, oproti míře produkce po podání během odpočinkové fáze v čase ZT2 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2014). Důležitým mediátorem vlivu cirkadiálního rytmu na imunitní systém je jaderný receptor Rev-Erb $\alpha$ , který je zodpovědný za rytmus produkce cytokinu IL6 (Gibbs *et al.*, 2012). IL6 zároveň zprostředkovává aktivaci transkripčního faktoru STAT3 (z anglického Signal transducer and activator of transcription 3), který je nedílnou součástí signalizačních drah imunitního systému v mozku a působí především aktivací astrocytů (Haim *et al.*, 2015; Rummel *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2010). Studie naší laboratoře vydaná roku 2018 (Moravcová *et al.*) potvrdila cirkadiální rytmicitu exprese *stat3* v SCN. Výsledky také ukázaly, že po podání LPS v čase ZT15 je indukce exprese *stat3* asi desetkrát větší, než když je LPS podán v čase ZT6, což koreluje s výsledky předchozích zmíněných studií a potvrzuje, že je STAT3 součástí signalizace mezi cirkadiálním rytmem a imunitním systémem (Moravcová *et al.*, 2018). Cirkadiální rytmicita odpovědi imunitního systému může přispívat také k patologii některých onemocnění. Toto je potvrzeno například u revmatoidní artritidy, kde u pacientů byl potvrzen cirkadiální rytmus hladiny cytokinu IL6 s peakem brzy ráno. Tento peak koreluje s časem výskytu nejzávažnějších symptomů tohoto onemocnění (Arvidson *et al.*, 1994).

Tento vliv je navíc oboustranný, jelikož je dokázáno, že aktivace imunitního systému způsobuje fázový posun endogenního cirkadiálního rytmu. Tento efekt byl prokázán intraperitoneálním podáním LPS myším a měřením rytmu jejich aktivity. Zpoždění rytmu o  $43 \pm 10$  minut bylo pozorováno u myši, kterým byl podán LPS v čase CT15, tedy na začátku subjektivní noci. Posun rytmu nebyl pozorován po předchozím podání inhibitoru transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, což naznačuje jeho funkci mediátoru této reakce (Marpegán *et al.*, 2005). Navíc je známo, že LPS neprochází hematoencefalickou bariérou a pouze se váže na receptory endoteliálních buněk, přes které signalizuje a způsobuje zánětlivou reakci v mozku (Banks & Robinson, 2010; Singh & Jiang, 2004).

## 2.2. Kynureninová dráha

Kynureninová dráha je metabolická dráha začínající přeměnou aminokyseliny tryptofanu a končící vznikem metabolitu  $\text{NAD}^+$ , který je klíčovou látkou například při procesech beta oxidace, glykolýzy a Krebsova cyklu. Tryptofan je esenciální aminokyselina potřebná k syntéze proteinů a produkci různých hormonů a látek, které jsou nezbytné k fungování organismu za fyziologických podmínek. Je také jednou z aminokyselin, kterou si lidské tělo neumí produkovat samo a je tedy potřeba ho přijímat v potravě. Většina krevní zásoby tryptofanu je v plasmě navázána na albumin, a volný krevní tryptofan se může dostat do mozku přes hematoencefalickou bariéru (Fernstrom & Wurtman, 1971; McMenamy & Oncley, 1958). Kynureninová dráha dává také vzniku několika dalším metabolitům, z nichž některé mají významné neuromodulační a imunomodulační vlastnosti (viz. Obrázek č. 2). Tato dráha a její metabolity jsou tak předmětem mnohých studií týkajících se zejména různých neurologických a imunitních onemocnění.



**Obrázek č. 2:** Schéma kynureninové dráhy (převzato a upraveno ze Savitz, 2020)

### 2.2.1. Enzymy kynureninové dráhy

Prvními enzymy kynureninové dráhy jsou indolamin 2,3-dioxygenáza 1 (IDO1), nověji popsána indolamin 2,3-dioxygenáza 2 (IDO2) a tryptofan dioxygenáza (TDO). Všechny tyto enzymy katalyzují přeměnu tryptofanu na kynurenin. *Ido1* je více exprimována v některých buňkách imunitního systému, jako jsou makrofágy a dendritické buňky (Gupta *et al.*, 2012). Významná exprese genu *ido1* byla ale také nalezena v nadvarleti, prostatě, placentě, slezině, brzlíku, plicích a trávicím traktu (Dai & Zhu, 2010). Exprese *ido1* je indukována zánětlivým

stavem, zejména prozánětlivým cytokinem IFN $\gamma$  (Takikawa *et al.*, 1999). IDO2 byla objevena až v roce 2007 a má největší hladinu v játrech, ledvinách, mozku a nadvarleti. Zároveň vykazuje zvýšenou koncentraci v myších s delecí IDO1, což poukazuje na kompenzační systém exprese těchto enzymů (Ball *et al.*, 2007; Fukunaga *et al.*, 2012). *Tdo* je exprimován zejména v játrech, kde funguje jako enzym udržující fyziologickou hladinu systémového tryptofanu (Knox & Mehler, 1950). Exprese *tdo* byla také potvrzena v hippocampu, mozečku, striatu a mozkovém kmeni, i když v těchto tkáních byla hladina *tdo2* mRNA mnohem nižší než v játrech (Kanai *et al.*, 2009). Studie z 60. let naznačily, že jaterní TDO vykazuje denní rytmus ve své aktivitě s peakem v nočních hodinách a to jak u myši, tak u člověka (Rapoport *et al.*, 1966; Rapoport & Beisel, 1968). TDO je také odpovědná za udržování fyziologické hladiny tryptofanu v mozku, a tím působí jako limitující enzym syntézy serotoninu z tryptofanu (Kanai *et al.*, 2009). Díky schopnosti regulace hladiny serotoninu hraje TDO roli v modulaci chování, jak bylo prokázáno například v myších s delecí TDO, které se vyznačovaly méně úzkostlivým chováním oproti kontrolám díky zvýšené hladině serotoninu (Funakoshi *et al.*, 2011).

Kynurenináza (KYNU) je další enzym kynureninové dráhy zkoumaný v této práci. KYNU je zodpovědná za metabolizaci kynureninu na kyselinu antranilovou. Dále jsme se zabývaly expresí kynurenin 3-monooxygenázy (KMO), která metabolizuje kynurenin na 3-hydroxykynurenin, a kynurenin aminotransferázy 2 (KAT2), která metabolizuje kynurenin na neurotoxickou kyselinu kynurenovou a 3-hydroxykynurenin na kyselinu xanthureninovou. Protein KAT2 se také nazývá alfa-aminoadipová aminotransferáza a je kódována genem *aadat*.

### **2.2.2. Metabolity kynureninové dráhy**

Různé metabolity kynureninové dráhy mají různé neuromodulační účinky. Kyselina kynurenová je produkována primárně v astrocytech a její fyziologická koncentrace v savčím mozku je asi 10-150 nM (Kiss *et al.*, 2003; Moroni *et al.*, 1988). Kyselina kynurenová je nejznámější pro své působení jako antagonist excitačních aminokyselinových receptorů v mikromolárních koncentracích, přičemž má vysokou afinitu pro glutamátový receptor NMDA, kde se váže na vazebné místo pro glycin, které není citlivé na inhibitor strychnin. Dokáže tak působit proti nadměrné aktivaci NMDA receptorů, která vede k excitotoxicitě (Kessler *et al.*, 1989). Kyselina kynurenová dále dokáže v nanomolárních koncentracích inhibovat výlev glutamátu způsobený aktivací NMDA autoreceptorů. Potvrdila to studie na potkaních hippocampech, kde koncentrace 10 nM kyseliny kynurenové inhibovala výlev až

poloviny glutamátu, který byl vyvolán ovlivněním 10  $\mu$ M NMDA spolu s 1  $\mu$ M koagonisty NMDA receptoru glycinu (Luccini *et al.*, 2007).

Dalším významným metabolitem kynureninové dráhy je kyselina chinolinová. Tento metabolit vykazuje excitotoxické vlastnosti díky schopnosti aktivovat NMDA glutamátový receptor (Foster *et al.*, 1983). Největší produkce kyseliny chinolinové probíhá při aktivaci imunitního systému v makrofázích a mikroglíích (Guillemin & Brew, 2016). Excitotoxicita kyseliny chinolinové může přispívat ke vzniku neurodegenerativních chorob, jako je například Alzheimerova choroba (Guillemin *et al.*, 2007).

### **2.2.3. Kynureninová dráha a imunitní systém**

Jak bylo již řečeno, některé metabolity kynureninové dráhy mají imunomodulační účinky, ale i kynureninová dráha je ovlivněna aktivitou imunitního systému. Exprese *idol* může být například zvýšena prozánětlivým cytokinem IFN $\gamma$ . Monitorování její aktivity nebo exprese tak může být pomocným ukazatelem pravděpodobné prognózy některých onemocnění, jako jsou některé typy rakoviny nebo tuberkulóza (Ino *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2012). Podle studie provedené na buněčných kulturách z lidských fetálních mozků je produkce proteinu IDO přítomna v makrofázích, mikroglíích, neuronech a astrocytech po stimulaci IFN $\gamma$ , i když produkce v mikroglíích je mnohokrát větší. Tato studie také ukázala, že neurony a astrocyty mají schopnost katabolizovat kyselinu chinolinovou, a naopak mikroglie a makrofágy mohou kyselinu chinolinovou produkovat. Vzhledem k neurotoxické povaze kyseliny chinolinové je možné soudit, že při zánětlivých a neurodegenerativních onemocněních mozku působí neurony a astrocyty proti neurotoxické kyselině chinolinové produkované mikroglíemi a infiltrujícími makrofágy (Guillemin *et al.*, 2004). U případů kolorektálního karcinomu koreluje snížení počtu CD3<sup>+</sup> T lymfocytů v místě nádoru se zvýšenou expresí *idol* v maligních buňkách (Brandacher *et al.*, 2006). Tento efekt je pravděpodobně následkem snížení množství tryptofanu v místě nádoru, což naruší buněčný cyklus T lymfocytů (Munn *et al.*, 1999). V prostředí bez tryptofanu proliferace T lymfocytů je zastavena uprostřed G1 fáze před začátkem syntézy DNA. Bez přístupu k tryptofanu jsou T lymfocyty také náchylnější k buněčné smrti apoptózou (Lee *et al.*, 2002). Metabolit tryptofanu kynurenin také zvyšuje produkci regulačních T lymfocytů, které působí jako buňky imunitního systému regulující imunitní toleranci. Dosahuje toho interakcí s receptorem pro aromatické uhlovodíky (AhR) T lymfocytů, které se díky tomu diferencují na Fox P3<sup>+</sup> T regulační buňky (Mezrich *et al.*, 2011). Tímto nepřímým způsobem může IDO1 působit protizánětlivě regulací proliferace T lymfocytů během zánětlivé odpovědi v mozku. Předvedla to studie provedena na myších



modelech roztroušené sklerózy, která ukázala, že po inhibici IDO signifikantně vzrostla závažnost průběhu onemocnění (Kwidzinski *et al.*, 2005).

Zvýšená metabolizace tryptofanu na kynurenin ale také podporuje funkci imunitního systému ve smyslu zvýšení přísunu energie imunitním buňkám během vysokého energetického vyčerpání v zánětlivých podmínkách. Díky posunu metabolismu tryptofanu ke kynureninové dráze vzniká více konečného metabolitu  $\text{NAD}^+$ , který je potřeba pro funkci mnohých procesů potřebných k výrobě ATP. Tuto teorii podporuje nález, že podání endotoxinu LPS vyvolá v mozku potkana zvýšení koncentrace KMO, ale ne KAT2, což svádí kynureninovou dráhu k výrobě  $\text{NAD}^+$  místo ke kyselině kynurenové a jejím metabolitům (Connor *et al.*, 2008).

Kyselina kynurenová vykazuje zvýšenou koncentraci v zánětlivých podmínkách širokého spektra zánětlivých onemocnění (Heyes *et al.*, 1992). Kyselina kynurenová také působí jako ligand receptoru spřaženým s G proteinem 35 (GPR35) při vyšších než bazálních koncentracích v plasmě. Nejen že se na receptor váže, ale stimuluje jeho internalizaci. Zároveň bylo ve stejné studii zjištěno, že kyselina kynurenová inhibuje v monocytech sekreci  $\text{TNF}\alpha$ , která je indukována podáním LPS. Jelikož GPR35 je silně exprimován v imunitních buňkách, je možné, že tento protizánětlivý účinek kyseliny kynurenové vede právě přes tyto receptory (Wang *et al.*, 2006). Další mechanismus jak kyselina kynurenová působí na imunitní systém přes aktivaci GPR35 je indukce adheze leukocytů. Tento způsob imunomodulace působí naopak prozánětlivě. K tomuto účinku je potřeba vyšší než plazmatická bazální koncentrace kyseliny kynurenové, která se vyskytuje v zánětlivých podmínkách (Barth *et al.*, 2009). Kvůli prozánětlivým účinkům kyseliny kynurenové stojí za zmínku potíže s jejím vylučováním u pacientů s chronickým renálním selháním, u kterých se kyselina kynurenová a jiné metabolity kynureninové dráhy hromadí v těle. Zvýšená koncentrace kyseliny kynurenové, kyseliny chinolinové a kynureninu je při chronickém renálním selhání také způsobena zvýšenou aktivitou enzymu IDO (Scheffold *et al.*, 2009). Studie na potkaních modelech chronického renálního selhání ukázala, že zvýšená hladina metabolitů kynureninové dráhy, včetně kyseliny kynurenové, pozitivně korelovala s vážností stavu (Pawlak *et al.*, 2001). Po léčbě hemodialýzou u lidských pacientů zůstává hladina kyseliny kynurenové v séru asi desetkrát vyšší než je bazální fyziologická hodnota (Pawlak *et al.*, 2002). Vysoká hladina metabolitů kynureninové dráhy může být spjatá s několika symptomy chronického renálního selhání jako je vyšší citlivost k infekci a neurotoxicita.

Imunomodulační účinky metabolitů kynureninové dráhy také vychází z jejich schopnosti regulovat produkci cytokinů. Studie efektu LPS a toxinu phytohemagglutininu (PHA) na lidskou krev hodnotila jejich odlišné působení. V dané studii kynurenin, kyselina kynurenová, kyselina chinolinová i kyselina xantureninová snižovaly produkci IFN $\gamma$  indukovanou zmíněnými toxiny. Jelikož je exprese enzymu IDO1 ovlivněna hladinou IFN $\gamma$ , snížením jeho produkce tvoří metabolity kynureninové dráhy systém negativní zpětné vazby. Kyselina chinolinová však dále vykazovala prozánětlivé účinky snižováním hladiny protizánětlivého cytokinu IL-10. Kyselina kynurenová měla naopak protizánětlivý účinek inhibicí stimulované produkce TNF $\alpha$  (Maes *et al.*, 2007). Konečný efekt kynureninové dráhy závisí na typu buňky a jaké její metabolity má schopnost produkovat.

#### **2.2.4. Kynureninová dráha a neurologická onemocnění**

V posledních letech vzrůstá počet studií zabývajících se rolí kynureninové dráhy v psychiatrických a neurodegenerativních chorobách. Tyto studie předkládají množství důkazů o tom, že poruchy v regulaci kynureninové dráhy jsou jednou z příčin mnoha neurologických onemocnění.

Jedním psychiatrickým onemocněním ovlivněným kynureninovou dráhou je deprese. Je potvrzeno, že deprese je asociovaná s přítomností zánětlivých procesů a prozánětlivých látek jako je C-reaktivní protein, IL-1 a IL-6 (Howren *et al.*, 2009). Zánětlivé podmínky navozené podáním endotoxinu navodilo i u zdravých lidí pocity odpojení od společnosti a depresivní pocity (Eisenberger *et al.*, 2010). Pocity deprese jsou také spojeny s vyšší koncentrací kyseliny chinolinové a kynureninu u zdravých lidských subjektů, kterým je vyvolána zánětlivá odpověď podáním endotoxinu (Kruse *et al.*, 2019). Mechanismus navození depresivních stavů přes kynureninovou dráhu v zánětlivých podmínkách je pravděpodobně spojen s aktivací NMDA receptorů zvýšenou koncentrací kyseliny chinolinové. Studie potvrzující tuto hypotézu ukázala, že podáním ketaminu, který je antagonist NMDA receptoru a zároveň podporuje glutamátovou neurotransmisi přes AMPA receptory, společně s dávkou LPS se redukuje symptomy deprese u myší. Podání ketaminu zároveň nesnižovalo míru aktivity enzymu IDO (Walker *et al.*, 2013).

Deprese se může projevit také formou poporodní deprese. Ta se objevuje jako dočasný stav u velkého procenta žen během několika dní po porodu. Studie ukázaly, že projevy poporodní deprese jsou spojeny se sníženou koncentrací tryptofanu a vyšším poměrem kynurenin/tryptofan v mozku a plazmě po porodu, což nasvědčuje vyšší

metabolizaci tryptofanu na kynurenin. Matky se stabilním psychickým stavem naopak tento poměr vykazovaly nižší (Kohl *et al.*, 2005; M'Bailara *et al.*, 2006). Zároveň je známo, žeIDO produkované v makrofázích zpracováním tryptofanu zabraňuje proliferaci T lymfocytů v placentě, což brání imunitní reakci proti plodu. Inhibice katabolismu tryptofanu tak umožní imunitní reakci mateřských lymfocytů vůči plodu (Munn *et al.*, 1998). Poporodní deprese tedy může být následkem ochrany plodu proti odmítnutí tělem matky.

Dalšími neurologickými onemocněními, která mají spojitost s kynureninovou dráhou, jsou neurodegenerativní onemocnění Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. U Alzheimerovy choroby byla zjištěna snížená koncentrace kyseliny kynurenové v plazmě pacientů, i když koncentrace kynureninu a aktivita enzymů KAT1 a KAT2, které jsou zodpovědné za produkci kyseliny kynurenové, zůstaly nezměněné (Hartai *et al.*, 2007). Tato fakta poukazují na to, že v patologii Alzheimerovy choroby figuruje excitotoxická kyselina chinolinová. Přítomnost kyseliny chinolinové byla nalezena v amyloidních placích, což jsou oblasti s akumulací amyloidu  $\beta$  v mozku postiženém Alzheimerovou chorobou (Guillemin *et al.*, 2007). Parkinsonova choroba je také ovlivněna metabolity kynureninové dráhy. U pacientů s Parkinsonovou chorobou se v plazmě nachází zvýšená koncentrace 3-hydroxykynureninu, metabolitu vznikajícího z kynureninu pomocí enzymu KMO. 3-hydroxykynurenin je neurotoxin způsobující buněčnou smrt oxidativním stresem. Pacienti měli také zvýšený poměr koncentrace kyselina chinolinová/kyselina kynurenová v mozkomíšním moku v porovnání se zdravými kontrolami. Tyto zvýšené koncentrace neurotoxických metabolitů kynureninové dráhy navíc korelovaly s těžším průběhem onemocnění (Heilman *et al.*, 2020; Okuda *et al.*, 1996). Studie na potkanech ukázala, že neurotoxicitě navozené kyselinou chinolinovou a následné ztrátě dopaminergních neuronů lze zabránit zvýšením koncentrace kyseliny kynurenové v mozku (Miranda *et al.*, 1997). Zvýšení tvorby kyseliny kynurenové inhibicí aktivity enzymu KMO ve studii na opicích navíc významně snížilo vážnost neovladatelných pohybů navozených častým léčením podávaným pacientům s Parkinsonovou chorobou, L-DOPA (Grégoire *et al.*, 2008).

