

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kristýna Ľalíková**

Cirkadiánní systém v astrocytech

Circadian system in astrocytes

Bakalářská práce

Školitelka: Doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2021

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D., za cenné rady, příjemnou spolupráci, velkou ochotu a také za všechnen čas, který mi během psaní této bakalářské práce věnovala.

**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, 6. 5. 2021

Podpis: .....

## **Abstrakt**

Cirkadiánní systém ovlivňuje téměř všechny buňky v těle savců. Mezi tyto buňky patří i astrocyty, které spolu s mikroglíemi a oligodendrocyty představují hlavní typy gliových buněk nacházejících se v mozku. První kapitola této práce představuje shrnutí charakteristik cirkadiánního systému a zaměřuje se především na molekulární podstatu jeho fungování. Druhá kapitola je věnována astrocytům, astrocytární vápníkové signalizaci a procesu gliotransmise. Třetí a poslední kapitola obě výše uvedená témata spojuje a pojednává o cirkadiánním systému v astrocytech. Uvádí důkazy existence astrocytárních cirkadiánních oscilací a fyziologické důsledky jejich působení. Velká pozornost je věnována cirkadiánním rytmům v gliotransmisi, a to se zaměřením na gliotransmitery ATP a glutamát. Jako nejpůsobivější výstup cirkadiánního systému v astrocytech je uvedena účast na udržování rytmické aktivity hlavního cirkadiánního oscilátoru lokalizovaného v suprachiasmatickém jádře hypothalamu.

Klíčová slova:

cirkadiánní systém, hodinové geny, astrocyty, gliotransmise, vápníková signalizace, glutamát, ATP

## **Abstract**

The circadian system affects almost all cells in the mammalian body. These cells include astrocytes, which together with microglia and oligodendrocytes represent the main types of glial cells found in the brain. The first chapter of this thesis presents a summary of circadian system characteristics and focuses mainly on the molecular mechanism underlying its functioning. The second chapter is devoted to astrocytes, astrocyte calcium signaling, and the process of gliotransmission. The third and last chapter connects both topics and discusses the circadian system in astrocytes. It presents evidence of astrocytic circadian oscillations existence and physiological consequences of its action. Great attention is paid to circadian rhythms in gliotransmission, with a focus on gliotransmitters ATP and glutamate. As the most impressive output of the circadian system of astrocytes is presented the participation in maintaining the rhythmic activity of the main circadian oscillator located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus.

Key words:

circadian system, clock genes, astrocytes, gliotransmission, calcium signaling, glutamate, ATP

## Seznam použitých zkratek

ADP	–	adenosine diphosphate
AMP	–	adenosine monophosphate
AMPA	–	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	–	adenosine triphosphate
AVP	–	arginine vasopressin
BAPTA	–	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
bHLH	–	basic helix–loop–helix
BMAL1	–	brain and muscle ARNT-like protein-1
CCGs	–	clock-controlled genes
CK1	–	casein kinase 1
CLOCK	–	circadian locomotor output cycles kaput
CNS	–	central nervous system
CREB	–	cAMP response element-binding protein
CRY	–	cryptochrome
DAG	–	diacylglycerol
DBP	–	D-box binding protein
DD	–	dark-dark (constant darkness conditions)
DNA	–	deoxyribonucleic acid
EAAT	–	excitatory amino acid transporter
ER	–	endoplasmatic reticulum
E4BP4	–	adenovirus E4 promoter binfing protein 4
FBXL	–	F-box and leucine-rich repeat protein
GABA	–	gamma aminobutyric acid
GFAP	–	glial fibrillary acidic protein
GFP	–	green fluorescent protein
GLAST	–	glutamate aspartate transporter
GLT1	–	glutamate transporter 1
Glu	–	glutamate
GRP	–	gastrin-releasing peptide
GS	–	glutamine synthetase
ICW	–	intercellular calcium waves
ipRGCs	–	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
IP <sub>3</sub>	–	inositol-1,4,5-triphosphate
IP <sub>3</sub> R	–	inositol-1,4,5-triphosphate receptor

LD	–	light-dark
Luc	–	luciferase
miRNA	–	micro RNA
mRNA	–	messenger RNA
MSO	–	methionine sulfoximine
NCX	–	sodium/calcium exchanger
NFIL3	–	nuclear factor interleukin 3-regulated
NLCX	–	sodium/lithium/calcium exchanger
NMDA	–	N-methyl-D-aspartate
NPAS2	–	neuronal PAS domain protein 2
Nr1d1	–	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
Nr1d2	–	nuclear receptor subfamily 1 group D member 2
PACAP	–	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PER	–	period
PLC	–	phospholipase C
RNA	–	ribonucleic acid
ROR	–	retinoic acid-related orphan receptor
ROREs	–	retinoic acid-related orphan receptor response elements
RTH	–	retinohypothalamic tract
SCN	–	suprachiasmatic nucleus
SERCA	–	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SNAP-23	–	synaptosomal-associated protein of 23 kDa
SNARE	–	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SOCE	–	store-operated calcium entry
SOCs	–	store-operated calcium channels
TNF $\alpha$	–	tumor necrosis factor $\alpha$
TRP	–	transient receptor potential
VGLUTs	–	vesicular glutamate transporters
VIP	–	vasoactive intestinal polypeptide
VNUT	–	vesicular nucleotide transporter
WT	–	wild type