### **2.2.5 Kynureninová dráha v játrech a v srdci**

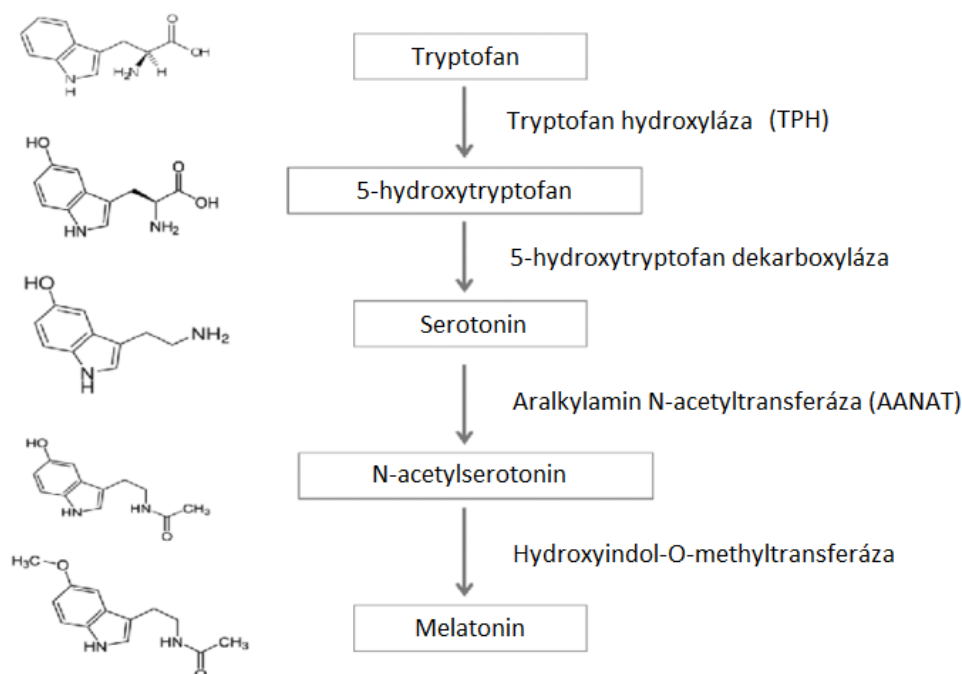
Není jednoznačně jisté, zda kynureninová dráha přímo hraje roli v patologii kardiovaskulárních onemocnění. Existují ale studie podporující myšlenky, že metabolismus tryptofanu nějakým způsobem přispívá k prognóze těchto onemocnění. První enzym kynureninové dráhy, IDO, se exprimuje mimo jiné i v endoteliálních buňkách (Xiao *et al.*, 2013). IDO je navíc přítomna v arteriosklerotických placích při pokročilé arterioskleróze. Jak

bylo již naznačeno v kapitole Kynureninová dráha a imunitní systém, je možné, že aktivita IDO snižuje koncentraci tryptofanu a tím snižuje produkci T lymfocytů, čímž působí protizánětlivě. Inhibice IDO navíc podporuje zánět cév u myši s indukovanou hypercholesterolemií a zhoršuje arteriosklerózu (Niinisalo *et al.*, 2010; Polyzos *et al.*, 2015). Teorie protizánětlivého účinku IDO v kardiovaskulárním systému byla navíc podpořena studií, ve které alogenní štěpy srdce projevily delší životnost, když byly transdukovány genem enzymu IDO. Tato studie prokázala, že tolerance štěpu byla způsobena zvýšenou aktivitou regulačních T lymfocytů a kontrolou T lymfocytů reagujících na štěp zprostředkovanou vyšší expresí *ido* (Yu *et al.*, 2008) Studie také prokázaly, že je kynureninová dráha spjatá s regulací krevního tlaku. Kynurenin má schopnost vasodilatace, která byla předvedena na prasečích koronárních tepnách. Zároveň jeho podání snižuje krevní tlak u potkanů s navozenou hypertenzí. Stejný účinek mělo podání tryptofanu, avšak jen v přítomnosti aktivního enzymu IDO (Wang *et al.*, 2010). Zároveň v lidských případech preeklampsie, těhotenského hypertenzního onemocnění, je pozorována signifikantně nižší exprese enzymu IDO. To může způsobovat zvýšený krevní tlak a zároveň vyšší systémovou zánětlivost (Kudo *et al.*, 2003). Krevní tlak může být ovlivněn i KYNU, která snižuje hladinu kynureninu v mozku a tak působí zvýšení krevního tlaku (Mizutani *et al.*, 2002). Kynureninová dráha má komplexní účinek na kardiovaskulární onemocnění. Proto se ovládání exprese a aktivity jejich enzymů jeví jako nový zajímavý přístup k léčbě.

Kynureninová dráha v játrech zahájena enzymem TDO2 metabolizuje většinu systémového tryptofanu (Kanai *et al.*, 2009). Kynureninová dráha také může být v játrech modulována transkripčním faktorem CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEBPβ). Studie na myších ukázala, že aktivace CEBPβ v důsledku hypoxie indukuje expresi jak genu *tdo1* tak *tdo2* a zároveň tím zvyšuje hladinu kynureninu v krevním séru. Kynurenin přechází přes hematoencefalickou bariéru z krve do mozku, kde se metabolizuje na kyselinu kynurenovou, a tím to způsobem vyšší hladina kynureninu produkovaná v játrech způsobuje únavu a sníženou motorickou aktivitu jak bylo pozorováno u myši (Yang *et al.*, 2019). Kyselina kynurenová a chinolinová ale na rozdíl od kynureninu přechází přes hematoencefalickou bariéru v malém množství (Fukui *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 2012).

## 2.3. Methoxyindolová dráha

Metabolismus tryptofanu může vést nejen k produkci kynureninů, ale také k produkci jiných metabolitů, jako jsou hormony serotonin a melatonin. Tato metabolická dráha se nazývá methoxyindolová dráha (viz obrázek č. 3).



**Obrázek č. 3:** Schéma syntézy melatoninu. Převzato a přeloženo z Bravo *et al.*, 2012.

### 2.3.1. Enzymy methoxyindolové dráhy

Prvními enzymy podílejícími se na metabolizaci tryptofanu jsou tryptofan hydroxyláza 1 (TPH1) a tryptofan hydroxyláza 2 (TPH2). Ty umožňují přeměnu tryptofanu na 5-hydroxytryptofan. TPH2 se nachází hlavně v mozkovém kmeni (Zhang *et al.*, 2004). TPH1 se exprimuje na více místech, a to například v epifýze a ve střevech (Darmon *et al.*, 1988). U TPH1 také byla prokázána cirkadiánní rytmicita aktivity a exprese v epifýze s největší hladinou v nočních hodinách, kdy hraje důležitou roli v tvorbě melatoninu (Shibuya *et al.*, 1977; Sugden, 2003). Ve střevech je enzym exprimován v neuroendokrinních enterochromafinních buňkách, které regulují gastrointestinální motilitu díky hormonu serotoninu, i v normálních enterocytech duodena (Boullin, 1964; Meyer & Brinck, 1999; Walther *et al.*, 2003). Expresse *tph1* v játrech je sporná, jelikož aktivita TPH byla nalezena v játrech potkana ještě před objevením dvou isoform, a novější studie prokázala přítomnost exprese genu *tph1* v homogenizovaných potkaních játrech. Ve studii provedené na lidských

játrech ale exprese *tph1* nalezena nebyla (Hakanson & Hoffman, 1967; Meyer & Brinck, 1999; Valdés-Fuentes *et al.*, 2015).

Dalším důležitým enzymem je aralkylamin N-acetyltransferáza (AANAT). Role tohoto enzymu v methoxyindolové dráze je přeměna serotoninu na N-acetylserotonin acetylací. Exprese genu *aanat* je velmi silná zejména v epifýze a v retině. V obou tkáních vykazuje exprese genu cirkadiánní rytmus a u všech savců je patrný mnohonásobný nárůst aktivity enzymu v noci (Binkley *et al.*, 1979). Tyto rytmy jsou potlačeny v podmínkách stálého světla, ale zachovány v podmínkách stálé tmy nebo v případě slepoty, což dokazuje endogenní podstatu těchto rytmů (David C. Klein & Weller, 1970). Cirkadiánní rytmus AANAT je řízen cirkadiánními hodinami v SCN, které jsou synchronizovány světlem vnějšího prostředí. V noci dochází k aktivaci sympatických neuronů v horních cervikálních gangliích (SCG), které stimulují epifýzu (Nishino *et al.*, 1976). Neurotransmitter noradrenalin se uvolní na synapsích s pinealocyty. Tam se váže na  $\alpha 1$  a  $\beta 1$  adrenergní receptory, které signalizují syntézou cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) (D. C. Klein *et al.*, 1983; McLeod & Cairncross, 1995; Strada *et al.*, 1972). V pinealocytech je díky cAMP aktivována cAMP dependentní proteinkináza A (PKA), která aktivuje AANAT fosforylací. Díky fosforylaci může být na N-terminální konec AANAT navázán dimer proteinu 14-3-3, který AANAT brání před proteolýzou. Ve dne je tato signalizační dráha inhibována SCN a dochází tak k degradaci AANAT (Ganguly *et al.*, 2001). Vzrůst cAMP zároveň umožní fosforylaci CRE vazebného proteinu (CREB), který v epifýze zůstane ve vysoké koncentraci během první poloviny noci. CREB funguje jako transkripční faktor pro AANAT, a tak udržuje jeho vysokou noční koncentraci. Zároveň koncentrace CREB v pinealocytech v noci převyšuje koncentraci transkripčního inhibitoru inducible cAMP early represor (ICER) (Maronde *et al.*, 1999). ICER je represor transkripce indukované cyklickým AMP, a tak v epifýze inhibuje expresi *aanat*. Jeho nejvyšší koncentrace v epifýze je v noci a jeho exprese je spouštěna cAMP dependentní adrenergní signalizací (Stehle *et al.*, 1993). Transkripce i aktivita AANAT je rychle potlačena působením světla v noci. Světlo je v retině vnímáno fotopigmentem melanopsinem ve specializovaných gangliových buňkách retiny. Z retiny je signál veden retinohypotalamickým traktem (RHT) do SCN (Hannibal *et al.*, 2002). Světlem indukovaná aktivita SCN inhibuje aktivitu paraventriculárního jádra hypotalamu a tím i aktivitu SCG, které inervují epifýzu.

Posledním enzymem v syntéze melatoninu je hydroxyindol-O-methyltransferáza (HIOMT). HIOMT katalyzuje přeměnu N-acetylserotonin na melatonin, a je limitujícím

enzymem této reakce v noci, jelikož substrátu je v nočních hodinách nadbytek díky aktivitě AANAT (Liu & Borjigin, 2005). Jako AANAT, HIOMT také vykazuje cirkadiánní rytmus s největší koncentrací v noci, ale po celý den vykazuje vysoké koncentrace. Jeho exprese je také regulována adrenergní signalizací noradrenalinu, stejně jako exprese *aanat* (Ceinos *et al.*, 2004; Gauer & Craft, 1996).

### **2.3.2. Melatonin**

Melatonin je dalším významným metabolitem methoxyindolové dráhy. Řadí se mezi indolaminové hormony. Byl izolován z hovězích epifýz a pojmenován roce 1958 (Lerner *et al.*, 1958). Melatonin je primárně syntetizován v epifýze, neboli pineální žláze, kde vykazuje cirkadiánní rytmus regulovaný z prostředí světlem a endogenními hodinami v SCN (Wurtman *et al.*, 1963). Hladina melatoninu je tedy nejvyšší v nočních hodinách kolem půlnoci, a nejnižší odpoledne kolem třetí hodiny (Hikichi *et al.*, 2011). Syntéza extrapineálního melatoninu byla potvrzena v mnoha jiných tkáních, jako je například čočka a sítnice, kde se také potvrdil cirkadiánní rytmus (Abe *et al.*, 2000; Tosini & Menaker, 1998). Dále je syntetizován v gastrointestinálním traktu, v lymfocytech, monocytech a makrofázích, a v mnoha jiných tkáních, a to zejména v mitochondriích (Carrillo-Vico *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004; Stefulj *et al.*, 2001; Suofu *et al.*, 2017). Je tedy zřejmé, že melatonin je mnohostranný hormon s mnoha funkcemi působící v mnoha tkáních.

Melatonin se váže zejména na dva vysokoafinitní receptory typu 1A (MT1) a 1B (MT2). Oba tyto receptory jsou spojené s inhibičními G-proteiny, které signalizují inhibicí adenylátcyklázy, následným poklesem koncentrace cAMP a snížením aktivity cAMP dependentní PKA (Capsoni *et al.*, 1994).

#### **2.3.2.1 Melatonin a cirkadiánní systém**

Melatonin je důležitým faktorem v udržování fyziologických procesů v cyklu spánku-bdění. Významný vliv má na regulaci tělesné teploty během tohoto cyklu, kdy teplota přirozeně kolísá asi o 0,5 °C a je nejnižší před probuzením (Day, 1941). U lidí melatonin reguluje a snižuje teplotu v noci vasodilatačním působením na periferní cévy (Van Der Helm-Van Mil *et al.*, 2003). Vasodilatace je zřejmě regulovaná receptory typu MT2 v artériích, zatímco typ MT1 má účinky vazokonstrikční (Masana *et al.*, 2002). Dalším způsobem jak melatonin působí je prodlužování délky spánku. Delší trvání vyšší koncentrace melatoninu v plasmě bylo nalezeno u lidí, kteří mají přirozeně delší spánek než u lidí, kteří mají přirozený spánek kratší (Aeschbach *et al.*, 2003). Tento efekt může být následkem schopnosti melatoninu

působit inhibičně na aktivitu neuronů SCN. Melatonin se na neuronech SCN naváže na receptory MT1, které regulují draslíkové kanály a způsobují hyperpolarizaci na cytoplazmatické membráně (Jiang *et al.*, 1995). Útlum zvýšené denní aktivity SCN, či její zpoždění vede k prodloužení spánku. Vztah mezi typem M1 melatoninového receptoru a regulací spánku byl nastíněn i v korelační studii, ve které autoři měřili expresi melatoninového receptoru MT1 v neuronech SCN u starých lidí, a lidí v poslední fázi Alzheimerovy choroby. Staří lidé i lidé s Alzheimerovou chorobou trpí spánkovými poruchami a krátkým spánkem. U obou skupin byla exprese MT1 v neuronech SCN signifikantně snížena oproti kontrolní skupině mladých lidí (Wu *et al.*, 2007).

Syntézu melatoninu ovlivňuje také roční období. S měnící se délkou noci se mění i hladina melatoninu a ovlivňuje fyziologické cirkunální procesy. Jedna z prvních prací na toto téma demonstrovala na modelu syrského křečka, že injekce melatoninu v odpoledních hodinách imitovaly krátcí se fotoperiodu. To vyvolalo u křečků fyziologické změny odpovídající krátké fotoperiodě, jako je nabírání váhy, zvýšení příjmu potravy a nabírání tělesného tuku (Bartness & Wade, 1984).

### **2.3.2.2. Melatonin a imunitní systém**

Melatonin má důležité a dobře studované účinky na imunitní systém, které jsou komplexní a různorodé. Podle podmínek působí protizánětlivě nebo prozánětlivě. Melatonin může působit také na vývoj imunitního systému. Například odstranění epifyzy šestitýdenním potkanům mělo za následek snížení imunitní reakce na vpich hovězího sérového albuminu, což se projevilo menším kožním edémem v porovnání s kontrolní skupinou s intaktní epifyzou. Imunitní reakce byla také snížena oproti kontrolní skupině v případě transplantace alogenního kožního štěpu (Jankovic *et al.*, 1970).

Protizánětlivé účinky melatoninu jsou zajištěny různými způsoby. Jedním způsobem je schopnost melatoninu působit jako antioxidant. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou tvořeny v mitochondriích jako vedlejší produkt aerobní respirace. Při akumulaci vysoké koncentrace ROS může docházet k poškození proteinů, DNA, i k dysfunkci mitochondrií. Melatonin a jeho metabolity při styku s ROS vytváří antioxidační kaskádu, která přímo neutralizuje ROS. Melatonin je při kontaktu s některými ROS metabolizován na cyklický 3-hydroxymelatonin, který má také antioxidační účinky a je přeměněn na metabolity N-acetyl-5-methoxykynuramin a N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramin, které také působí antioxidačně (Galano *et al.*, 2014; Ressmeyer *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2001). Díky



antioxidačním vlastnostem je melatonin zajímavý kandidát na pomoc při stavech s mitochondriálním poškozením, jako je například sepse. Během sepse probíhá zánětlivá odpověď, která způsobuje zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, zvýšenou produkci ROS a nefunkčnost mitochondrií. Studie využívající izolované leukocyty potvrdila, že podání melatoninu působí antioxidačně a protizánětlivě na leukocyty vystavené septickým podmínkám LPS a peptidoglykanu. Melatonin snížil produkci ROS, produkci prozánětlivých cytokinů v buňkách, a zabránil dysfunkci mitochondrií (Galley *et al.*, 2014). Syntéza melatoninu v mitochondriích znamená lokální ochranu před oxidativním stresem (Suofu *et al.*, 2017). Prozánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 a IL-8, které slouží ke zvýšení aktivity imunitního systému, se mohou tvořit díky aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Medzhitov *et al.*, 1997). Po traumatickém poranění mozku se také exprimují prozánětlivé cytokiny, což je způsobeno zvýšenou aktivitou NF- $\kappa$ B. Po takovém poranění také dochází k edému mozku. Podání melatoninu potkanům po traumatickém poranění mozku způsobuje inhibici NF- $\kappa$ B a tedy snížení hladiny prozánětlivých cytokinů. Podání melatoninu také zmenšilo mozkový edém oproti kontrolní skupině. Díky svým protizánětlivým účinkům může tedy melatonin působit neuroprotektivně i po prodělání traumatického poranění mozku (Dehghan *et al.*, 2017). Neurodegenerativní choroby, jako jsou například Alzheimerova choroba, také vykazují zánětlivý stav. V případě Alzheimerovy choroby jsou zánětlivé podmínky způsobeny plaky tvořenými oligopeptidy amyloidu  $\beta$ , které indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF $\alpha$  aktivují mikroglie a astrocyty. Podání melatoninu přímo do mozkové tkáně snížilo produkci cytokinů IL-6 a TNF $\alpha$  a inhibovalo aktivaci glií (Hoppe *et al.*, 2010). Pro své protizánětlivé účinky má melatonin v léčbě neurodegenerativních chorob velký potenciál. U myšího modelu Alzheimerovy choroby bylo dokonce demonstrováno zlepšení kognitivních funkcí při behaviorálních testech po podání melatoninu (Gong *et al.*, 2017).

Některé studie ale prokázaly i opačný prozánětlivý účinek melatoninu. Z těchto studií je zřejmé, že o účinku melatoninu rozhoduje jak velikost jeho dávky, tak podmínky v těle a tkáni. Jednou z prozánětlivých aktivit melatoninu je jeho schopnost působit jako pro-oxidant, což bylo dokázáno ve studiích na buněčných kulturách *in vitro* s použitím vysokých koncentrací melatoninu. Ve studii využívající buněčnou linii U937 (linie lidských rakovinných myeloidních buněk) byly buňky ovlivněny melatoninem v 1mM koncentraci a pomocí fluorescentní próby bylo měřeno množství intracelulárního ROS. Experimentální skupina ovlivněna melatoninem vykazovala signifikantní nárůst intracelulárního ROS oproti kontrolní skupině, což demonstrovalo pro-oxidační vlastnost melatoninu (Albertini *et al.*,

2006). Dalším příkladem prozánětlivého působení melatoninu je jeho schopnost zvyšovat tvorbu prozánětlivých cytokinů. Toto působení můžeme pozorovat například v myším modelu transplantace jaterních štěpů, kde podání exogenního melatoninu zvýšilo produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF $\alpha$  v aktivovaných monocytech (Song *et al.*, 2018).

### **3. Cíle práce**

Cílem této práce bylo identifikovat časové změny v expresi enzymů kynureninové a melatoninové syntetizační dráhy, a také vybraných transkripčních faktorů v epifýze, játrech a srdci potkana. Experimenty probíhaly *in vivo* na potkanech kmene Wistar. Metodou RT-qPCR byla porovnána míra genové exprese v závislosti na cirkadiánním čase a po systémovém podání endotoxinu LPS.

## 4. Metody a vybavení

### 4.1. Laboratorní zvířata

K pokusu byli využiti samci potkanů kmene Wistar (n=70). Zvířata byla chována na standardní podestýlce ve skupinách o čtyřech jedincích. Přístup k vodě a standardnímu krmivu S1 byl *ad libitum*. Po celou dobu pokusu byl v místnosti udržován světelný režim 12 hodin světla a 12 hodin tmy (LD 12:12), kromě dne samotného experimentu, kdy byla nastavena stálá tma (DD) aby se zabránilo přímému vlivu světla na expresi genů. Odběr tkání byl prováděn po čtrnáctidenním aklimatizačním období potkanů v chovné místnosti.

### 4.2. Odběr tkání

Odběr tkání byl proveden v postnatálním dnu 30 (P30). Čtyři hodiny před prvním odběrem, v cirkadiánním čase 8, tj. čtyři hodiny před obvyklým zhasnutím (CT8), byl experimentální skupině (n=34) podán lipopolysacharid (1mg/kg) intraperitoneálně injekcí. Kontrolní skupině (n=36) byla vpíchnuta pouze suchá jehla. Během odběru byl v chovné místnosti udržován světelný režim DD, aby se předešlo efektu maskování světlem. Odběr probíhal v devíti časových bodech po třech hodinách, kdy první odběr se odehrál v 18:00 a poslední v 6:00 druhého dne (CT12, CT15, CT18, CT21, CT24, CT3, CT6, CT9, CT12). V každém časovém bodě bylo usmrceno osm zvířat, čtyři experimentální a čtyři kontrolní, kromě posledních dvou bodů, kdy v experimentální skupině byla pouze 3 zvířata. Zvířata byla uspána thiopentalem, který byl podán injekcí intraperitoneálně v množství 50mg/kg, a poté byla usmrcena dekapitací.

Pro účely této práce byly ihned po usmrcení odebrány do sterilních plastových zkumavek vzorky apexu srdce, jater a epifýzy. Tyto zkumavky byly ihned zamrazeny v suchém ledu a před další manipulací uschovány v mrazáku při teplotě -80 °C.

### 4.3. Izolace RNA

Před izolací RNA byla tkáň homogenizována. Do zkumavky s tkání byl přidán roztok RNazol RT (Molecular Research Center). Vzorky jater a srdcí byly naváženy na hmotnost okolo 100g a homogenizovány v homogenizačním přístroji Mixer Mill MM 200 (Retsch) po dobu 10 minut při 30 Hz. Epifýzy byly homogenizovány sonikací po dobu 10 vteřin. Následně byly vzorky stočeny na 10 minut při 11000 G v centrifuze, která byla předchlazena na 4 °C a supernatant byl odebrán do zkumavek.

Izolace RNA objemnějších vzorků srdce a jater probíhala pomocí isopropanolu. K supernatantu se přidalo 400  $\mu$ l injekční vody a směs se centrifugovala 15 minut při 12000 G. Odebral se 1 ml supernatantu do čisté plastové zkumavky, k němu se přidal 1 ml isopropanolu a směs se 10 minut inkubovala při pokojové teplotě. Směs se následně centrifugovala 10 minut při 12000 G. Supernatant se odebral a k peletě se přidalo 500  $\mu$ l 75% ethanolu. Směs se centrifugovala při 8000 G na 2 minuty a poté se ethanol pipetou odebral od pelety. Tento krok se jednou opakoval a po odebrání ethanolu se k peletě přidalo 200  $\mu$ l injekční vody. Vzorek se nechal inkubovat 10 minut při teplotě 55 °C. Po rozpuštění pelety se koncentrace RNA ve vzorku měřila nanodropem.

Méně hmotné vzorky epifýz byly po homogenizaci zpracovány kitem RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen). Izolace RNA probíhala podle instrukcí k použití kitu. Po izolaci RNA se její koncentrace ve vzorku měřila pomocí nanodropu, a vzorky byly opět vloženy do mrazáku o teplotě -80 °C.

#### **4.4. Přepis do cDNA a preamplifikace**

Podle koncentrací RNA změřených na nanodropu byly vzorky podle nejnižší koncentrace naředěny injekční vodou tak, aby u všech vzorků byla koncentrace stejná. Přepis do komplementární DNA (cDNA) se následně prováděl pomocí a podle protokolu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific).

Preamplifikace se kvůli nedostatečnému výtěžku cDNA prováděla na vzorcích epifýz, nikoliv srdcí a jater. Pro preamplifikaci byly použity přepsané vzorky cDNA o objemu 20  $\mu$ l, které byly naředěny 80  $\mu$ l injekční vody. K preamplifikaci byl použit TaqMan™ PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Preamplifikovány byly geny enzymů IDO1, IDO2, KMO, KAT2, KYNU, TDO, REV-ERB $\alpha$  a PER2. Z preamplifikace byl výtěžek vzorku 10  $\mu$ l.

#### **4.5. RT-qPCR**

K 10  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 90  $\mu$ l injekční vody a vzorky byly po 2  $\mu$ l napipetovány do třech jamek qPCR destičky (tzv. triplety). Do každé jamky bylo následně napipetováno 10,3  $\mu$ l injekční vody, 3,1  $\mu$ l 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) a 0,6  $\mu$ l TaqMan próby zkoumaného genu (Life Technologies). Jako próba housekeeping genu byla použita próba pro gen Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (*hprt1*). Pro pokus byly použity próby pro geny vypsány v tabulce č. 1.

Název proteinu	Zkratka proteinu	Název genu	Kód eseje
Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza	HGPRT	<i>hprt1</i>	Rn01527840_m1
Indolamin 2,3-dioxygenáza 1	IDO1	<i>ido1</i>	Rn01482210_m1
Indolamin 2,3-dioxygenáza 2	IDO2	<i>ido2</i>	Rn01482543_m1
Tryptofan hydroxyláza 1	TPH1	<i>tph1</i>	Rn01476867_m1
Kynurenin 3-monooxygenáza	KMO	<i>kmo</i>	Rn01411937_m1
Kynurenin aminotransferáza	KAT2	<i>aadat</i>	Rn00567882_m1
Kynurenináza	KYNU	<i>kynu</i>	Rn01449532_m1
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	<i>stat3</i>	Rn00680715_m1
Aralkylamin N-acetyltransferáza	AANAT	<i>aanat</i>	Rn01461110_m1
Inducible cAMP early repressor	ICER	<i>icer</i>	Rn04338541_m1
Tryptofan 2,3-dioxygenáza	TDO	<i>tdo2</i>	Rn00574499_m1
Rev-ErbA alpha	REV-ERB $\alpha$	<i>nr1d1</i>	Rn01460662_m1
Period circadian clock 2	PER2	<i>per2</i>	Rn01427704_m1

**Tabulka č. 1:** Seznam genů, pro které byly použity próby při qPCR. Próba pro gen *aanat* nebyla použita u vzorků srdeční tkáně.

Měření qPCR se provádělo na přístroji LightCycler® 480 Instrument (Roche Life Science). Protokol měření začínal 15 minutovou denaturací při 95 °C a pokračoval 60 cykly denaturace a syntézy (95 °C po 18 vteřinách a 60°C po 60 vteřinách). Výchozí hodnota RT-qPCR je Ct (cycle threshold), což je hodnota odpovídající cyklu, ve kterém fluorescence vzorku přesáhne fluorescenci pozadí. Vzorky s větší koncentrací zkoumaného vzorku tak mají nižší hodnotu CT.

#### 4.6. Vyhodnocení RT-qPCR

Vyhodnocení probíhalo v programu Microsoft Office Excel. Prvním krokem bylo vypočítat průměr Ct hodnot tripletů pro každý vzorek. Pro získání další hodnoty v postupu jsme použili tento vzorec a opakovali pro každý zkoumaný gen:

$$\frac{\text{efektivita próby HPRT genu}^{\wedge} \text{ Ct hodnota vzorku pro HPRT gen}}{\text{efektivita próby zkoumaného genu}^{\wedge} \text{ Ct hodnota vzorku pro zkoumaný gen}}$$

Jelikož měření RT-qPCR probíhalo ve dvou dnech pro každou próbu, výsledky měření byly standardizovány k maximální hodnotě naměřené v kontrolní skupině genu pro ten den. Hodnoty kontrolní skupiny tak pro oba dny nepřevyšovaly hodnotu 1 a hodnoty LPS skupiny hodnotu 1 převyšovaly, pokud byla exprese po ovlivnění LPS vyšší, než exprese v kontrolní skupině. Následně byly hodnoty statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 9.

#### 4.7 Statistické vyhodnocení

V programu GraphPad Prism 9 byla data vyhodnocena kosinorovou analýzou, jednocestnou a dvoucestnou analýzou variance (ANOVA) a Welchovým t testem. Kosinorová analýza je metoda, která využívá metodu nejmenších čtverců pro určení rytmu a jeho parametrů. Po nalezení rytmu prokládá hodnoty sinusoidou kosinorové křivky. Hodnota P v kosinorové analýze ukazuje signifikanci odlišnosti hodnot. Pokud kosinorová analýza určila hodnotu  $P < 0,05$ , byl rytmus označen jako signifikantní a analýza zamítla nulovou hypotézu ( $H_0$  – horizontální čára). Kosinorová analýza také vypočítala v rytmech hodnotu mesoru (průměr všech hodnot v cirkadiánním rytmu), amplitudy (maximální dosažená hodnota rytmu) a akrofáze (čas, během kterého je rytmus v maximu).

Přítomnost rytmu byla prověřována jednocestnou ANOVou, která určuje signifikanci mezi hodnotami v jednotlivých časových bodech. K jednocestné ANOVě byla využita Šidákova korekce. Aby přítomnost cirkadiánního rytmu byla potvrzena, musela jednocestná ANOVA i kosinorová analýza zhodnotit rytmus jako signifikantní a vyhodnotit  $P < 0,05$ . Pokud obě analýzy vyhodnotily rytmus jako signifikantní, byl graf s daty proložen kosinorovou křivkou. Pokud jedna nebo obě analýzy vyhodnotily  $P > 0,05$ , přítomnost rytmu nebyla potvrzena a graf nebyl proložen kosinorovou křivkou. Rytmus byl analyzován pouze v kontrolní skupině, jelikož v experimentální skupině byl maskován okamžitou odpovědí na podání LPS. Dvoucestná ANOVA byla využita k určení rozdílu mezi kontrolní a LPS skupinou a k vyhodnocení signifikance rozdílu mezi nimi. Pokud analýza vyhodnotila  $P < 0,05$ , byla odlišnost mezi skupinami označena jako signifikantní. Druhý test použitý na určení signifikance rozdílu mezi skupinami byl Welchův t test s Šidákovou a Bonferroniho korekcí, který porovnává mezi sebou data v jednotlivých časových bodech. Jako signifikantní byl považován rozdíl mezi skupinami v daném časovém bodě, pokud test vyhodnotil  $P < 0,05$ .

## 5. Výsledky

### 5.1. Bazální exprese genů

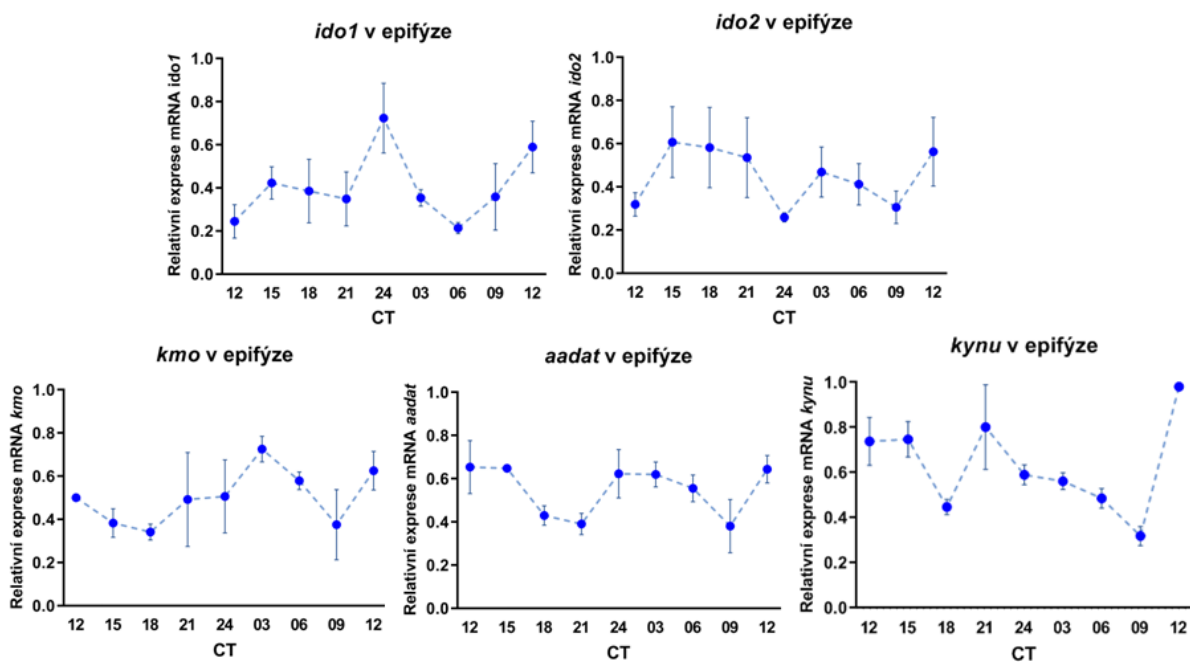
Výsledková část je rozdělena na dvě kapitoly. V první kapitole je hodnocen časový profil exprese vybraných genů pouze u kontrolních zvířat, s cílem prokázat cirkadiánní rytmus v expresi studovaných enzymů. Genová exprese byla vyhodnocena jako rytmující, pokud kosinorová analýza odmítla nulovou hypotézu. Toto tvrzení bylo dále podpořeno jednocestnou ANOVou, která zhodnotila, zda jsou hodnoty v jednotlivých CT významně odlišné. Kosinorová analýza také vypočítala u genů vykazujících rytmicitu dodatečné parametry rytmu, a to mesor, amplitudu a akrofázi. Ve druhé části výsledků je demonstrována míra a směr změny genové exprese v jednotlivých tkáních po systémové aplikaci LPS.

Měřením exprese genů v jednotlivých tkáních kontrolních zvířat byly získány hodnoty bazální exprese genů, které mohly být dále porovnávány s hodnotami naměřenými v experimentální skupině v následující kapitole. Expresi některých genů v kontrolní skupině byly velice nízké, proto jsme přijali kritérium, že přístrojová hodnota CT po proběhnutí reakčních cyklů musí být nižší než 35, aby byla genu přiznána bazální exprese a data byla dále zpracována.

#### 5.1.1. Bazální exprese genů kynureninové dráhy

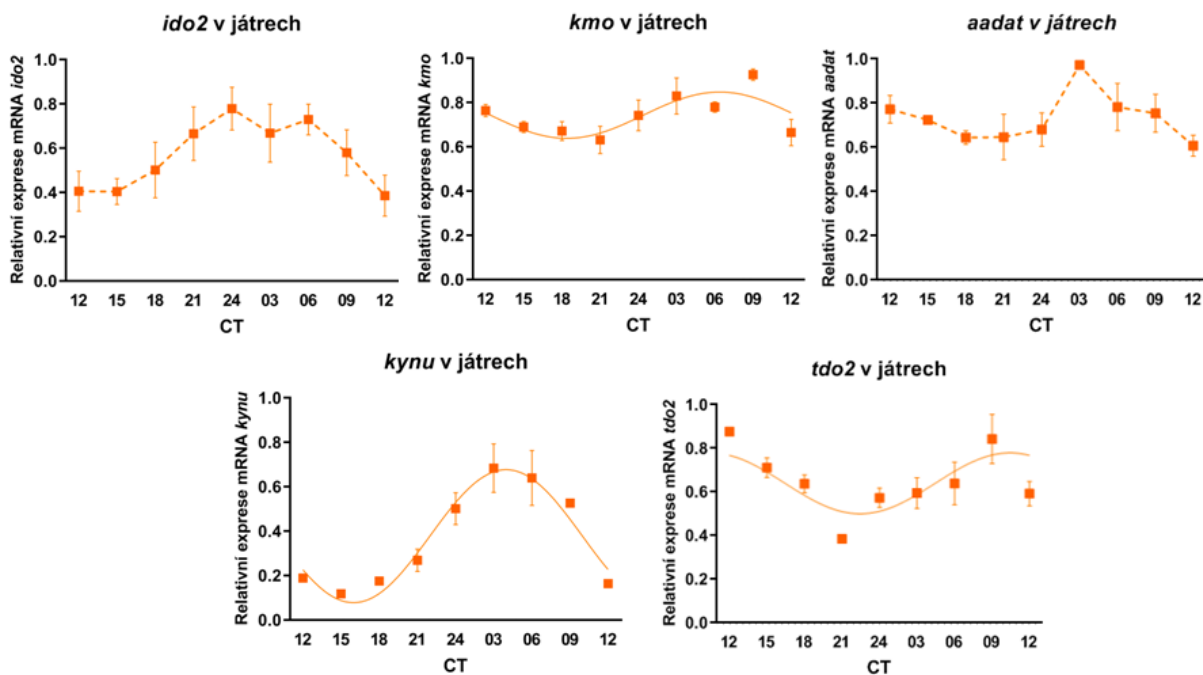
Ve vzorcích epifýz byla nalezena bazální exprese genů kynureninové dráhy *ido1*, *ido2*, *kmo*, *aadat* a *kynu* (viz. Obrázek č. 4). Bazální exprese genu *tdo2* v epifýze potvrzena nebyla. Gen *ido1* nevykazoval rytmus podle kosinorové analýzy, která neodmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,5591$ . Jednocestná ANOVA potvrdila nepřítomnost rytmu ( $F(8,25) = 1,971$ ;  $P = 0,0931$ ). V expresi genu *ido2* také nebyl nalezen cirkadiánní rytmus podle kosinorové analýzy s pravděpodobností  $P = 0,2710$ , což bylo potvrzeno jednocestnou ANOVou ( $F(8,25) = 0,9502$ ;  $P = 0,4950$ ). V expresi genu *kmo* nebyl prokázán rytmus kosinorovou analýzou s pravděpodobností  $P = 0,1582$  a absence rytmu byla potvrzena jednocestnou ANOVou ( $F(8,24) = 1,128$ ;  $P = 0,3806$ ). Kosinorová analýza nepotvrdila ani rytmus v expresi genu *aadat* v epifýze s pravděpodobností  $P = 0,5115$ . Absence rytmu byla potvrzena jednocestnou ANOVou ( $F(8,24) = 2,005$ ;  $P = 0,0898$ ). Stejně tak nevykazoval rytmus gen *kynu* podle kosinorové analýzy s pravděpodobností  $P = 0,2035$ , přestože ANOVA potvrdila významné odlišnosti hodnot mezi jednotlivými časy ( $F(8,24) = 4,637$ ;  $P = 0,0016$ ).





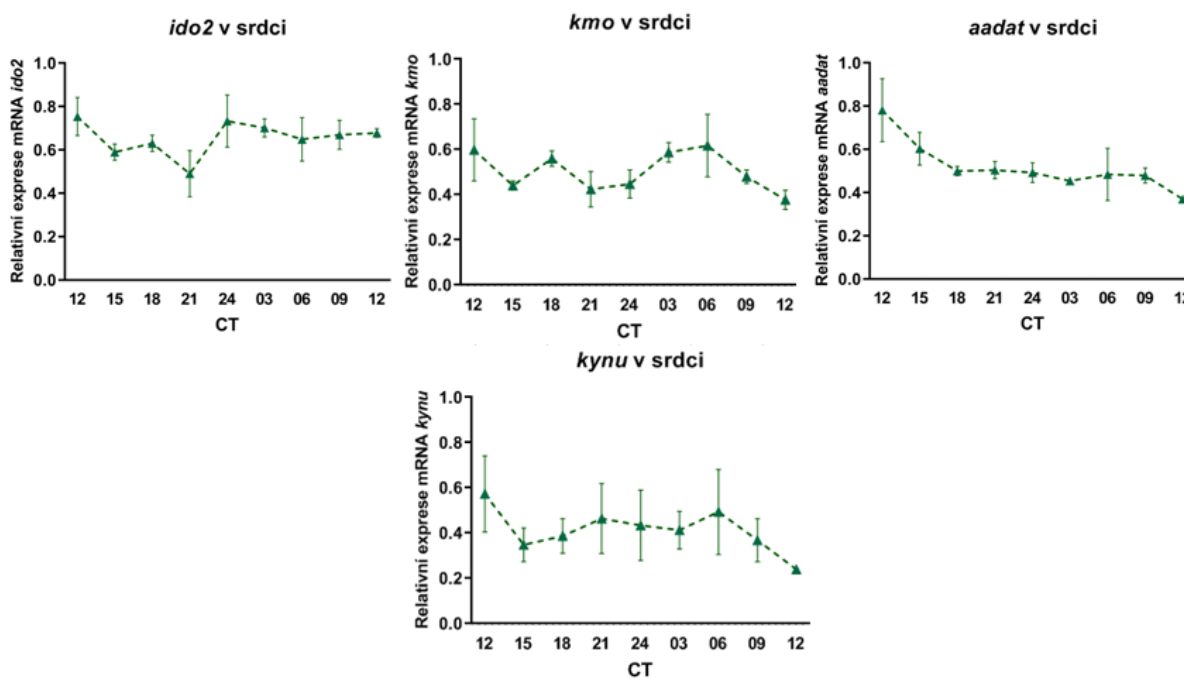
**Obrázek č. 4: Bazální exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích epifýzy.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni epifýzy v uvedených cirkadiánních časech. Tyto geny nevykazovaly cirkadiánní rytmus v epifýze, a proto není žádný z grafů proložen kosinorovou křivkou.

Ve vzorcích jater byla naměřena bazální exprese genů kynureninové dráhy *ido2*, *kmo*, *aadat*, *kynu* a *tdo2* (viz. Obrázek č. 5). Bazální exprese v játrech nebyla naměřena u genu *ido1*. V játrech gen *ido2* vykazoval cirkadiánní rytmus podle kosinorové analýzy, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,0007$ , jednocestná ANOVA ale nenalezla mezi hodnotami jednotlivých časů signifikantní odlišnost ( $F(8, 27) = 2,200$ ;  $P = 0,06$ ). Gen *kmo* podle kosinorové analýzy rytmus vykazoval s pravděpodobností  $P = 0,002$ . Jednocestná ANOVA cirkadiánní rytmus v expresi genu *kmo* potvrdila ( $F(8, 27) = 3,358$ ;  $P = 0,0085$ ). Kosinorová analýza neodmítla  $H_0$  pro gen *aadat* s pravděpodobností  $P = 0,0616$ . Signifikanci rytmu exprese genu *aadat* nenalezla ani jednocestná ANOVA ( $F(8, 25) = 1,967$ ;  $P = 0,0938$ ). U genu *kynu* kosinorová analýza odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$  a potvrdila rytmus exprese genu. Rytmus exprese genu *kynu* byl prokázán i jednocestnou ANOVou ( $F(8, 26) = 12,01$ ;  $P < 0,0001$ ). Kosinorová analýza odmítla  $H_0$  i u genu *tdo2* v játrech s pravděpodobností  $P = 0,0018$  a cirkadiánní rytmus exprese genu byl potvrzen jednocestnou ANOVou ( $F(8, 26) = 4,639$ ;  $P = 0,0013$ ).



**Obrázek č. 5: Bazální exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích jater.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni jater uvedených cirkadiálních časech. Grafy genů vykazujících cirkadiální rytmus podle kosinorové analýzy a 1W ANOVA jsou proloženy plnou kosinorovou křivkou, nevýznamné denní profily jsou vyznačeny přerušovanou linkou.

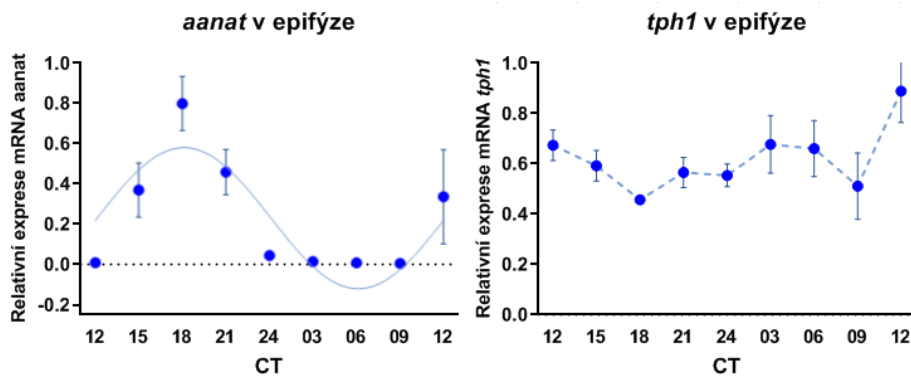
Ve vzorcích srdcí byla naměřena bazální exprese genů kynureninové dráhy *ido2*, *kmo*, *aadat*, a *kynu* (viz. Obrázek č. 6). Bazální exprese v srdci nebyla naměřena u genů *ido1* a *tdo2*. U genu *ido2* kosinorová analýza přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,3171$  a nepřítomnost rytmu exprese genu potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 25) = 1,043$ ;  $P = 0,4317$ ). Kosinorová analýza nepotvrdila rytmus exprese ani u genu *kmo* a přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,4443$ . Jednocestná ANOVA také nenašla signifikanci a nepotvrdila rytmus exprese genu *kmo* ( $F(8, 26) = 1,250$ ;  $P = 0,3113$ ). U genu *aadat* kosinorová analýza přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,2637$  a nepotvrdila rytmus exprese genu. Nepřítomnost rytmu byla potvrzena ANOVou ( $F(8, 25) = 2,234$ ;  $P = 0,0595$ ). Kosinorová analýza neprokázala cirkadiální rytmus exprese ani u genu *kynu* a přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,8641$ . Signifikanci rytmu exprese genu *kynu* neprokázala ani jednocestná ANOVA ( $F(8, 25) = 0,4941$ ;  $P = 0,8487$ ).