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cirkadiánní systém.....</b>	<b>2</b>
2.1	Molekulární mechanismus fungování cirkadiánního systému .....	3
2.1.1	Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky.....	3
2.1.2	Role post-transkripčních & post-translačních modifikací.....	5
2.2	Suprachiasmatické jádro jako hlavní oscilátor cirkadiánního systému .....	6
<b>3</b>	<b>Astrocyty .....</b>	<b>9</b>
3.1	Funkce astrocytů .....	9
3.1.1	Tripartitní synapse.....	10
3.2	Vápníková signalizace v astrocytech .....	11
3.2.1	Mechanismy vápníkové signalizace v astrocytech .....	11
3.2.2	Vápníkové vlny .....	12
3.3	Gliotransmise.....	13
3.3.1	Glutamát jako gliotransmitter .....	13
3.3.2	ATP jako gliotransmitter .....	14
3.3.3	Důsledky astrocytární gliotransmise .....	15
<b>4</b>	<b>Cirkadiánní systém v astrocytech.....</b>	<b>16</b>
4.1	Důkazy cirkadiánních rytmů v astrocytech.....	16
4.2	Cirkadiánní rytmy spojené s gliotransmisí.....	16
4.2.1	Rytmy v uvolňování ATP .....	16
4.2.2	Rytmy v absorpci a uvolňování glutamátu .....	17
4.3	Intracelulární faktory ovlivňující rytmicitu v astrocytech.....	20
4.4	Význam cirkadiánních hodin astrocytů .....	21
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>24</b>

# 1 Úvod

Cirkadiánní systém umožňuje organismům synchronizovat buněčné, fyziologické i behaviorální procesy s cyklickými změnami ve vnějším prostředí. Působení cirkadiánního systému je zajištěno cirkadiánními hodinami, jež se u savců skládají z hlavního oscilátoru, který je lokalizován v suprachiasmatickém jádře hypothalamu, a periferních oscilátorů, které lze najít v orgánech a tkáních celého těla. Molekulární podstatu cirkadiánního systému tvoří hodinové geny a jejich vzájemné transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky, které v buňkách generují rytmy s přibližně 24-hodinovou periodou. Tímto molekulárním mechanismem disponují téměř všechny buněčné typy včetně astrocytů.

Astrocyty patří mezi gliové buňky mozku. Díky vysoké míře heterogenity, kterou vykazují ve své morfologii i fyziologii, vykonávají řadu různých funkcí. Mezi tyto funkce se řadí i regulace synaptické transmise a neuronální aktivity procesem zvaným gliotransmise.

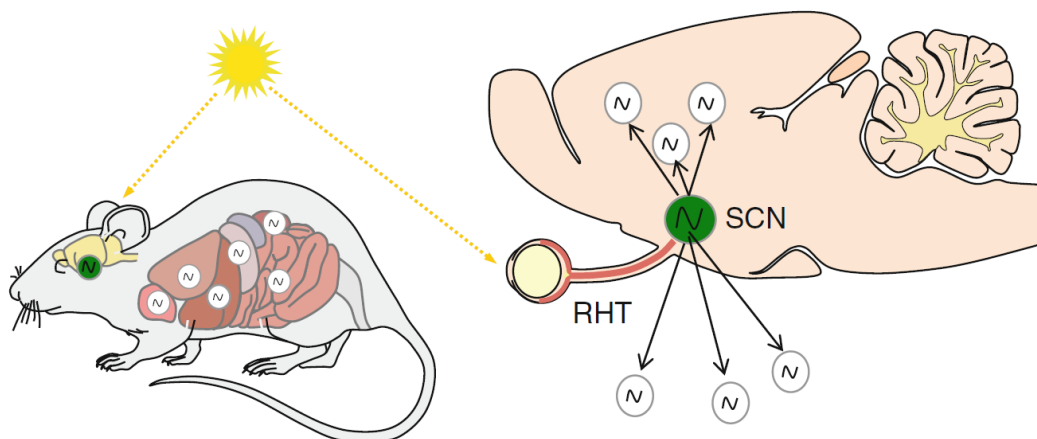
Cílem této práce je popsat cirkadiánní systém v astrocytech. Prostor bude věnován důkazům cirkadiánní podstaty astrocytárních buněk a rytmickým fyziologickým procesům, které z ní plynou. Dále bude pojednáváno o výstupech astrocytárních rytmů a jejich důležitosti v rámci fungování organismu. Pozornost bych chtěla zaměřit především na charakter gliotransmise a komunikace mezi astrocyty a neurony. Do popředí zájmu budou umístěny zejména astrocyty suprachiasmatického jádra, a to kvůli výsadnímu postavení, které tato mozková oblast v rámci cirkadiánního systému zaujímá.