**Obrázek č. 6: Bazální exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích srdce.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiánních časech. Tyto geny nevykazovaly cirkadiánní rytmus v srdci, a proto není žádný z grafů proložen kosinorovou křivkou.

### 5.1.2. Bazální exprese genů methoxyindolové dráhy

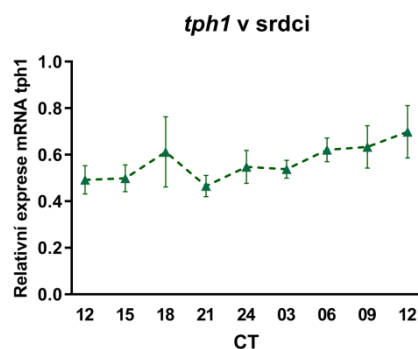
Ve vzorcích epifýzy byla potvrzena exprese genů methoxyindolové dráhy *aanat* a *tph1* (viz. Obrázek č. 7). U genu *aanat* byl potvrzen cirkadiánní rytmus exprese kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Rytmus exprese genu *aanat* byl potvrzen jednocestnou ANOVou ( $F(8, 24) = 5,802$ ;  $P = 0,0004$ ). Kosinorová analýza ale nepotvrdila rytmus exprese u genu *tph1* a přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,1762$ . Nepřítomnost rytmu exprese genu *tph1* byla potvrzena jednocestnou ANOVou ( $F(8, 24) = 2,047$ ;  $P = 0,0837$ ).



**Obrázek č. 7: Bazální exprese genů methoxyindolové dráhy ve vzorcích epifýz.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni epifýz v uvedených cirkadiánních časech. Graf genu *aanat*, vykazující cirkadiánní rytmus podle kosinorové analýzy a 1W ANOVA, je proložen plnou kosinorovou křivkou, nevýznamný cirkadiánní rytmus genu *tph1* je vyznačen přerušovanou linkou.

Ve vzorcích jater nebyla nalezena přítomnost bazální exprese genů methoxyindolové dráhy *tph1* ani *aanat* neboť hodnoty CT vysoce převyšovaly zvolený práh, viz kapitola 5.2.

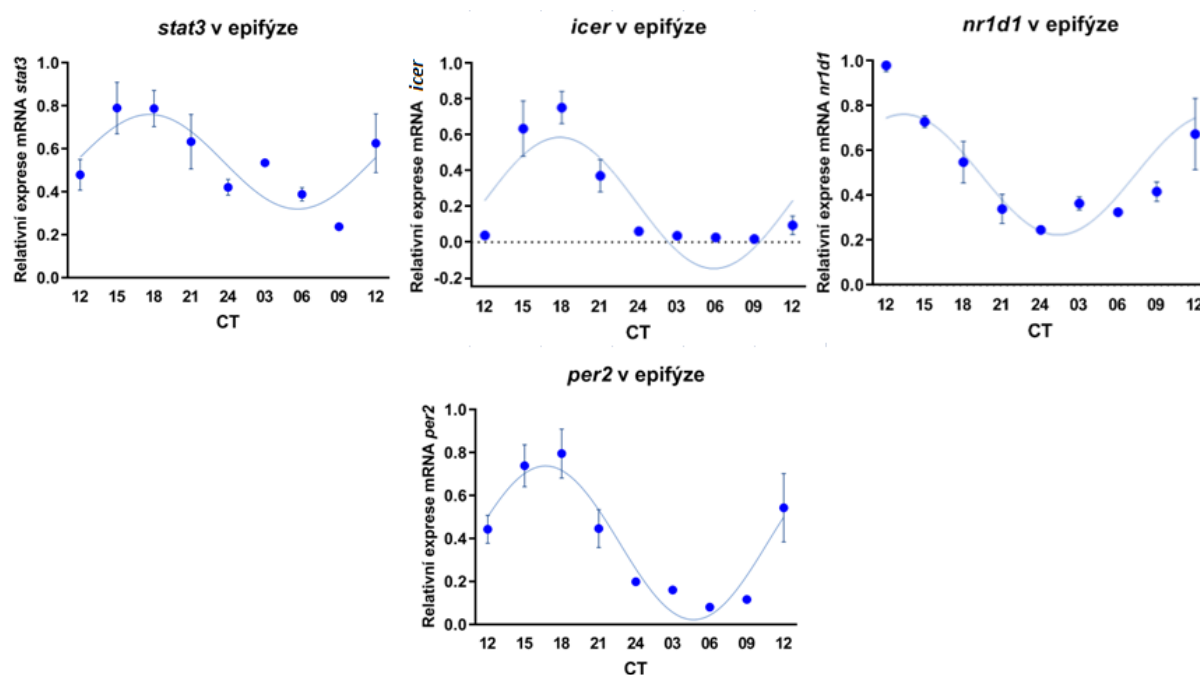
V srdci byla nalezena bazální exprese genu methoxyindolové dráhy *tph1* (viz. Obrázek č. 8). Gen *aanat* nebyl ve vzorcích srdce měřen. Podle kosinorové analýzy nebyl u genu *tph1* nalezen cirkadiánní rytmus s pravděpodobností  $P = 0,4516$ . Jednocestná ANOVA také neprokázala signifikanci rytmu exprese genu *tph1* ( $F(8, 26) = 0,8855$ ;  $P = 0,5418$ ).



**Obrázek č. 8: Bazální exprese genu *tph1* methoxyindolové dráhy ve vzorcích srdcí.** Graf znázorňuje průměry relativní míry exprese mRNA genu ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiánních časech. Graf není proložen kosinorovou křivkou, jelikož nebyl u genu *tph1* v srdci potvrzen cirkadiánní rytmus.

### 5.1.3. Bazální exprese transkripčních faktorů

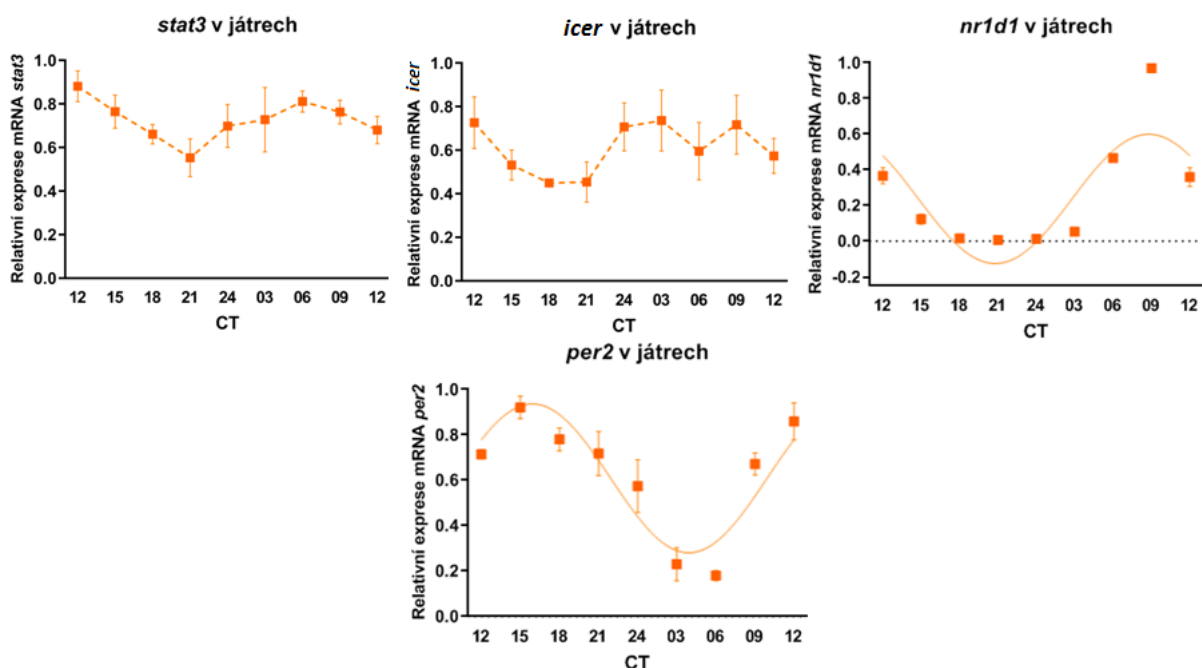
Ve vzorcích epifýz byly nalezeny bazální exprese genů transkripčních faktorů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 9). Kosinorová analýza potvrdila cirkadiánní rytmus exprese genu *stat3* odmítnutím  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,0006$ . Přítomnost rytmu exprese genu *stat3* potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 24) = 3,793$ ;  $P = 0,0053$ ). Kosinorová analýza také potvrdila cirkadiánní rytmus v expresi genu *icer* odmítnutím  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Signifikanci rytmu exprese genu *icer* potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 23) = 14,40$ ;  $P < 0,0001$ ). V expresi genu *nr1d1* kosinorová analýza odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$  a potvrdila tak cirkadiánní rytmus. Jednocestná ANOVA rytmus exprese genu *nr1d1* potvrdila ( $F(8, 25) = 11,14$ ;  $P < 0,0001$ ). U genu *per2* byl také nalezen cirkadiánní rytmus v expresi genu kosinorovou analýzou, která zamítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Přítomnost rytmu exprese a signifikanci potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 25) = 9,065$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Obrázek č. 9: Bazální exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích epifýz.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni epifýz v uvedených cirkadiánních časech. Grafy genů vykazujících cirkadiánní rytmus podle kosinorové analýzy a 1W ANOVA jsou proloženy plnou kosinorovou křivkou.

Ve vzorcích jater byly nalezeny bazální exprese genů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 10). U genu *stat3* nenašla v játrech kosinorová analýza rytmus v expresi a přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,0674$ . Jednocestná ANOVA potvrdila nepřítomnost

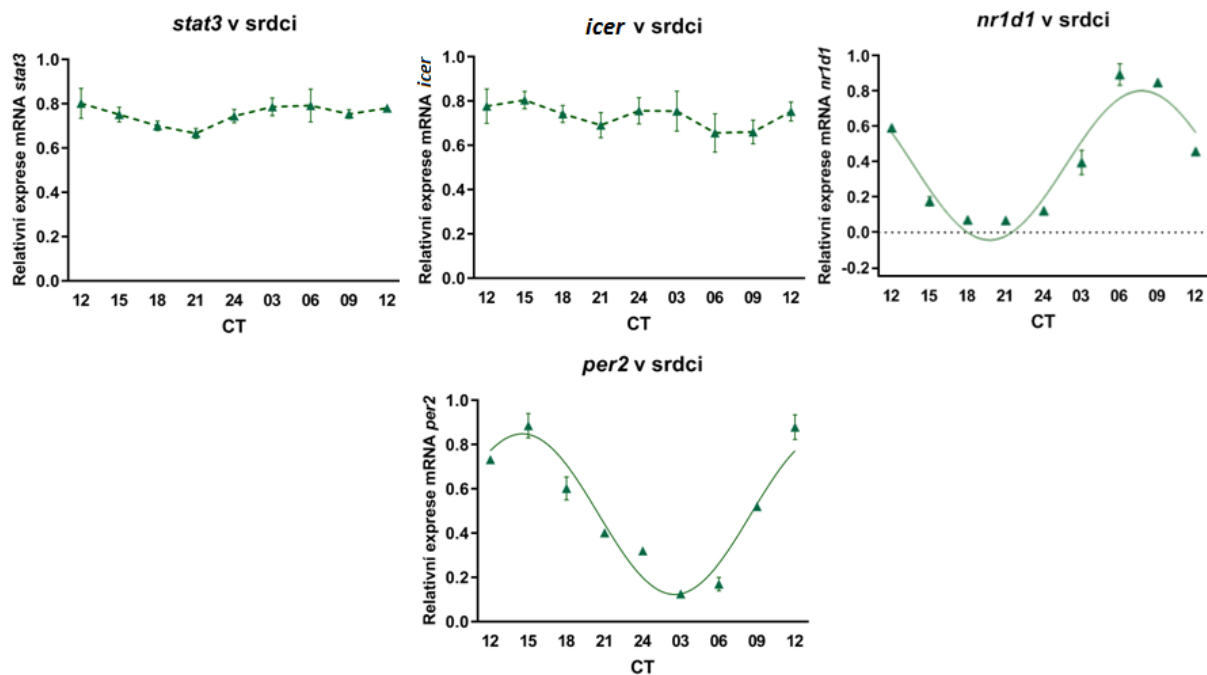
cirkadiálního rytmu v expresi genu *stat3* ( $F(8, 27) = 1,314$ ;  $P = 0,2787$ ). Kosinorová analýza nepotvrdila rytmus exprese ani u genu *icer*, u kterého přijala  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,0867$ . Jednocestná ANOVA také nenašla signifikanci rytmu exprese genu *icer* ( $F(8, 27) = 1,198$ ;  $P = 0,3371$ ). U genu *nr1d1* ale byl potvrzen cirkadiální rytmus exprese kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Signifikanci rytmu exprese genu potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 27) = 140,9$ ;  $P < 0,0001$ ). Také u genu *per2* byl nalezen signifikantní cirkadiální rytmus exprese podle kosinorové analýzy, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Rytmus exprese genu *per2* potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 27) = 14,20$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Obrázek č. 10: Bazální exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích jater.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni jater v uvedených cirkadiálních časech. Grafy genů vykazujících cirkadiální rytmus podle kosinorové analýzy a 1W ANOVA jsou proloženy plnou kosinorovou křivkou, nevýznamné denní profily jsou vyznačeny přerušovanou linkou.

Ve vzorcích srdce byly nalezeny bazální exprese genů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 11). V srdci byl potvrzen cirkadiální rytmus exprese u genu *stat3* kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,0344$ . Jednocestná ANOVA ale nenalezla mezi hodnotami jednotlivých časů signifikantní odlišnost ( $F(8, 26) = 1,171$ ;  $P = 0,3532$ ). U genu *icer* nebyl potvrzen cirkadiální rytmus exprese genu v srdci kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P = 0,5077$ . Rytmus exprese genu *icer* nebyl

potvrzen ani jednocestnou ANOVou ( $F(8, 26) = 0,6265$ ;  $P = 0,7480$ ). Rytmus exprese potvrzen byl v genu *nr1d1* kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Jednocestná ANOVA potvrdila signifikanci odlišnosti hodnot jednotlivých časů u genu *nr1d1* ( $F(8, 25) = 81,20$ ;  $P < 0,0001$ ). Rytmus exprese byl potvrzen i u genu *per2* kosinorovou analýzou, která odmítla  $H_0$  s pravděpodobností  $P < 0,0001$ . Signifikanci rytmu exprese genu *per2* potvrdila jednocestná ANOVA ( $F(8, 24) = 60,92$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Obrázek č. 11: Bazální exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích srdce.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiálních časech. Grafy genů vykazujících cirkadiální rytmus podle kosinorové analýzy a 1W ANOVA jsou proloženy plnou kosinorovou křivkou, nevýznamné denní profily jsou vyznačeny přerušovanou linkou.

Tabulka č. 2 ukazuje parametry statisticky potvrzených expresních rytmů získané kosinorovou analýzou. Hodnoty mesoru a amplitudy jsou vyjádřeny v číslech vyjadřujících relativní množství a jsou tedy pouze orientační. Akrofáze vyjadřuje cirkadiální čas vrcholu rytmu a je důležitá pro posouzení vzájemných fázových vztahů mezi expresními rytmy.

		Epifýza	Játra	Srdce		Epifýza	Játra	Srdce	
<i>ido1</i>	mesor				<i>aanat</i>	mesor	0,23		
	amplituda					0,35			
	akrofáze					17,88			
<i>ido2</i>	mesor				<i>tph1</i>	mesor			
	amplituda								
	akrofáze								
<i>aadat</i>	mesor				<i>stat3</i>	mesor	0,54		
	amplituda					0,2201			
	akrofáze					18,35			
<i>kmo</i>	mesor		0,743		<i>icer</i>	mesor	0,22		
	amplituda		0,1045						
	akrofáze		6,38						
<i>kynu</i>	mesor		0,3775		<i>nr1d1</i>	mesor	0,49	0,24	0,38
	amplituda		0,2994			0,27	0,36	0,42	
	akrofáze		3,98			10,65	8,79	7,73	
<i>tdo2</i>	mesor		0,64		<i>per2</i>	mesor	0,38	0,61	0,49
	amplituda		0,14			0,36	0,33	0,36	
	akrofáze		10,45			19,31	15,93	14,52	

**Tabulka č. 2: Parametry kosinorové analýzy.** V případě, že rytmus v expresi genu nebyl potvrzen kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA nemohly být parametry rytmu vypočítány a příslušné pole je tedy proškrtnuto. Gen *aanat* nebyl měřen v srdci a v játrech nebyla nalezena jeho bazální exprese. V játrech a v srdci nebyla nalezena bazální exprese genu *ido1*, v játrech nebyla nalezena bazální exprese genu *tph1*, a v epifýze a srdci nebyla nalezena bazální exprese genu *tdo2*. Mesor a amplituda jsou vyjádřeny v relativní hladině exprese, akrofáze jsou vyjádřeny v cirkadiánním čase CT.

## 5.2. Porovnání bazální a indukované exprese genů

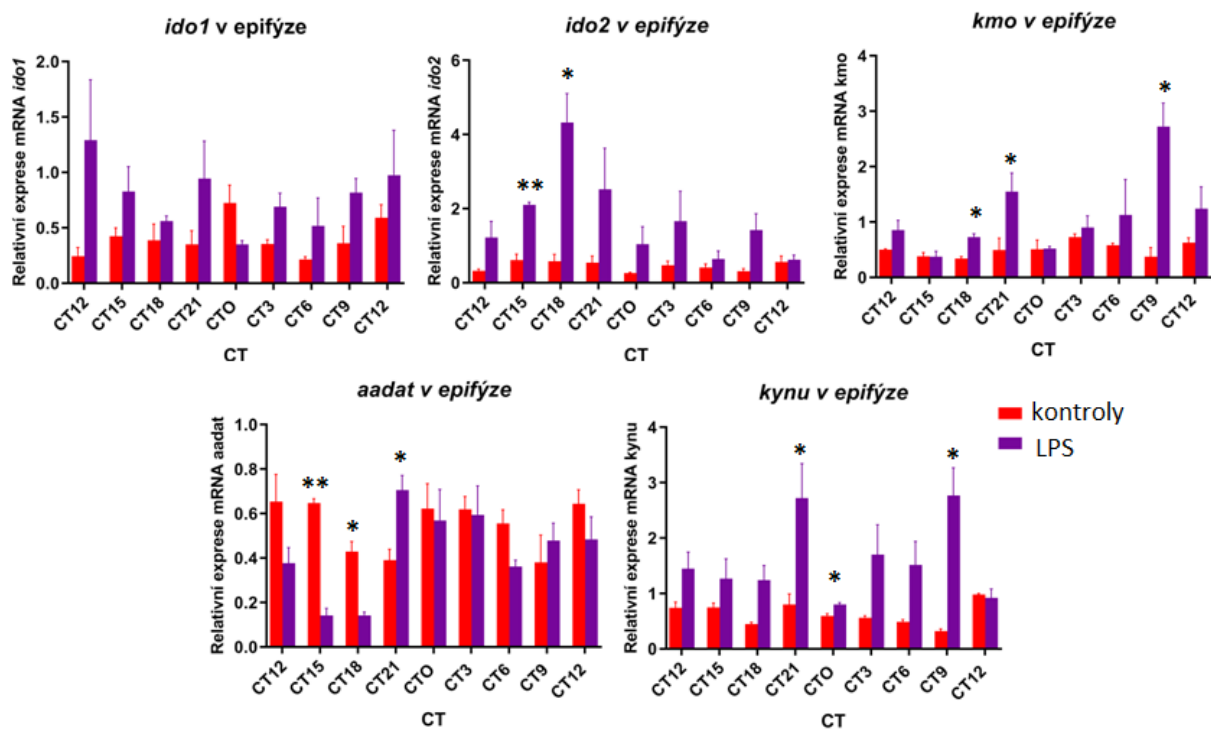
Genová exprese sledovaných genů byla indukována intraperitoneálním podáním LPS v čase CT8 v dávce 1mg/kg. Indukovaná a bazální exprese byly porovnávány u jednotlivých genů dvoucestnou ANOVou a Welchovým t testem. Cirkadiánní rytmus exprese genů nebyl měřen u experimentální LPS skupiny, jelikož rytmicitu exprese maskoval okamžitý efekt podání LPS.

### 5.2.1. Porovnání bazální a indukované exprese genů kynureninové dráhy

V epifýze byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů kynureninové dráhy *ido1*, *ido2*, *kmo*, *aadat* a *kynu* (viz. Obrázek č. 12). Exprese genu *tdo2* nebyla nalezena v epifýze ani po ovlivnění LPS. U genu *ido1* dvoucestná ANOVA potvrdila signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LPS skupinou v epifýze ( $F(1, 48) = 11,98$ ;  $P = 0,0011$ ). Welchův t test neodhalil u genu *ido1* žádnou signifikanci mezi skupinami v jednotlivých časových bodech. Dvoucestná ANOVA v expresi genu *ido2* mezi kontrolní a LPS skupinou našla signifikantní rozdíl ( $F(1, 49) = 34,39$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test našel u genu *ido2*



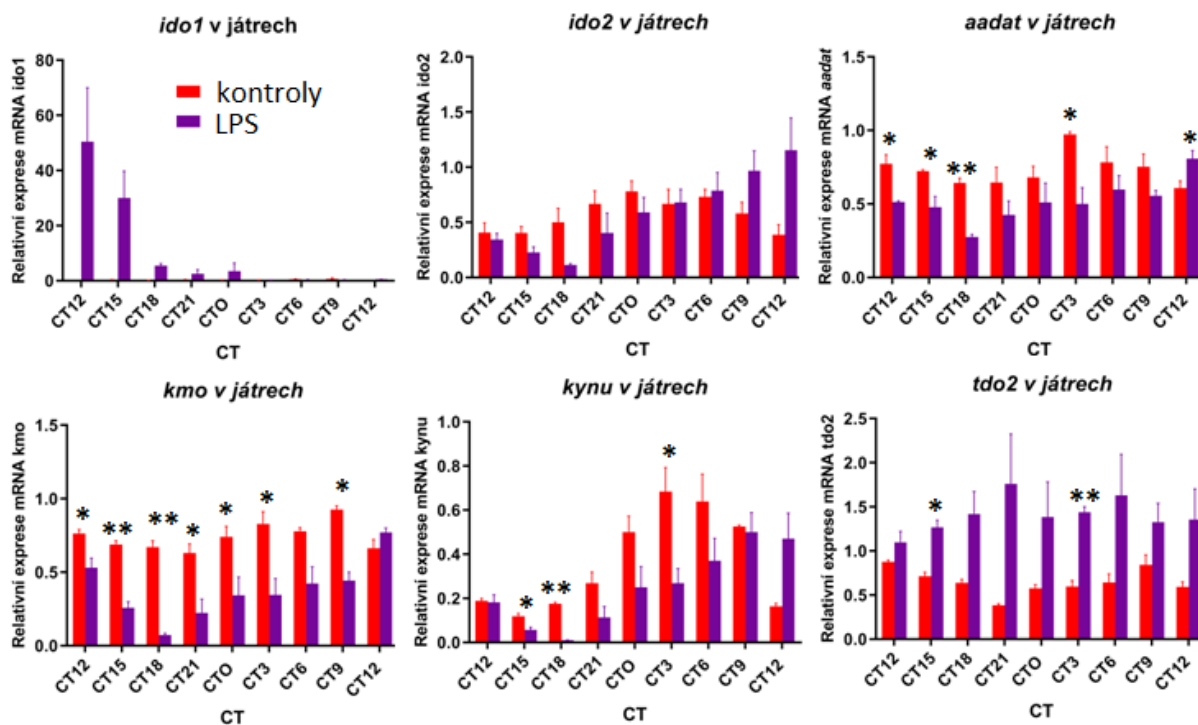
signifikanci mezi skupinami v časových bodech CT15 ( $P = 0,000962$ ), kde byla signifikance indukce exprese největší, a CT18 ( $P = 0,014574$ ). U genu *kmo*, dvoucestná ANOVA mezi kontrolní a LPS skupinou v epifýze potvrdila signifikantní rozdíl ( $F(1, 49) = 28,16$ ;  $P < 0,0001$ ). Podle Welchova *t* testu byla indukce exprese genu *kmo* po podání LPS nejsignifikantnější v časovém bodě CT18 ( $P = 0,003224$ ) a na nižší hladině významnosti byla v časových bodech CT21 ( $P = 0,044987$ ) a CT9 ( $P = 0,020230$ ). Dvoucestná ANOVA potvrdila signifikantní rozdíl v expresi genu *aadat* mezi kontrolní a LPS skupinou ( $F(1, 48) = 9,069$ ;  $P = 0,0041$ ). Welchův *t* test odhalil signifikantní pokles exprese genu *aadat* v LPS skupině vůči kontrolní skupině v časových bodech CT15 ( $P = 0,000065$ ) a CT18 ( $P = 0,005079$ ). V bodě CT21 naopak odhalil ve skupině LPS signifikantní indukci exprese genu ( $P = 0,010466$ ). Dvoucestná ANOVA u genu *kynu* v epifýze potvrdila rozdílnost kontrolní a LPS skupiny ( $F(1, 48) = 44,70$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův *t* test našel v expresi genu *kynu* v epifýze signifikantní indukci exprese po podání LPS v časových bodech CT21 ( $P = 0,049316$ ), CT0 ( $P = 0,015762$ ) a CT9 ( $P = 0,038364$ ).



**Obrázek č. 12: Porovnání bazální a indukované exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích epifýz.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni epifýz v uvedených cirkadiánních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupiny, které byly

vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

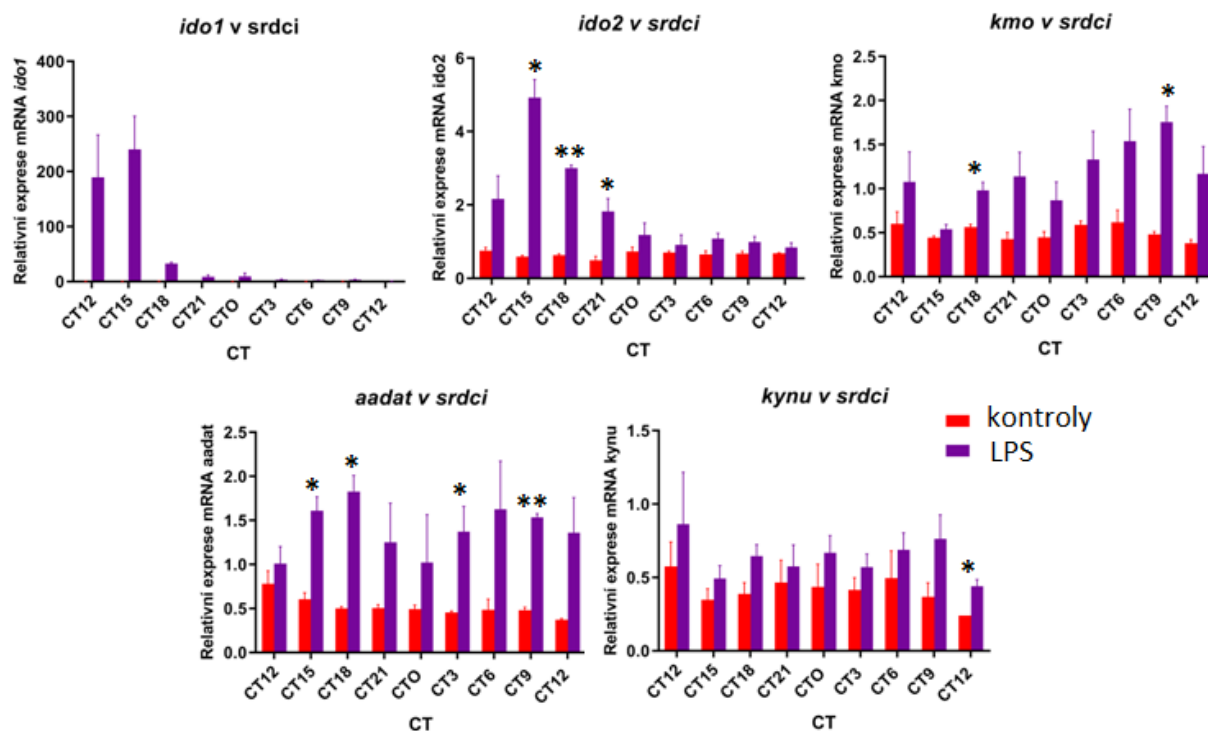
V játrech byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů kynureninové dráhy *ido1*, *ido2*, *kmo*, *aadat*, *kynu* a *tdo2* (viz. Obrázek č. 13). Jelikož v kontrolní skupině v játrech nebyla nalezena exprese genu *ido1*, nebylo možné zde dvě skupiny porovnat. Bylo však potvrzeno, že podání LPS v játrech indukuje expresi genu *ido1*. Dvoucestná ANOVA nenalezla signifikantní rozdíl mezi skupinou kontrolní a LPS u genu *ido2* v játrech ( $F(1, 52) = 0,08715$ ;  $P = 0,7690$ ). Welchův t test u genu *ido2* také neodhalil signifikantní rozdíl mezi skupinami v žádném z časových bodů. Dvoucestná ANOVA u genu *kmo* v játrech potvrdila odlišnost kontrolní a LPS skupiny ( $F(1, 52) = 123,5$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test odhalil signifikantně menší expresi genu *kmo* v LPS skupině v časových bodech CT12 ( $P = 0,030374$ ), CT15 ( $P = 0,000312$ ), CT18 ( $P = 0,000459$ ), CT21 ( $P = 0,014698$ ), CT0 ( $P = 0,039118$ ), CT3 ( $P = 0,014853$ ) a CT9 ( $P = 0,005558$ ). Dvoucestná ANOVA mezi kontrolní a LPS skupinou pro gen *aadat* našla signifikantní odlišnost ( $F(1, 49) = 31,48$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test prokázal u genu *aadat* signifikantně nižší expresi v LPS než v kontrolní skupině v časových bodech CT12 ( $P = 0,024621$ ), CT15 ( $P = 0,042504$ ), CT18 ( $P = 0,000192$ ) a CT3 ( $P = 0,021271$ ). Signifikantní indukce exprese byla naopak pozorována v druhý časový bod CT12 ( $P = 0,043276$ ). Dvoucestná ANOVA u genu *kynu* mezi kontrolní a LPS skupinou našla signifikantní rozdíl ( $F(1, 51) = 13,27$ ;  $P = 0,0006$ ). Welchův t test prokázal u genu *kynu* signifikantní snížení exprese genu v LPS skupině vůči kontrolní skupině v časových bodech CT15 ( $P = 0,014139$ ), CT18 ( $P = 0,000130$ ) a CT3 ( $P = 0,023284$ ). V expresi genu *tdo2* v játrech našla dvoucestná ANOVA signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LPS skupinou ( $F(1, 50) = 44,61$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test odhalil u genu *tdo2* signifikantní indukci exprese genu po podání LPS v porovnání s kontrolní skupinou v časových bodech CT15 ( $P = 0,002078$ ) a CT3 ( $P = 0,000288$ ).



**Obrázek č. 13: Porovnání bazální a indukované exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích jater.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni jater v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

V srdci byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů kynureninové dráhy *ido1*, *ido2*, *kmo*, *aadat* a *kynu* (viz. Obrázek č. 14). Expresce genu *tdo2* nebyla nalezena v srdci ani po ovlivnění LPS. Jelikož v kontrolní skupině v srdci nebyla nalezena exprese genu *ido1*, nebylo možné zde dvě skupiny porovnat. Bylo však potvrzeno, že podání LPS v srdci indukuje expresi genu *ido1*. Dvoucestná ANOVA u genu *ido2* potvrdila odlišnost kontrolní a LPS skupiny v srdci ( $F(1, 49) = 102,5; P < 0,0001$ ). Welchův t test prokázal signifikantní indukci exprese genu *ido2* po podání LPS v časových bodech CT15 ( $P = 0,002991$ ), CT18 ( $P = 0,000010$ ) a CT21 ( $P = 0,027440$ ). Dvoucestná ANOVA u genu *kmo* potvrdila odlišnost kontrolní a LPS skupiny v srdci ( $F(1, 50) = 51,07; P < 0,0001$ ). U genu *kmo* také Welchův t test potvrdil signifikantní indukci exprese genu ve skupině LPS v porovnání s kontrolní skupinou v časových bodech CT18 ( $P = 0,015811$ ) a CT9 ( $P = 0,016941$ ). Dvoucestná ANOVA u genu *aadat* v srdci našla signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LPS skupinou ( $F(1, 49) = 55,19; P < 0,0001$ ). U genu *aadat* signifikanci našel i Welchův t test v indukci

exprese genu po podání LPS v časových bodech CT15 ( $P = 0,003710$ ), CT18 ( $P = 0,004895$ ), CT3 ( $P = 0,048875$ ) a CT9 ( $P = 0,000052$ ). Dvoucestná ANOVA u genu *kynu* v srdci potvrdila signifikanci rozdílnosti mezi kontrolní a LPS skupinou ( $F(1, 49) = 9,614$ ;  $P = 0,0032$ ). Welchův t test našel signifikantní indukci exprese genu *kynu* po podání LPS v druhém časovém bodu CT12 ( $P = 0,048638$ ).

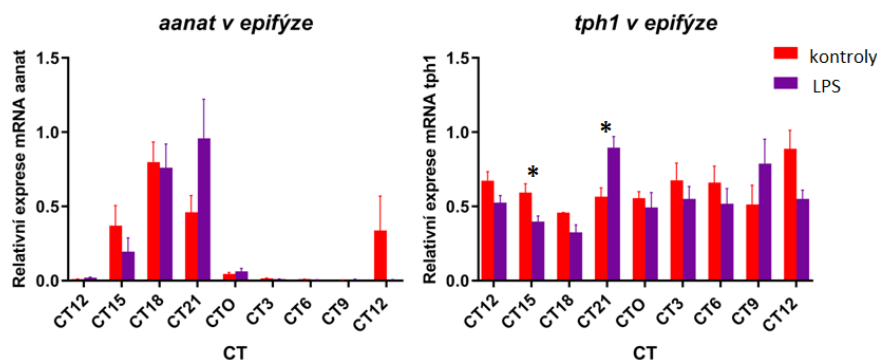


**Obrázek č. 14: Porovnání bazální a indukované exprese genů kynureninové dráhy ve vzorcích srdcí.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

### 5.2.2. Porovnání bazální a indukované exprese genů methoxyindolové dráhy

V epifýze byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů methoxyindolové dráhy *aanat* a *tph1* (viz. Obrázek č. 15). Dvoucestná ANOVA nepotvrdila signifikanci odlišnosti kontrolní a LPS skupiny pro gen *aanat* v epifýze ( $F(1, 48) = 0,002294$ ;  $P = 0,0620$ ). Welchův t test také nenalezl žádnou signifikanci u genu *aanat* v rozdílu mezi LPS a kontrolní skupinou v žádném z časových bodů. Dvoucestná ANOVA nepotvrdila signifikantní odlišnost kontrolní a LPS skupiny genu *tph1* v epifýze ( $F(1, 49) = 2,137$ ;  $P = 0,1501$ ). Welchův t test ale odhalil

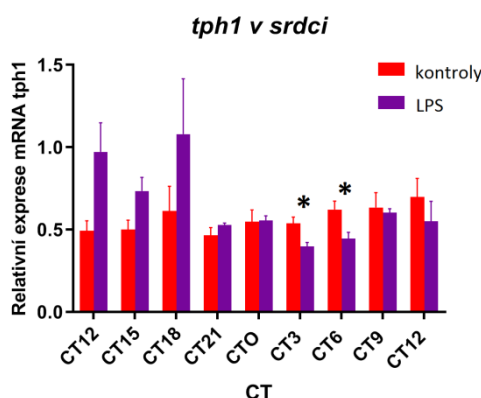
signifikantní pokles exprese genu *tph1* v LPS skupině oproti kontrole v časovém bodě CT15 ( $P = 0,034013$ ), a naopak vzrůst v časovém bodě CT21 ( $P = 0,013232$ ).



**Obrázek č. 15: Porovnání bazální a indukované exprese genů methoxyindolové dráhy ve vzorcích epifýz.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni epifýz v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

Ve vzorcích jater nebyla nalezena bazální ani indukovaná exprese genů methoxyindolové dráhy *tph1* ani *aanaat*.

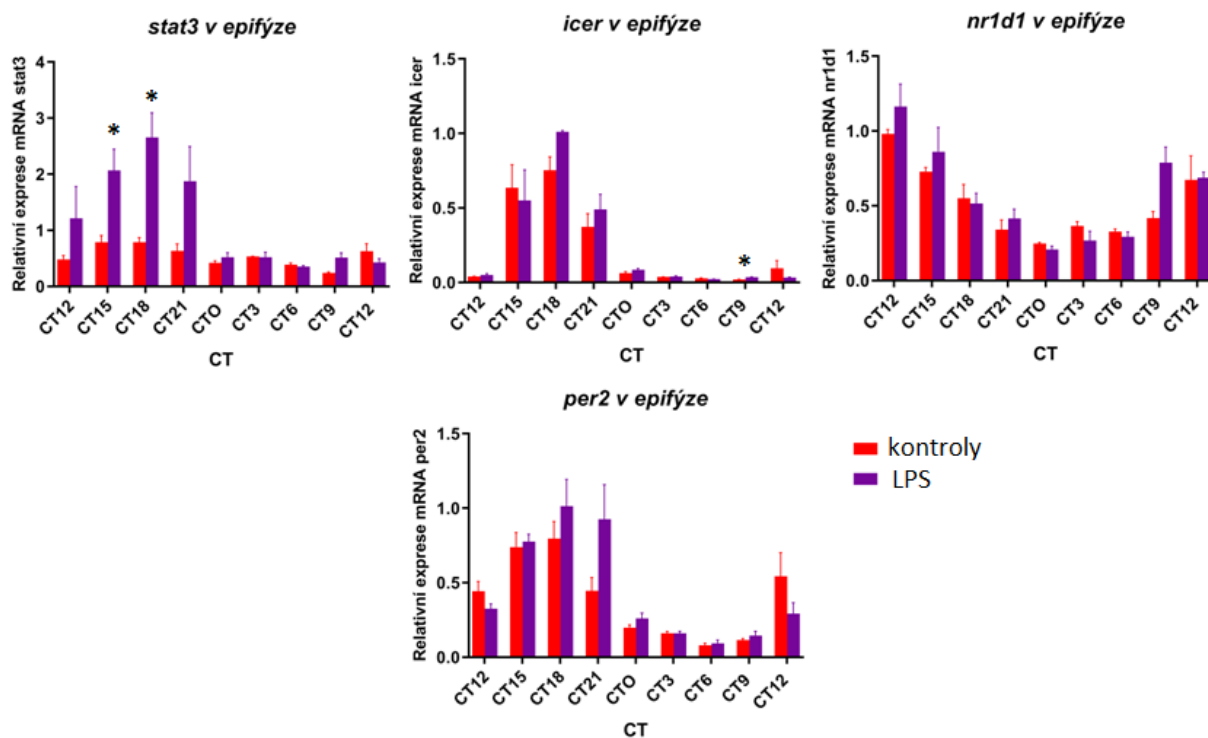
V srdci byla nalezena bazální i indukovaná exprese genu methoxyindolové dráhy *tph1* (viz. Obrázek č. 16). Gen *aanaat* nebyl ve vzorcích srdce měřen. Dvoucestná ANOVA u genu *tph1* v srdci nenalezla signifikanci v rozdílu mezi kontrolní a LPS skupinou ( $F(1, 49) = 2,150$ ;  $P = 0,1490$ ). Welchův t test vyhodnotil pokles exprese genu *tph1* v LPS skupině vůči kontrolní skupině jako signifikantní v časových bodech CT3 ( $P = 0,027637$ ) a CT6 ( $P = 0,035713$ ).



**Obrázek č. 16: Porovnání bazální a indukované exprese genu *tph1* methoxyindolové dráhy ve vzorcích srdcí.** Graf znázorňuje průměry relativní míry exprese mRNA genu ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

### 5.2.3. Porovnání bazální a indukované exprese genů transkripčních faktorů

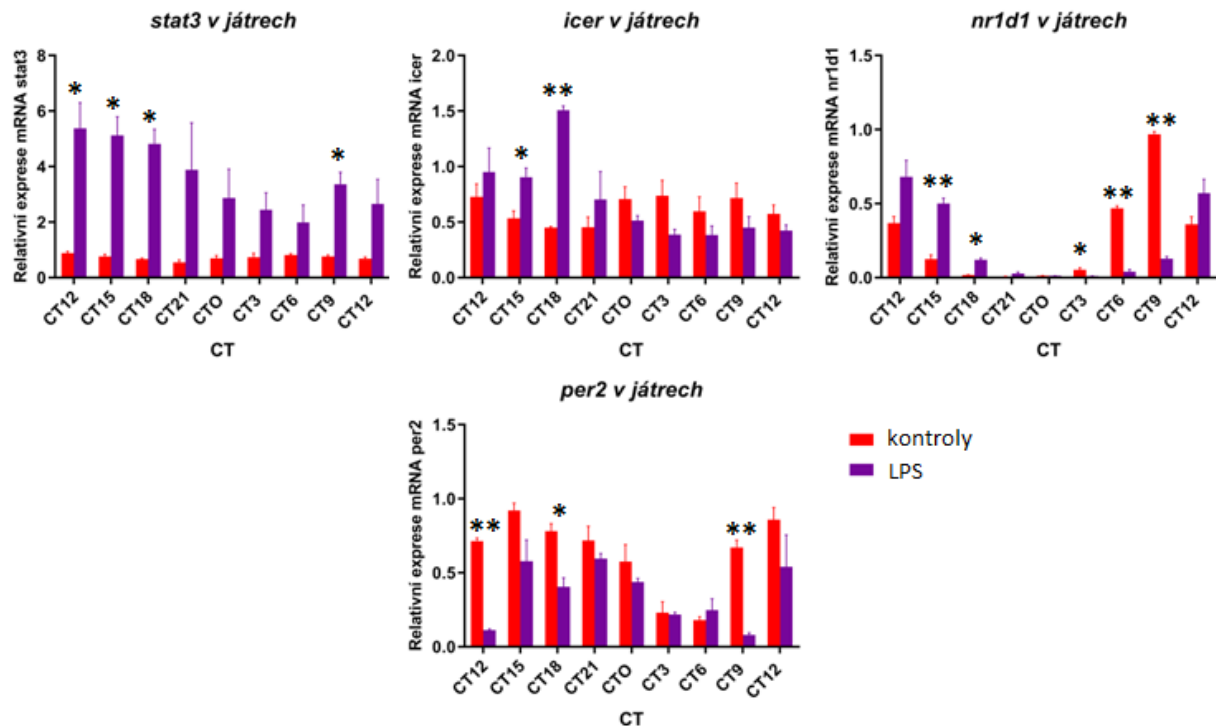
V epifýze byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů transkripčních faktorů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 17). Dvoucestná ANOVA mezi kontrolní a LPS skupinou pro gen *stat3* potvrdila signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LPS skupinou v epifýze ( $F(1, 48) = 19,70$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test vyhodnotil jako signifikantní vzrůst exprese genu *stat3* po podání LPS v porovnání s kontrolní skupinou u časových bodů CT15 ( $P = 0,037535$ ) a CT18 ( $P = 0,021662$ ). Dvoucestná analýza nenalezla signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LPS skupinou v expresi genu *icer* v epifýze ( $F(1, 46) = 0,5883$ ;  $P = 0,4470$ ). Welchův t test u genu *icer* našel signifikantní rozdíl mezi LPS a kontrolní skupinou v časovém bodě CT9 ( $P = 0,044374$ ). Dvoucestná ANOVA nepotvrdila signifikanci odlišnosti kontrolní a LPS skupiny genu *nr1d1* v epifýze ( $F(1, 50) = 2,492$ ;  $P = 0,1207$ ). Analýza Welchovým t testem u genu *nr1d1* neodhalila signifikanci v rozdílu mezi dvěma skupinami v žádném z časových bodů. Dvoucestná ANOVA nenašla signifikanci mezi kontrolní a LPS skupinou u genu *per2* v epifýze ( $F(1, 50) = 1,183$ ;  $P = 0,2819$ ). V rozdílu expresi genu *per2* mezi dvěma skupinami nepotvrdil signifikanci ani Welchův t test.



**Obrázek č. 17: Porovnání bazální a indukované exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích epifýz.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm$  SEM) v tkáni epifýz v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

V játrech byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů transkripčních faktorů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 18). Dvoucestná ANOVA v játrech u genu *stat3* mezi kontrolní a LPS skupinou potvrdila signifikantní rozdíl ( $F(1, 52) = 91,32$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test prokázal u genu *stat3* signifikantní indukci exprese genu po podání LPS v časových bodech CT12 ( $P = 0,015865$ ), CT15 ( $P = 0,007167$ ), CT18 ( $P = 0,003950$ ) a CT9 ( $P = 0,023837$ ). Dvoucestná ANOVA neprokázala signifikantní odlišnost kontrolní a LPS skupiny u exprese genu *icer* v játrech ( $F(1, 52) = 2,086$ ;  $P = 0,1546$ ). Welchův t test ale u genu *icer* prokázal signifikantní indukci exprese genu po podání LPS v časových bodech CT15 ( $P = 0,01395$ ) a CT18 ( $P = 0,000042$ ). Dvoucestná ANOVA neprokázala signifikanci odlišností kontrolní a LPS skupiny genu *nr1d1* v játrech ( $F(1, 50) = 2,873$ ;  $P = 0,0963$ ). Welchův t test ale prokázal signifikantní indukci exprese genu *nr1d1* po podání LPS v časových bodech CT15 ( $P = 0,000346$ ) a CT18 ( $P = 0,001636$ ), a signifikantní pokles exprese v časových bodech CT3 ( $P = 0,049231$ ), CT6 ( $P = 0,000011$ ) a CT9 ( $P < 0,000001$ ).

Dvoucestná ANOVA u genu *per2* prokázala signifikantní odlišnost kontrolní a LPS skupiny ( $F(1, 49) = 50.30$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův t test potvrdil signifikantní pokles exprese genu *per2* po podání LPS v časových bodech CT12 ( $P = 0,000008$ ), CT18 ( $P = 0,003506$ ) a CT9 ( $P = 0,000567$ ).

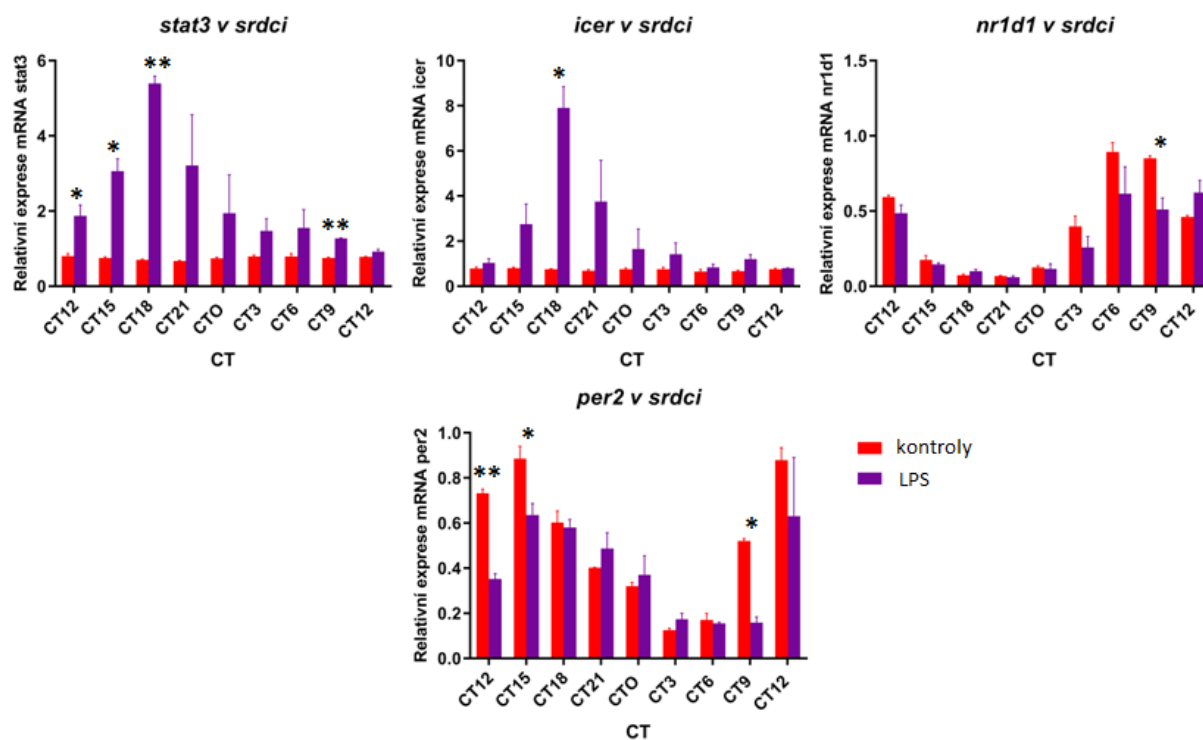


**Obrázek č. 18: Porovnání bazální a indukované exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích jater.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni jater v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

V srdci byla po ovlivnění LPS nalezena exprese genů transkripčních faktorů *stat3*, *icer*, *nr1d1* a *per2* (viz. Obrázek č. 19). Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní odlišnost kontrolní a LPS skupiny v expresi *stat3* genu v srdci ( $F(1, 50) = 56.56$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův test prokázal signifikantní indukci exprese genu *stat3* po podání LPS v časových bodech CT12 ( $P = 0,030135$ ), CT15 ( $P = 0,005495$ ), CT18 ( $P = 0,000139$ ) a CT9 ( $P = 0,00007$ ). Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní odlišnost kontrolní a LPS skupiny u genu *icer* v srdci ( $F(1, 49) = 30,77$ ;  $P < 0,0001$ ). Welchův test u genu *icer* potvrdil signifikanci indukce exprese genu po podání LPS v časovém bodě CT18 ( $P = 0,004704$ ). Dvoucestná ANOVA u exprese genu *nr1d1* prokázala signifikanci odlišnosti kontrolní a LPS



skupiny ( $F(1, 49) = 7.563$ ;  $P = 0,0083$ ). Analýza Welchovým testem prokázala u genu *nr1d1* signifikantní pokles exprese genu v LPS skupině v časovém bodě CT9 ( $P = 0,040792$ ). Dvoucestná ANOVA u exprese genu *per2* prokázala signifikanci odlišnosti kontrolní a LPS skupiny v srdci ( $F(1, 46) = 15,20$ ;  $P = 0,0003$ ). Welchův test u genu *per2* našel signifikanci poklesu exprese genu v LPS skupině oproti kontrolní skupině v časových bodech CT12 ( $P = 0,000266$ ), CT15 ( $P = 0,016084$ ) a CT9 ( $P = 0,001637$ ).



**Obrázek č. 19: Porovnání bazální a indukované exprese genů transkripčních faktorů ve vzorcích srdcí.** Grafy znázorňují průměry relativní míry exprese mRNA genů ( $n = 4 \pm \text{SEM}$ ) v tkáni srdcí v uvedených cirkadiálních časech pro skupinu kontrol (značeno červeně) a LPS (značeno fialově). Sloupce znázorňující hodnoty LPS a K skupin, které byly vyhodnoceny Welchovým t testem jako signifikantně rozdílné, jsou označeny \* (pro  $P < 0,05$ ) a \*\* (pro  $P < 0,001$ ).

## 6. Diskuze

### 6.1. Bazální exprese genů kynureninové a methoxyindolové dráhy a transkripčních faktorů, a jejich cirkadiánní rytmy

Výsledky RT-qPCR prokázaly expresi většiny zkoumaných genů v epifýze, játrech i srdci. Bazální exprese genu kynureninové dráhy *tdo2* byla pod hranicí detekovatelnosti v epifýze a srdci. Po důkladném prohledání příslušné literatury byly získány informace o silné expresi genu *tdo2* v játrech a slabší expresi v hippokampu, mozečku, striatu a mozkovém kmeni (Kanai *et al.*, 2009; Knox & Mehler, 1950). Je tedy možné předpokládat, že se *tdo2* v epifýze a srdci neexprimuje. Exprese genu *ido1* nebyla přítomna v játrech a srdci. To je částečně v souladu se studií provedené na myších (Dai & Zhu, 2010). V této studii nebyla exprese *ido1* prokázána v játrech, byla ale její slabá exprese byla detekována v srdeční tkáni. Odlišnost výsledků naší a této studie může být důsledkem použití jiného animálního modelu, myší místo potkanů. Dále tato studie ke kvantifikaci mRNA nepoužívala metodu RT-qPCR, ale metodu branched DNA assay. Přes tyto odlišnosti však metoda western blot ale ve stejné studii nepotvrdila v srdci přítomnost proteinu IDO1 (Dai & Zhu, 2010).

Ve vzorcích jater nebyla potvrzena exprese genu *aanat* methoxyindolové dráhy. Předchozí studie také ukázaly, že ve zdravých hepatocytech se gen *aanat* neexprimuje. Prokázaly však expresi *aanat* v cholangiocytech potkanů a v lidské cholangiocytové buněčné linii H69 (Han *et al.*, 2011; Renzi *et al.*, 2013). V játrech nebyla potvrzena ani exprese druhého zkoumaného methoxyindolového genu, *tph1*. Tento nálezn se shoduje se studií, kde nebyla potvrzena exprese *tph1* ani *tph2* v myších hepatocytech. Ve stejné studii ale byla nalezena exprese TPH1 i TPH2 v cholangiocytech (Omenetti *et al.*, 2011). Nicméně pozdější studie vyhodnocující expresi *tph1* v homogenizovaných potkaních játrech prokázala přítomnost jeho mRNA. Tato studie navíc prokázala bimodální rytmus exprese genu *tph1* v játrech s jedním peakem ve světlé fázi a druhým v temnostní fázi dne (Valdés-Fuentes *et al.*, 2015). Vzhledem k výsledkům studie provedené Omenetti a kolektivem (2011) můžeme usuzovat, že identifikovaná mRNA *tph1* v této studii pocházela z cholangiocytoů, a že jaterní tkáň v této studii byla odebrána z části jater bohatší na cholangiocyty, než v našem experimentu.

Bazální exprese genů byla analyzována dvěma statistickými metodami, které potvrzují přítomnost cirkadiánních rytmů. Cirkadiánní rytmicita exprese genů kynureninové dráhy v epifýze a v srdci nebyla potvrzena. Nicméně v játrech vykazovaly cirkadiánní rytmus bazální exprese genů *kmo*, *kynu* a *tdo2*. Tato práce tak poskytuje první přímou informaci o

cirkadiánní regulaci exprese enzymů kynureninové dráhy v játrech, jelikož v žádné předchozí studii tato informace nebyla popsána. V 60. letech minulého století byly publikovány práce ukazující cirkadiánní rytmus vylučování metabolitů kynureninové dráhy u lidí a koncentrace tryptofanu v krvi na myších, ze kterých byla podle soudobých znalostí vyvozena existence rytmu aktivity *tdo2* v játrech (Rapoport *et al.*, 1966; Rapoport & Beisel, 1968). Studie na myších vyhodnotila peak aktivity enzymu TDO2 v CT 20 ve fázi tmy. Naše měření prokázalo akrofázi cirkadiánního rytmu exprese genu *tdo2* v játrech přibližně v CT 10:30, což je na konci světlé fáze. Je zde potřeba brát v úvahu prodlení mezi transkripcí a translací proteinu a musíme tedy předpokládat, že akrofáze cirkadiánního rytmu hladiny mRNA a míry aktivity enzymu budou vůči sobě posunuté. Přesný mechanismus vzniku cirkadiánního rytmu exprese *tdo2* v játrech není známa. Je ale možné se domnívat, že v něm hraje roli transkripční faktor přítomný v játrech, CEBP $\beta$ . CEBP $\beta$  v játrech vykazuje cirkadiánní rytmus řízený hodinovými geny, který přetrvává i za stálé tmy. Akrofáze rytmu CEBP $\beta$  byla naměřena v ZT 13 v LD světelných podmínkách (Ma *et al.*, 2011). Dále bylo prokázáno, že CEBP $\beta$  indukuje expresi *tdo1* i *tdo2* a zvyšuje hladinu kynureninu, produktu TDO v játrech (Yang *et al.*, 2019). Lze tedy předpokládat spojitost rytmu CEBP $\beta$  a rytmu *tdo2*, ale pro potvrzení této hypotézy je potřeba další výzkum na toto téma. Rytmus exprese genů *kmo* a *kynu* v játrech byl popsán v našem experimentu poprvé, jelikož neexistují studie popisující ani cirkadiánní rytmus hladiny katalytických produktů enzymů KMO a KYNU v játrech. V budoucích studiích je tedy třeba nahlédnout do mechanismů vzniku těchto rytmů.

Na rozdíl od cirkadiánních rytmů enzymů kynureninové dráhy je cirkadiánní rytmus v expresi a aktivitě enzymu methoxyindolové dráhy AANAT známý již desítky let. Cirkadiánní rytmus jak exprese, tak aktivity enzymu AANAT má akrofázi během temnostní fáze, kdy hladina mRNA genu *aanat* vzrůstá až stopadesátkrát (Binkley *et al.*, 1979; Roseboom *et al.*, 1996). V tomto experimentu byl naměřen cirkadiánní rytmus exprese genu *aanat* v epifýze s akrofází přibližně v CT18, tedy uprostřed subjektivní noci, což souhlasí s výsledky předchozích studií. Naopak se v našem experimentu nepotvrdil rytmus enzymu TPH1, který v jiných studiích na potkanech vykazoval cirkadiánní rytmus jak v hladině mRNA, tak v aktivitě s peakem v temnostní fázi (Shibuya *et al.*, 1977; Sugden, 2003).

Cirkadiánní rytmy bazální exprese hodinových genů *nr1d1* a *per2* potvrzené našimi daty v epifýze, játrech i srdci nejsou překvapivé. Analýzu rytmicity těchto genů jsme využily jako pozitivní kontrolu přítomnosti cirkadiánních rytmů v našich vzorcích tkání. Výsledky tohoto experimentu se shodují s předchozí studií, která potvrdila cirkadiánní rytmus obou

genů v epifýze potkanů. S touto studií se shodují i peaky rytmu exprese genů; rytmus exprese *nr1d1* má vrchol na konci subjektivního dne a exprese *per2* uprostřed subjektivní noci (Kubištová *et al.*, 2020). Rytmus bazální exprese *per2* v játrech a srdci naměřený v tomto experimentu se shoduje se studii na myších; Exprese genu *per2* vykazovala akrofázi na začátku subjektivní noci a akrofáze rytmu exprese *nr1d1* byla potvrzena v druhé polovině subjektivního dne pro obě tkáně, což se shoduje s našimi nálezy (Bonaconsa *et al.*, 2014; Peirson *et al.*, 2006). Cirkadiánní rytmy bazální exprese transkripčních faktorů *icer* a *stat3* v epifýze byly také již potvrzena v předchozí studii Kubištové *et al.*, (2020), kde stejně jako v tomto experimentu vykazovaly oba rytmy exprese akrofázi uprostřed subjektivní noci.

Velikost imunitní odpovědi na systémové úrovni je ovlivněna denní dobou infikování. Při podání LPS na začátku aktivní fáze potkanů v čase ZT14 je odpověď imunitního systému větší, než když je podán během odpočinkové fáze v čase ZT2. Větší imunitní odpověď se projevuje asi dvakrát větší produkcí prozánětlivých cytokinů a hypotermií, která se objevuje po vysokých dávkách LPS (Guerrero-Vargas *et al.*, 2014). Významnou součástí imunitních signalizačních drah v mozku je transkripční faktor STAT3. Aktivace STAT3 po aplikaci LPS je téměř zcela zprostředkována prozánětlivým cytokinem IL6 (Rummel *et al.*, 2008). Předchozí studie naší laboratoře ukázala, že v SCN vyazuje exprese genu a hladina proteinu *stat3* cirkadiánní rytmus s akrofázi během dne (Moravcová *et al.*, 2016, 2018). Druhá zmiňovaná práce také prokázala závislost mezi mírou indukované exprese *stat3* a časem, kdy je podán LPS. Při podání LPS v čase ZT15 byla indukce exprese genu *stat3* v SCN asi desetkrát vyšší, než když byl LPS podán v čase ZT6. Zároveň tato studie prokázala, že pokusná zvířata, kterým byl podán LPS ve dne, rychleji obnovila svou motorickou aktivitu, což značí rychlejší rekonvalescenci (Moravcová *et al.*, 2018). Důležitý mechanismus účinku STAT3 je aktivace astrocytů, což bylo potvrzeno u mnoha neurodegenerativních chorob jako je Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a amyotrofická laterální skleróza (ALS) (Haim *et al.*, 2015; Shibata *et al.*, 2010). Tento mechanismus byl také potvrzen u několika mechanisticky různých myších modelů neurotoxicity (O'Callaghan *et al.*, 2014). Časová regulace exprese transkripčního faktoru STAT3 v mozku může být tedy jeden ze způsobů jakým cirkadiánní systém zasahuje do míry imunitní odpovědi. Domníváme se, že z podobných důvodů je tak důležité provádět studie na cirkadiánní rytmicitu enzymů kynureninové dráhy a jejich neuroaktivních a imunomodulačních metabolitů. Jejich rytmus by mohl být klíčový ke zlepšení léčby onemocnění, ve kterých figurují.

## 6.2. Působení LPS na expresi genů kynureninové a methoxyindolové dráhy

Další část našeho experimentu se týkala vlivu intraperitoneálního podání LPS na míru exprese zkoumaných genů. Nejvýrazněji LPS působilo na expresi *ido1* v játrech a srdci, která v kontrolní skupině nevykazovala žádnou bazální expresi, a LPS její expresi výrazně indukoval. Také v epifýze vykazoval gen *ido1* signifikantně vyšší míru exprese v LPS skupině. Zajímavé bylo zjištění, že v játrech a srdci byla indukce exprese *ido1* okamžitá a rychle klesající, ale v epifýze trvala více než 24 hodin, až za časový rámec našeho pokusu. Fakt, že podání LPS způsobuje zvýšení produkce IFN $\gamma$ , je známý již desítky let (Wada et al., 1985). Bylo rovněž již stanoveno, že IFN $\gamma$  indukuje expresi genu *ido1* (Takikawa et al., 1999). Nověji bylo ale potvrzeno, že existuje i mechanismus zvýšení exprese *ido1* pomocí LPS, který je nezávislý na IFN $\gamma$ . Studie na myších prokázala, že další významnou roli v této signalizační dráze hraje TNF $\alpha$ . Indukce exprese přes TNF $\alpha$  po podání LPS bylo v této studii potvrzeno i v mozku (Fujigaki et al., 2001). Novější studie potvrdila existenci této signalizační dráhy u prasat. Stejná studie potvrdila indukci exprese *ido1* v játrech po ovlivnění LPS (Wirthgen et al., 2013). Kromě enzymu IDO2 v játrech byl rozdíl v expresi všech genů kynureninové dráhy v epifýze, játrech i srdci signifikantní.

Expresí genů v epifýze byla podáním LPS indukována u všech genů kromě genu *aadat*, u kterého byla exprese potlačena v časových bodech CT15 a CT18, a indukována v bodě CT21. Změna exprese genů *kmo* a *aadat* naměřená v našich vzorcích souhlasí s výsledky presentované studii na potkanech, ve které po systémovém podání LPS pozorovali v mozku indukci exprese *kmo*, ale ne *kynu*. Zároveň tato studie potvrzuje, že bazální exprese *aadat* je v mozku mnohokrát vyšší než bazální exprese *kmo*. Tyto výsledky naznačují, že vysoká hladina KAT2 chrání neurony před excitotoxickým produktem metabolické dráhy enzymu KMO, kyselinou chinolinovou, zpracováním většího množství substrátu kynureninu k produkci neuroprotektivní kyseliny kynurenové. Větší produkci KMO je také kynureninová dráha sváděna k větší produkci NAD<sup>+</sup>, což podporuje výrobu energie ve vytižených buňkách imunitního systému během jeho aktivace (Connor et al., 2008). Expresí genů kynureninové dráhy v srdci byla také indukována podáním LPS, a to u všech zkoumaných genů. Indukce genů *ido1* a *ido2* v srdci byla okamžitá a klesala už asi 10 hodin po podání LPS. Naopak indukce exprese genu *kmo* byla opožděnější, s peakem exprese až 25 hodin po podání LPS. Indukce *aadat* a *kynu* byla konstantní a trvala až za časový rámec našeho experimentu. Ve vzorcích jater byla na rozdíl od epifýzy a srdce potlačena exprese genů *aadat*, *kmo* a *kynu*. Tento výsledek podporuje studie provedena na myších, ve které bylo potvrzeno potlačení

exprese genu *kynu* v játrech po podání LPS. Aktivita KMO byla v tomto pokusu také snížena po podání LPS, i když rozdíl mezi experimentální a kontrolní skupinou nebyl signifikantní (Larkin et al., 2016). Většina kynureninu je produkováno v játrech díky působení enzymu TDO2, jehož exprese je v játrech po podání LPS zvýšena (Kanai et al., 2009). Bylo prokázáno, že v CNS pískomilů pochází zhruba 78% kynureninu za normálních podmínek z plasmy. Tento podíl vzrostl na zhruba 100% po intraperitoneálním podání LPS (Kita et al., 2002). Lze tedy předpokládat, že díky poklesu exprese enzymů KAT2, KYNU a KMO bude větší množství produkovaného kynureninu distribuováno krví do organismu včetně CNS, kde je dále metabolizován na neuroaktivní a imunomodulační metabolity kynureninové dráhy. Zároveň je z těchto výsledků patrné, že konečný účinek kynureninové dráhy je závislý na typu sledované buňky a tkáně a její specifické reakce na zánětlivý stav. Tkáňová specifita odpovědi kynureninové dráhy na zánět je zajímavá oblast k dalšímu studiu, jelikož je z velké části neprobádaná. Expresе genů *tdo2* a *ido1* byla naopak podáním LPS v játrech signifikantně indukována. Expresе genů *ido2* byla podáním LPS nejprve potlačena a poté 13 hodin po podání LPS indukována. Tyto změny v expresi však nedosáhly statistické signifikance.

Expresе genů methoxyindolové dráhy *aanat* a *tph1* nebyla podáním LPS signifikantně ovlivněna v žádné z tkání. Naopak exprese transkripčního faktoru STAT3 se po podání LPS významně zvýšila v epifýze, játrech i srdci. Tento výsledek se shoduje s výsledkem předchozí studie naší laboratoře, kde byla exprese genu *stat3* indukována v SCN po podání LPS. Nejvyšší míra indukce, která při podání LPS uprostřed dne byla v SCN naměřena osm hodin po podání, se relativně shoduje s našimi výsledky, kde byla nejsignifikantnější indukce deset hodin po podání v epifýze, srdci i játrech. (Moravcová et al., 2018). Studie ukazují, že podání LPS vede zároveň k STAT3 fosforylaci a tím jeho aktivaci (Ruff-Jamison et al., 1994). Transkripční faktor ICER vykazoval indukci exprese po podání LPS v srdci. Indukce genu *icer* byla také v LPS skupině signifikantní v játrech, i když jen v časových bodech CT15 a CT18. V epifýze ale indukce *icer* injekcí LPS nebyla pozorována, podobně jako indukce exprese genu *aanat* v experimentální skupině.

Hodinové geny *nr1d1* a *per2* v srdci oba vykazovaly snížení exprese v důsledku podání LPS. Expresе genu *per2* byla snížena i ve vzorcích jater. Tento výsledek se shoduje s výsledkem studie na myších, ve které autoři pozorovali pokles exprese genu *per2* v tkáních jater i srdcí. Toto potlačení exprese je pozorováno již dvě hodiny po podání LPS, což rozšiřuje znalost účinku LPS na expresi *per2* za časový rámec našeho experimentu. V této

studii také prokázali, že účinek LPS na expresi *per2* je zprostředkováván přes zvýšení produkce prozánětlivého cytokinu TNF $\alpha$  (Yamamura et al., 2010). Narušení cirkadiálních hodin v zánětlivých podmínkách pravděpodobně probíhá díky schopnosti TNF $\alpha$  inhibovat BMAL1/CLOCK aktivovanou expresi genu *per2* (Cavadini et al., 2007). Zároveň přítomnost jiných prozánětlivých cytokinů, jako je IFN $\alpha$  a IFN $\gamma$  snižuje expresi *per2* genu, a to na začátku subjektivní noci, kdy hladina mRNA *per2* začíná stoupat (Ohdo et al., 2001). Zajímavý efekt mělo podání LPS na expresi genu *nr1d1* v játrech, kde jsme až 13 hodin po podání LPS pozorovaly indukci, a od 19. hodiny od podání LPS do 25. hodiny signifikantní potlačení exprese genu. Společně se snížením exprese genu *per2* na začátku subjektivní noci tyto výsledky korelují s informací, že podání LPS na rozmezí odpočinkové a aktivní fázi dne působí zpoždění endogenního cirkadiálního rytmu (Marpegán et al., 2005).

Naše výsledky také prokázaly rozdílnost v časování exprese zkoumaných genů v různých tkáních. *Ido1* vykazoval v srdci a játrech okamžitou indukci exprese, ale v epifýze přetrvala až 28 hodin po podání LPS a za časový rámeček našeho pokusu. LPS nepřekračuje hematoencefalickou bariéru a v mozku působí přes interakci s receptory endoteliálních buněk. Při intraperitoneálním podání tak může působit zánětlivou reakci s časovým rozdílem v mozku než v ostatních orgánech (Banks & Robinson, 2010; Singh & Jiang, 2004). Přesto, že epifýza stojí mimo hematoencefalickou bariéru, naše výsledky ukazují podobné zpoždění; *Ido2* v epifýze vykazovala největší indukci exprese 7 a 10 hodin po podání LPS. Indukce genů *kmo* a *kynu* nastala v epifýze ale později, signifikantní indukce byla naměřena až v časech CT18, CT21 a CT9 pro gen *kmo*, a v CT21, CT0 a CT9 pro gen *kynu*. Podobný výsledek pro gen *kmo* byl pozorován ve studii na potkaním mozku, kde byla naměřena indukce exprese genu *kmo* až 24 hodin po podání LPS, které předcházelo potlačení exprese 4 hodiny po podání LPS. Příčina prodloužení v indukci exprese není známa a vyžaduje další přezkoumání (Connor et al., 2008).

Přestože v našem pokusu nebyla měřena produkce metabolitů, můžeme předpokládat, že naměřené změny v expresi zkoumaných enzymů ji mění. Expese alespoň jednoho z enzymů produkujících kynurenin, IDO1, IDO2 a TDO2 byla v experimentální skupině zvýšena ve všech zkoumaných tkáních, a zároveň jejich exprese nikdy nebyla potlačena. Je pravděpodobné, že s touto indukcí stoupla v orgánech i koncentrace kynureninu. Nejen že je kynurenin dále využíván jako substrát pro další metabolity, ale sám působí imunomodulačně. Kynurenin zvyšuje produkci regulačních T lymfocytů, což například zmírňuje průběh

roztroušené sklerózy v myších modelech (Kwidzinski et al., 2005; Mezrich et al., 2011). Kynurenin může také působit protizánětlivě snížením produkce IFN $\gamma$  při aktivaci imunitního systému, což působí jako negativní zpětná vazba pro expresi *ido1* (Maes et al., 2007). Tento protizánětlivý efekt může zprostředkovávat kynurenin produkovaný v játrech v zánětlivých podmínkách, jelikož jsme ukázali, že exprese enzymů dále metabolizující kynurenin, KYNU, KMO a KAT2, je po podání LPS potlačena. Dále může být kynurenin metabolizován až na NAD<sup>+</sup> při zvýšené expresi genu *kmo* v epifýze a srdci po podání LPS, což dodává potřebnou energii imunitním buňkám během velkých výdajů v zánětlivých podmínkách (Connor et al., 2008). Zvýšenou expresi enzymů IDO jsme po podání LPS pozorovali zároveň v srdci, kde je jejich aktivita spřažena se snížením zánětu cév a krevního tlaku díky vasodilatační schopnosti kynureninu (Polyzos et al., 2015; Y. Wang et al., 2010). Zvýšení exprese enzymů KMO a KYNU, který jsme v našich výsledcích potvrdily v epifýze a v srdci, teoreticky směřuje metabolismus kynureninu k produkci kyseliny chinolinové. Díky neurotoxické povaze kyseliny chinolinové a její schopnosti nadměrně aktivovat glutamátové NMDA receptory vzrůst její koncentrace může působit pocity deprese a figurovat v patologii Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Guillemin et al., 2007; Heilman et al., 2020; Kruse et al., 2019). Tyto účinky jsou ale z většiny zprostředkovány jen kyselinou chinolinovou produkovanou přímo v mozku, jelikož přes hematoencefalickou bariéru dokáže přecházet jen v malém množství (Fukui et al., 1991). V budoucích studiích bude důležité se zaměřit na účinek LPS na produkci metabolitů v různých tkáních, jelikož toto téma je málo probádané a více informací je potřeba pro zařazení regulace metabolitů kynureninové dráhy do potencionálních terapeutických metod.



## 7. Závěr

Výsledky této práce poskytují další informace o cirkadiánních rytmech enzymů methoxyindolové dráhy, kynureninové dráhy, hodinových genů *nr1d1* a *per2* a transkripčních faktorů ICER a STAT3 v epifýze, srdci a játrech potkana. Také jsme hodnotily vliv podání LPS na expresi těchto genů. Poprvé zde popisujeme cirkadiánní rytmicitu genů kynureninové dráhy *kmo*, *kynu* a *tdo2* v potkaních játrech. Je možné předpokládat, že exprese genu *tdo2* je ovlivněna transkripčním faktorem CEBP $\beta$ , který vykazuje v játrech cirkadiánní rytmus a zároveň indukuje expresi *tdo2*. Dosud nebylo provedeno mnoho studií o cirkadiánních rytmech genů kynureninové dráhy a neexistuje na toto téma mnoho informací. Další studie by mohly prohloubit znalost vazby mezi cirkadiánním systémem a kynureninovou dráhou, která by přispěla k chronofarmakologickému přístupu k léčbě mnoha onemocnění, ve kterých hrají roli metabolity kynureninové dráhy. Podle cirkadiánního průběhu exprese či aktivity enzymu můžeme určit ideální denní dobu pro podání léčivé látky, kdy bude v těle nejméně látek s nežádoucí interakcí s léčivem a kdy bude jeho účinnost nejvyšší. Naše práce se také zaměřila na účinek podání LPS na expresi sledovaných genů. Fakt, že aktivace imunitního systému zvyšuje aktivitu kynureninové dráhy je již známa. Zajímavé bylo ale zjištění, že existuje rozdíl v časování mezi indukcí exprese genu *ido1* po podání LPS v játrech a srdci a indukcí v epifýze, kde trvá déle než 24 hodin po podání. Dále bylo v epifýze časování indukce genů *kmo* a *kynu* opožděno oproti okamžité indukci exprese genu *ido2*. Příčina tohoto prodlení není známa a vyžaduje další přezkoumání. Odhalily jsme také, že LPS indukuje aktivitu kynureninové dráhy v epifýze a v srdci, ale v játrech potlačuje expresi genů *kmo*, *aadat* a *kynu*. Můžeme se domnívat, že tento účinek způsobuje vyšší koncentraci kynureninu, který je během zánětlivé reakce volný k distribuci po těle, kde může být dále využíván k produkci imunoaktivních metabolitů. Tkáňová specifita reakce kynureninové dráhy na aktivaci imunitního systému je z velké části neprobádaná a otevírá nové možnosti k výzkumu.

Metabolity kynureninové i methoxyindolové dráhy působí neuromodulačně a imunomodulačně. Tato práce představuje nové poznatky o chování enzymů těchto metabolických drah ve fyziologických a patofyziologických podmínkách a nastiňuje možnou interakci mezi cirkadiánním systémem a metabolismem tryptofanu.

## Seznam literatury

- Abe, M., Itoh, M. T., Miyata, M., Shimizu, K., & Sumi, Y. (2000). Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in rat lens. *Experimental Eye Research*, 70(6), 805–808. <https://doi.org/10.1006/exer.2000.0845>
- Aeschbach, D., Sher, L., Postolache, T. T., Matthews, J. R., Jackson, M. A., & Wehr, T. A. (2003). A longer biological night in long sleepers than in short sleepers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(1), 26–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020827>
- Albertini, M. C., Accorsi, A., Uguccioni, F., Paternoster, L., Cerella, C., Nicola, M. D. E., Alessio, M. D., Bergamaschi, A., & Magrini, A. (2006). Intracellular Pro-oxidant Activity of Melatonin Deprives U937 Cells of Reduced Glutathione without Affecting Glutathione Peroxidase Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091(1), 10–16. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.050>
- Arvidson, N. G., Gudbjornsson, B., Elfman, L., Ryden, A., Totterman, T. H., & Hallgren, R. (1994). Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 53, 521–524.
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man. *Science*, 148(3676), 1427–1432. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6771-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6771-8_8)
- Ball, H. J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C. J. D., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J. A., Stocker, R., Jermini, L. S., & Hunt, N. H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396(1), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.010>
- Banks, W. A., & Robinson, S. M. (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.001>
- Barth, M. C., Ahluwalia, N., Anderson, T. J. T., Hardy, G. J., Sinha, S., Alvarez-cardona, J. A., Pruitt, I. E., Rhee, E. P., Colvin, R. A., & Gerszten, R. E. (2009). Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19189–19195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024042>
- Bartness, T. J., & Wade, G. N. (1984). Photoperiodic Control of Body Weight and Energy Role of Pineal Gland, Melatonin, Gonads, and Diet \*. *Endocrinology*, 114(2), 492–498.
- Binkley, S., Hryshchyshyn, M., & Reilly, K. (1979). N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. In *Nature* (Vol. 281, Issue 5731, pp. 479–481). <https://doi.org/10.1038/281479a0>
- Bonaconsa, M., Malpeli, G., Montaruli, A., Carandente, F., Grassi-zucconi, G., & Bentivoglio, M. (2014). Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Experimental Gerontology*, 55, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.011>

- Boullin, D. J. (1964). Observations on the Significance of 5-Hydroxytryptamine in Relation To the Peristaltic Reflex of the Rat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 23(1), 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1964.tb01563.x>
- Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H. G., Göbel, G., Margreiter, R., Königsrainer, A., Fuchs, D., & Amberger, A. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1144–1151. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1966>
- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Franco, L., Sánchez, C., Rodríguez, A. B., Rivero, M., & Barriga, C. (2012). Assessment of the intake of tryptophan-enriched cereals in the elderly and its influence on the sleep-wake circadian rhythm. *Antropologia Portuguesa*, 29(January), 113–120. [https://doi.org/10.14195/2182-7982\\_29\\_8](https://doi.org/10.14195/2182-7982_29_8)
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D. M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., & Keesler, G. A. (2001). Human casein kinase I $\delta$  phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Letters*, 489(2–3), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02434-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02434-0)
- Capsoni, S., Viwanathan, M., Saavedra, J. M., & Maria, A. N. A. (1994). Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology*, 135(1), 373–378.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., García-Mauriño, S., Reiter, R. J., & Guerrero, J. M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(3), 537–539. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0694fje>
- Cavadini, G., Petrzilka, S., Kohler, P., Jud, C., Tobler, I., Birchler, T., & Fontana, A. (2007). TNF- $\alpha$  suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12843–12848.
- Ceinos, R. M., Chansard, M., Revel, F., Calgari, C., Míguez, J. M., & Simonneaux, V. (2004). Analysis of adrenergic regulation of melatonin synthesis in Siberian hamster pineal emphasizes the role of HIOMT. *NeuroSignals*, 13(6), 308–317. <https://doi.org/10.1159/000081966>
- Connor, T. J., Starr, N., Sullivan, J. B. O., & Harkin, A. (2008). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: A role for IFN- $\gamma$ ? *Neuroscience Letters*, 441, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.007>
- Dai, X., & Zhu, B. T. (2010). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Tissue Distribution and Cellular Localization in Mice: Implications for Its Biological Functions The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(1), 17–28. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953604>
- Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U.

- (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*, 14(23), 2950–2961. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>
- Darmon, M. C., Guibert, B., Leviel, V., Ehret, M., Maitre, M., & Mallet, J. (1988). Sequence of Two mRNAs Encoding Active Rat Tryptophan Hydroxylase. *Journal of Neurochemistry*, 51(1), 312–316. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb04871.x>
- DAY, R. (1941). Regulation of Body Temperature During Sleep. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 61(4), 734. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1941.02000100068008>
- Dehghan, F., Shahrokhi, N., Khaksari, M., & Soltani, Z. (2017). Does the administration of melatonin during post-traumatic brain injury affect cytokine levels? *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0417-1>
- 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 $\epsilon$ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 17248–17254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M111466200>
- Eisenberger, N. I., Inagaki, T. K., Mashal, N. M., & Irwin, M. R. (2010). Inflammation and Social Experience: An Inflammatory Challenge Induces Feelings of Social Disconnection in Addition to Depressed Mood. *Brain, Behavior and Immunity*, 24(4), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.12.009>.Inflammation
- Foster, A. C., Collins, J. F., & Schwarcz, R. (1983). On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology*, 22(12 PART 2), 1331–1342. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(83\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0028-3908(83)90221-6)
- Fujigaki, S., Saito, K., Sekikawa, K., Tone, S., Takikawa, O., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., & Seishima, M. (2001). Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- $\gamma$ -independent mechanism. *European Journal of Immunology*, 31(8), 2313–2318.
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., & Smith, Q. R. (1991). Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 56(6), 2007–2017.
- Fukunaga, M., Yamamoto, Y., Kawasoe, M., Arioka, Y., Murakami, Y., Hoshi, M., & Saito, K. (2012). Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: The absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(11), 854–860. <https://doi.org/10.1369/0022155412458926>
- Funakoshi, H., Kanai, M., & Nakamura, T. (2011). Modulation of tryptophan metabolism, promotion of neurogenesis and alteration of anxiety-related behavior in tryptophan 2,3-dioxygenase-deficient mice. *International Journal of Tryptophan Research*, 4(1), 7–18. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S5783>
- Galano, A., Tan, X., & Reiter, R. J. (2014). Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxyl radical scavenging activity of melatonin. *Royal Society of*

*Chemistry*, 4(10), 5220–5227. <https://doi.org/10.1039/c3ra44604b>

- Galley, H. F., Lowes, D. A., Allen, L., Cameron, G., Aucott, L. S., & Webster, N. R. (2014). Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *Journal of Pineal Research*, 56(4), 427–438. <https://doi.org/10.1111/jpi.12134>
- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A., & Klein, D. C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8083–8088. <https://doi.org/10.1073/pnas.141118798>
- Gauer, F., & Craft, C. M. (1996). Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Research*, 737(1–2), 99–109. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00632-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00632-4)
- 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(June), 1564–1568.
- Gibbs, J. E., Blaikley, J., Beesley, S., Matthews, L., Simpson, K. D., Boyce, S. H., Farrow, S. N., Else, K. J., Singh, D., Ray, D. W., & Loudon, A. S. I. (2012). The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106750109>
- Gong, Y., Hua, N., Zang, X., Huang, T., & He, L. (2017). Melatonin ameliorates A $\beta$  1–42 - induced Alzheimer's cognitive deficits in mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 70–80. <https://doi.org/10.1111/jphp.12830>
- Green, D. J., & Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research*, 245(1), 198–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90361-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90361-4)
- Grégoire, L., Rassoulpour, A., Guidetti, P., Samadi, P., Paul, J. B., Izzo, E., & Schwarcz, R. (2008). Prolonged kynurenine 3-hydroxylase inhibition reduces development of levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Behavioural Brain Research*, 186(2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.007>
- Guerrero-Vargas, N. N., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. del C., García, J., Guzmán-Ruiz, M., Carrero, J. C., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2014). Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, 273(1–2), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.05.012>
- Guillemin, G. J., & Brew, B. J. (2016). Pericytes: a Review of Function and Identification. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(3), 388–397. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303114.1>
- Guillemin, G. J., Brew, B. J., Noonan, C. E., Knight, T. G., Smythe, G. A., & Cullen, K. M. (2007). Mass spectrometric detection of quinolinic acid in microdissected Alzheimer's

- disease plaques. *International Congress Series*, 1304, 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2007.07.012>
- Guillemin, G. J., Smythe, G., Takikawa, O., & Brew, B. J. (2004). Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase and Production of Quinolinic Acid by Human Microglia, Astrocytes, and Neurons. *Glia*, 49(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20090>
- Gupta, N. K., Thaker, A. I., Kanuri, N., Riehl, T. E., Rowley, C. W., Stenson, W. F., & Ciorba, M. A. (2012). Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: Correlation with Crohn's disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(7), 1214–1220. <https://doi.org/10.1002/ibd.21849>
- Haim, L. Ben, Ceyzériat, K., Sauvage, M. A. C. de, Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., & Escartin, C. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Hakanson, R., & Hoffman, G. J. (1967). A sensitive radiometric assay for tryptophan-5-hydroxylase. *Biochemical Pharmacology*, 16, 1677–1680.
- Hakim, H., Debernardo, A. P., & Silver, R. (1991). Circadian Locomotor Rhythms, but Not Photoperiodic Responses, Survive Surgical Isolation of the SCN in Hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, 6(2), 97–113. <https://doi.org/10.1177/074873049100600201>
- Han, Y., Demorrow, S., Invernizzi, P., Jing, Q., Glaser, S., Renzi, A., Meng, F., Venter, J., Bernuzzi, F., White, M., Francis, H., Lleo, A., Marzioni, M., Onori, P., Alvaro, D., Torzilli, G., Gaudio, E., Alpini, G., Venter, J., ... Marzioni, M. (2011). Melatonin exerts by an autocrine loop antiproliferative effects in cholangiocarcinoma; its synthesis is reduced favoring cholangiocarcinoma growth. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 26, 623–633. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00118.2011>
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., & Fahrenkrug, J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-j0002.2002>
- Hartai, Z., Juhász, A., Rimanóczy, Á., Janáky, T., Donkó, T., Dux, L., Penke, B., Tóth, G. K., Janka, Z., & Kálmán, J. (2007). Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 50(2), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.012>
- Heilman, P. L., Wang, E. W., Lewis, M. M., Krzyzanowski, S., Capan, C. D., Burmeister, A. R., Du, G., Galvis, M. L. E., Brundin, P., Huang, X., & Brundin, L. (2020). Tryptophan Metabolites Are Associated With Symptoms and Nigral Pathology in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 1(March), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mds.28202>
- Heyes, M. P., Saito, K., Crowley, J. S., Davis, L. E., Demitrack, M. A., Dilling, L. A., Elia, J., Kruesi, M. J. P., Lackner, A., Leonard, H. L., Markey, S. P., Martin, A., Milstein, S., Mouradian, M. M., Pranzatelli, M. R., Quearry, B. J., Salazar, A., Smith, M., Strauss, S.

- E., ... Tourtellotte, W. W. (1992). QUINOLINIC ACID AND KYNURENINE PATHWAY METABOLISM IN INFLAMMATORY AND NON-INFLAMMATORY NEUROLOGICAL DISEASE. *Brain*, *115*(5), 1249–1273.
- Hikichi, T., Tateda, N., & Miura, T. (2011). Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmology*, *5*(1), 655–660. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S19559>
- Hoppe, J. B., Frozza, L., Horn, A. P., Comiran, R. A., Bernardi, A., Martha, M., & Oliveira, A. M. (2010). Amyloid- b neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin : involvement of GSK-3 b , tau and neuroinflammation. *Journal of Pineal Research*, *48*, 230–238. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00747.x>
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with c-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, *71*(2), 171–186. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>
- Ino, K., Yoshida, N., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kidokoro, K., Takahashi, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nomura, S., Nagasaka, T., Takikawa, O., & Kikkawa, F. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *British Journal of Cancer*, *95*(11), 1555–1561. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603477>
- Jankovic, B. D., Isakovic, K., & Petrovic, S. (1970). Effect of Pinelectomy on Immune Reactions in the Rat. *Immunology*, *18*(1), 1–6.
- Jiang, Z. G., Nelson, C. S., & Allen, C. N. (1995). Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Research*, *687*(1–2), 125–132. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00478-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00478-9)
- Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., & Nakamura, T. (2009). Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Molecular Brain*, *2*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-8>
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, Gina, D., Herzog, E. D., Volk, H.-D., Kramer, A., & Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21407–21412. <https://doi.org/10.1016/b978-1-85573-831-7.50164-4>
- Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., & Baudry, M. (1989). A Glycine Site Associated with N-Methyl-d-Aspartic Acid Receptors: Characterization and Identification of a New Class of Antagonists. *Journal of Neurochemistry*, *52*(4), 1319–1328. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb01881.x>
- Kiessling, S., Dubeau-Larameé, G., Ohm, H., Labrecque, N., Olivier, M., & Cermakian, N. (2017). The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11297-8>
- Kiss, C., Ceresoli-Borroni, G., Guidetti, P., Zielke, C. L., Zielke, H. R., & Schwarcz, R. (2003). Kynurenate production by cultured human astrocytes. *Journal of Neural Transmission*, *110*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0770-z>

- Kita, T., Morrison, P. F., Heyes, M. P., & Markey, S. P. (2002). Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors to the L-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. *Journal of Neurochemistry*, *82*(2), 258–268. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00955.x>
- Klein, D. C., Sugden, D., & Weller, J. L. (1983). Postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptors potentiate the  $\beta$ -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(2), 599–603. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.2.599>
- Klein, David C., & Weller, J. L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, *169*(3950), 1093–1095. <https://doi.org/10.1126/science.169.3950.1093>
- Knox, W. E., & Mehler, A. H. (1950). The conversion of tryptophan to kynurenine in liver I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. *Journal of Biological Chemistry*, *187*(1), 419–430.
- Kohl, C., Walch, T., Huber, R., Kemmler, G., Neurauter, G., Fuchs, D., Sölder, E., Schröcksnadel, H., & Sperner-Unterweger, B. (2005). Measurement of tryptophan, kynurenine and neopterin in women with and without postpartum blues. *Journal of Affective Disorders*, *86*(2–3), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2004.12.013>
- Kruse, J. L., Hyong-Jin Cho, J., Olmstead, R., Hwang, L., Faull, K., Eisenberger, N. I., & Irwin, M. R. (2019). Kynurenine Metabolism and Inflammation-Induced Depressed Mood: A Human Experimental Study. *Psychoneuroendocrinology*, *176*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104371>.Kynurenine
- Kubišťová, A., Spišská, V., Petrželková, L., Hrubcová, L., Moravcová, S., Maierová, L., & Bendová, Z. (2020). Constant Light in Critical Postnatal Days Affects Circadian Rhythms in Locomotion and Gene Expression in the Suprachiasmatic Nucleus, Retina, and Pineal Gland Later in Life. *Biomedicines*, *1*, 1–19.
- Kudo, Y., Boyd, C. A. R., Sargent, I. L., & Redman, C. W. G. (2003). Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *188*(3), 719–726. <https://doi.org/10.1067/mob.2003.156>
- Kwidzinski, E., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R., Bechmann, I., & Neuroimmunology, E. (2005). Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(10), 1–19.
- Larkin, P. B., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Nakamura, T., Schwarcz, R., & Muchowski, P. J. (2016). Tryptophan 2,3-Dioxygenase and Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Make Separate, Tissue-Specific Contributions to Basal and Inflammation-Induced Kynurenine Pathway Metabolism in Mice. *BBA - General Subjects*, *1860*(11), 2345–2354. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.002>
- Lee, G. K., Park, H. J., MacLeod, M., Chandler, P., Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2002). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*, *107*(4), 452–460. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01526.x>



- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lek, T. H., & Mori, W. (1958). ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2387.
- Liu, T., & Borjigin, J. (2005). N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *Journal of Pineal Research*, 39(1), 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00223.x>
- Luccini, E., Musante, V., Neri, E., Raiteiri, M., & Pittaluga, A. (2007). N-Methyl-D-Aspartate Autoreceptors Respond to Low and High Agonist Concentrations by Facilitating, Respectively, Exocytosis and Carrier-Mediated Release of Glutamate in Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 3253(April), 3244–3253. <https://doi.org/10.1002/jnr>
- M'Bailara, K., Henry, C., Lestage, J., Launay, J. M., Parrot, F., Swendsen, J., Sutter, A. L., Roux, D., Dallay, D., & Demotes-Mainard, J. (2006). Decreased brain tryptophan availability as a partial determinant of post-partum blues. *Psychoneuroendocrinology*, 31(3), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.10.001>
- Ma, D., Panda, S., & Lin, J. D. (2011). Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C / EBP b. *The EMBO Journal*, 30(22), 4642–4651. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.322>
- Maes, M., Mihaylova, I., Ruyter, M. De, Kubera, M., & Bosmans, E. (2007). The immune effects of TRYCATs ( tryptophan catabolites along the ido pathway ): Relevance for depression – and other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation. *Neuroendocrinology Letters*, 28(6), 826–831.
- Maronde, E., Pfeffer, M., Olcese, J., Molina, C. A., Schlotter, F., Dehghani, F., Korf, H. W., & Stehle, J. H. (1999). Transcription factors in neuroendocrine regulation: Rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *Journal of Neuroscience*, 19(9), 3326–3336. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03326.1999>
- Marpegán, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A., & Golombek, D. A. (2005). Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 160(1–2), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.11.003>
- Martins, E., Ferreira, A. C. F., Skorupa, A. L., Afeche, S. C., Cipolla-Neto, J., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(6), 1116–1121. <https://doi.org/10.1189/jlb.1203614>
- Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., & Krause, D. N. (2002). MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1295–1302. <https://doi.org/10.1124/jpet.302.3.1295>
- McLeod, S. D., & Cairncross, K. D. (1995). Preliminary Evidence of a Synergistic  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-Adrenoceptor Regulation of Rat Pineal Hydroxyindole-O-methyltransferase. *General and Comparative Endocrinology*, 97(3), 283–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1028>
- Medzhitov, R., Preston-hurlburt, P., & Jr, C. A. J. (1997). letters to nature A human

- homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(July), 6–9.
- Meyer, T., & Brinck, U. (1999). Differential distribution of serotonin and tryptophan hydroxylase in the human gastrointestinal tract. *Digestion*, 60(1), 63–68. <https://doi.org/10.1159/000007590>
- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., & William, J. (2011). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 185(6), 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>
- Miranda, A. F., Boegman, R. J., Beninger, R. J., & Jhamandas, K. (1997). PROTECTION AGAINST QUINOLINIC ACID-MEDIATED EXCITOTOXICITY IN NIGROSTRIATAL DOPAMINERGIC NEURONS BY ENDOGENOUS KYNURENIC ACID. *Neuroscience*, 78(4), 967–975.
- Mizutani, K. I., Sugimoto, K., Okuda, T., Katsuya, T., Miyata, T., Tanabe, T., Higaki, J., Ogihara, T., Yamori, Y., Tsujita, Y., Tago, N., & Iwai, N. (2002). Kynureninase is a novel candidate gene for hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25(1), 135–140. <https://doi.org/10.1291/hypres.25.135>
- Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., & Bendová, Z. (2018). The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLoS One*, 13(9), 1–16. <https://doi.org/10.1101/342568>
- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., & Carlà, V. (1988). Presence of Kynurenic Acid in the Mammalian Brain. *Journal of Neurochemistry*, 51(1), 177–180. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb04852.x>
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *Journal of Experimental Medicine*, 189(9), 1363–1372. <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1363>
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., & Mellor, A. L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281(5380), 1191–1193. <https://doi.org/10.1126/science.281.5380.1191>
- Niinistö, P., Oksala, N., Levula, M., Pelto-Huikko, M., Järvinen, O., Salenius, J. P., Kytömäki, L., Soini, J. T., Kähönen, M., Laaksonen, R., Hurme, M., & Lehtimäki, T. (2010). Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase-induced tryptophan degradation in advanced atherosclerotic plaques: Tampere Vascular Study. *Annals of Medicine*, 42(1), 55–63. <https://doi.org/10.3109/07853890903321559>
- Nishino, H., Koizumi, K., & Brooks, C. M. C. (1976). The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Research*, 112(1), 45–59. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90333-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90333-4)
- O'Callaghan, J. P., Kelly, K. A., VanGilder, R. L., Sofroniew, M. V., & Miller, D. B. (2014). Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS ONE*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102003>

- Ohdo, S., Koyanagi, S., Suyama, H., Higuchi, S., & Aramaki, H. (2001). Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nature Medicine*, 7(3), 356–360. <https://doi.org/10.1038/85507>
- Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., & Katsuki, H. (1996). Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Neurobiology*, 93(22), 12553–12558.
- Omenetti, A., Yang, L., Gainetdinov, R. R., Guy, C. D., Choi, S. S., Chen, W., Caron, M. G., Diehl, A. M., Mg, C., & Am, D. (2011). Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(2), G303–G315. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00368.2010>.
- 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(3), 307–320. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00722-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00722-5)
- Pawlak, D., Pawlak, K., Malyszko, J., Mysliwiec, M., & Buczko, W. (2002). Accumulation of toxic products degradation of kynurenine in hemodialyzed patients. *International Urology and Nephrology*, 33(2), 399–404.
- Pawlak, D., Tankiewicz, A., & Buczko, W. (2001). KYNURENINE AND ITS METABOLITES IN THE RAT WITH EXPERIMENTAL RENAL DEFICIENCY. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(4), 755–766.
- Peirson, S. N., Butler, J. N., Duffield, G. E., Takher, S., Sharma, P., & Foster, R. G. (2006). Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(4), 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.118>
- Polyzos, K. A., Ovchinnikova, O., Berg, M., Baumgartner, R., Agardh, H., Pirault, J., Gisterå, A., Assinger, A., Laguna-Fernandez, A., Bäck, M., Hansson, G. K., & Ketelhuth, D. F. J. (2015). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes vascular inflammation and increases atherosclerosis in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovascular Research*, 106(2), 295–302. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv100>
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Rapoport, M. I., & Beisel, W. R. (1968). Circadian periodicity of tryptophan metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(4), 934–939. <https://doi.org/10.1172/JCI105785>
- Rapoport, M. I., D., F. R., Bruton, J., & Beisel, W. R. (1966). Circadian Rhythm for Tryptophan Pyrrolase Activity and Its Circulating Substrate. *Science*, 153(3744), 1642–1644.
- Renzi, A., DeMorrow, S., Onori, P., Carpino, G., Mancinelli, R., Meng, F., Venter, J., White, M., Franchitto, A., Francis, H., Han, Y., Ueno, Y., Dusio, G., Jensen, K. J., Greene, J. J., Glaser, S., Gaudio, E., & Alpini, G. (2013). Modulation of the biliary expression of

- arylalkylamine N- acetyltransferase alters the autocrine proliferative responses of cholangiocytes. *Hepatology*, 57(3), 1130–1141. <https://doi.org/10.1002/hep.26105>.Modulation
- Ressmeyer, A., Mayo, J. C., Zelosko, V., Sáinz, R. M., Tan, D., Poeggeler, B., Antolín, I., Zsizsik, B. K., Russel, J., Hardeland, R., Mayo, J. C., Zelosko, V., & Rosa, M. (2013). Communications in Free Radical Research Antioxidant properties of the melatonin metabolite N -acetyl-5-methoxykynuramine ( AMK ): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction Antioxidant properties of the melatonin metabolite N -acety. *Communications in Free Radical Research*, 8(5), 205–213. <https://doi.org/10.1179/135100003225002709>
- Roseboom, P. H., Coon, S. L., Baler, R., McCune, S., Weller, J. L., & Klein, D. C. (1996). Melatonin Synthesis: Analysis of the More Than 150-Fold Nocturnal Increase in Serotonin N-Acetyltransferase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Pineal Gland. *Endocrinology*, 137(7), 3033–3045.
- Ruff-Jamison, S., Zhong, Z., Wen, Z., Chen, K., Darnell, J. E., & Cohen, S. (1994). Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate Stat3 transcription factor in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), 21933–21935. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31735-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31735-0)
- Rummel, C., Inoue, W., Sachot, C., Poole, S., Hübschle, T., & Luheshi, G. N. (2008). Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 511(3), 373–395. <https://doi.org/10.1002/cne.21850>
- Sangoram, A. M., Saez, L., Antoch, M. P., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley, A., Fruechte, E. M., Vitaterna, M. H., Shimomura, K., King, D. P., Young, M. W., Weitz, C. J., & Takahashi, J. S. (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: A timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron*, 21(5), 1101–1113. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80627-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80627-3)
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
- Savitz, J. (2020). The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Molecular Psychiatry*, 25(1), 131–147. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0414-4>
- Schefold, C., Zeden, J., Fotopoulou, C., Haehling, S. Von, Pschowski, R., Hasper, D., Volk, H., Schuett, C., & Reinke, P. (2009). Increased indoleamine 2 , 3-dioxygenase ( IDO ) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease : a possible link between chronic inflammation and uraemic. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(6), 1046–1051. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn739>
- Shibata, N., Yamamoto, T., Hiroi, A., Omi, Y., Kato, Y., & Kobayashi, M. (2010). Activation of STAT3 and inhibitory effects of pioglitazone on STAT3 activity in a mouse model of SOD1-mutated amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 30(4), 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01078.x>
- Shibuya, H., Toru, M., & Watanabe, S. (1977). A circadian rhythm of tryptophan

- hydroxylase in rat pineals. *Brain Research*, 138(2), 364–368. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90754-5)
- Singh, A. K., & Jiang, Y. (2004). How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology*, 201(1–3), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.04.015>
- Song, Z., Humar, B., Gupta, A., & Maurizio, E. (2018). Exogenous melatonin protects small-for-size liver grafts by promoting monocyte infiltration and releases interleukin-6. *Journal of Pineal Research*, 61(1), 0–3. <https://doi.org/10.1111/jpi.12486>
- Stefulj, J., Hörtnner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., Semmler, J., & Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Journal of Pineal Research*, 30(4), 243–247. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.300408.x>
- Stehle, J. H., Stehle, J. H., Foulkes, N. S., Molina, C. A., Simonneaux, V., Pévet, P., Sassone-Corsi, P., Foulkes, N. S., Molina, C. A., Simonneaux, V., Pévet, P., & Sassone-Corsi, P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365(6444), 314–320. <http://www.nature.com/doi/10.1038/365314a0>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>
- Strada, S. J., Klein, D. C., Weller, J., & Weiss, B. (1972). Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology*, 90(6), 1470–1475. <https://doi.org/10.1210/endo-90-6-1470>
- Sugden, D. (2003). Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using. *Journal of Neurochemistry*, 86(5), 1308–1311. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01959.x>
- Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F. G., Jia, J., Khattar, N. K., Li, J., Baranov, S. V., Leronni, D., Mihalik, A. C., He, Y., Cecon, E., Wehbi, V. L., Kim, J. H., Heath, B. E., Baranova, O. V., Wang, X., Gable, M. J., Kretz, E. S., Di Benedetto, G., ... Friedlander, R. M. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), E7997–E8006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705768114>
- Suzuki, Y., Suda, T., Asada, K., Miwa, S., Suzuki, M., Fujie, M., Furuhashi, K., Nakamura, Y., Inui, N., Shirai, T., Hayakawa, H., Nakamura, H., & Chida, K. (2012). Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(3), 436–442. <https://doi.org/10.1128/CVI.05402-11>
- Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., & Truscott, R. J. W. (1999). *Interferon-Gamma-Dependent/Independent Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase*. 553–557. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4709-9\\_68](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4709-9_68)

- Tan, D., Manchester, L. C., Burkhardt, S., Sainz, R. M., & Juan, C. (2001). N 1 -acetyl- N 2 -formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(12), 1–16.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1998). The clock in the mouse retina: Melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Research*, *789*(2), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01446-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01446-7)
- Udoh, U. S., Valcin, J. A., Gamble, K. L., & Bailey, S. M. (2015). The molecular circadian clock and alcohol-induced liver injury. In *Biomolecules* (Vol. 5, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/biom5042504>
- Valdés-Fuentes, M., Vera-rivera, G., Ita-Pérez, D. De, Mendéz, I., Miranda, M. I., & Diaz-Munos, M. (2015). Effect of daytime-restricted feeding in the daily variations of liver metabolism and blood transport of serotonin in rat. *Physiological Reports*, *3*, 1–13. <https://doi.org/10.14814/phy2.12389>
- Van Der Helm-Van Mil, A. H. M., Van Someren, E. J. W., Van Den Boom, R., Van Buchem, M. A., De Craen, A. J. M., & Blauw, G. J. (2003). No Influence of Melatonin on Cerebral Blood Flow in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *88*(12), 5989–5994. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031107>
- Wada, M., Okamura, H., Nagata, K., Shimoyama, T., & Kawade, Y. (1985). Cellular Mechanisms in In Vivo Production of Gamma Interferon Induced by Lipopolysaccharide in Mice Infected with Mycobacterium bovis BCG. *Journal of Interferon Research*, *5*(3), 431–443.
- Walker, A. K., Budac, D. P., Bisulco, S., Lee, A. W., Smith, R. A., Beenders, B., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2013). NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology*, *38*(9), 1609–1616. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.71>
- Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, *299*(5603), 78.
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., & Ling, L. (2006). Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22021–22028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>
- Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P. K., Stasch, J. P., Hahn, M., Changsirivathanathamrong, D., Wu, B. J., Ball, H. J., Thomas, S. R., Kapoor, V., Celermajer, D. S., Mellor, A. L., Keaney, J. F., Hunt, N. H., & Stocker, R. (2010). Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nature Medicine*, *16*(3), 279–285. <https://doi.org/10.1038/nm.2092>
- Wirhgen, E., Tuchscherer, M., Otten, W., Domanska, G., Wollenhaupt, K., & Tuchscherer, A. (2013). Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase by LPS in a porcine model. *Innate Immunity*, *20*(1), 30–39. <https://doi.org/10.1177/1753425913481252>
- Wu, Y. H., Zhou, J. N., Van Heerikhuize, J., Jockers, R., & Swaab, D. F. (2007). Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and

- Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28(8), 1239–1247. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.002>
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Phillips, L. S. (1963). also be due to the rate of binding of Melatonin Synthesis in the Pineal Gland : Control by Light. *Sci Signal*, 142(November), 1071–1073.
- Xiao, Y., Christou, H., Liu, L., Visner, G., Mitsialis, S. A., Kourembanas, S., & Liu, H. (2013). Endothelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase Protects Against Development of Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(4), 1–60.
- Yamamoto, T., Azechi, H., & Board, M. (2012). Essential Role of Excessive Tryptophan and its Neurometabolites in Fatigue. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 39(1), 40–47.
- Yamamura, Y., Yano, I., Kudo, T., & Shibata, S. (2010). Time-dependent inhibitory effect of lipopolysaccharide injection on per1 and per2 gene expression in the mouse heart and liver. *Chronobiology International*, 27(2), 213–232.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R. I., 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. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yang, F., Zhou, L., Song, J., Wangjinmei, A., Yang, Y., Tang, Z., & Leon, J. (2019). Liver CEBP  $\beta$  Modulates the Kynurenine Metabolism and Mediates the Motility for Hypoxia-Induced Central Fatigue in Mice. *Frontiers in Physiology*, 10(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00243>
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yu, G., Dai, H., Chen, J., Duan, L., Gong, M., Liu, L., Xiong, P., Wang, C.-Y., Fang, M., & Gong, F. (2008). Gene delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase prolongs cardiac allograft survival by shaping the types of T-cell responses. *Journal of Gene Medicine*, 10(7), 754–761. <https://doi.org/10.1002/jgm>
- Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain synthesis. *Science*, 305(5681), 217. <https://doi.org/10.1126/science.1097540>