## 2 Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém představuje evoluční adaptaci organismů na cyklické změny environmentálních faktorů, které nastávají v důsledku rotace Země kolem zemské osy. Z pohledu taxonomie je tento systém vyvinutý napříč říšemi a nacházíme jej u bakterií, hub, rostlin i živočichů (Harmer *et al.*, 2001). Jeho definujícími charakteristikami jsou (i) vnitřní rytmicita, která přetrvává i ve stálých podmínkách bez cyklických stimulů z vnějšího prostředí (Li *et al.*, 2020); (ii) schopnost synchronizace podle vnějších podmínek (Czeisler *et al.*, 1981); a (iii) teplotní kompenzace, díky které se rychlost vnitřních rytmů nezvyšuje s rostoucí teplotou (Tsuchiya *et al.*, 2003).

Obecné fungování cirkadiánního systému je založeno na třech základních prvcích. Vstupní prvek, jehož příkladem mohou být světelné stimuly, zajišťuje synchronizaci hlavního cirkadiánního oscilátoru s měnícími se faktory vnějšího prostředí (zejména s cyklem světla a tmy). Druhým prvkem je samotný hlavní oscilátor, který generuje cirkadiánní rytmy dlouhé přibližně 24 hodin. Poslední výstupní prvek, který je reprezentován řadou výstupních drah hlavního oscilátoru, umožňuje využít časovou informaci k regulaci cirkadiánních rytmů v rámci celého těla (Lowrey & Takahashi, 2004).

U savců má cirkadiánní systém hierarchické uspořádání a výsadní pozici hlavního oscilátoru v něm zaujímá suprachiasmatické jádro (Obr. 1). Jedná se o hypothalamickou mozkovou oblast udržující a synchronizující rytmy v periferních oscilátorech, které se nachází v orgánech a tkáních napříč celým organismem (Yamazaki *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004). Téměř každá buňka totiž disponuje rytmickou podstatou, kterou představují hodinové geny a jimi řízené zpětnovazebné smyčky (viz dále).



**Obr. 1: Hierarchické uspořádání cirkadiánního systému u savců.** Cirkadiánní systém savců je složen z centrálního generátoru cirkadiánních rytmů a jemu podřízených periferních oscilátorů. Centrální generátor, jinak zvaný též hlavní cirkadiánní oscilátor, se nachází v mozku a přijímá světelné signály z vnějšího prostředí. Periferní oscilátory jsou lokalizovány v periférii a můžeme je najít téměř ve všech buňkách těla. (Převzato a upraveno dle Korf & von Gall, 2016)



## 2.1 Molekulární mechanismus fungování cirkadiálního systému

Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin je založen na existenci tzv. transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček hodinových genů a jejich proteinů (Obr. 2). Mezi základní hodinové geny, které se u savců podílí na molekulárních zpětnovazebných smyčkách, patří geny *Bmal1* (brain and muscle ARNT-like protein-1), *Per* (period), *Cry* (cryptochrome) a *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput) nebo jeho paralog *Npas2* (neuronal PAS domain protein 2) (Landgraf *et al.*, 2016). Proteinové produkty těchto genů fungují jako transkripční faktory a obsahují DNA-vazebné motivy, které jim umožňují vazbu na tři hlavní DNA regulační elementy v promotorech či enhancerech hodinových a hodinami řízených genů: E-box, D-box a RORE (Ueda *et al.*, 2005). Interakce transkripčních faktorů s těmito elementy může pozitivně či negativně regulovat expresi daných genů, čímž dochází ke generování cirkadiálních rytů.

Ačkoliv jsou hodinami řízené geny (CCGs z angl. clock-controlled genes) regulovány molekulárními pochody hodinového systému, samy se do něj nezapojují. Namísto toho představují výstup cirkadiálního systému a regulují metabolické či jiné fyziologické procesy v organismu. Mezi CCGs patří široká škála genů včetně genů asociovaných se signalizací, buněčným pohybovým aparátem, proteinovým obratem, různými biochemickými drahami či buněčným cyklem (Duffield *et al.*, 2002; Grundschober *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2002).

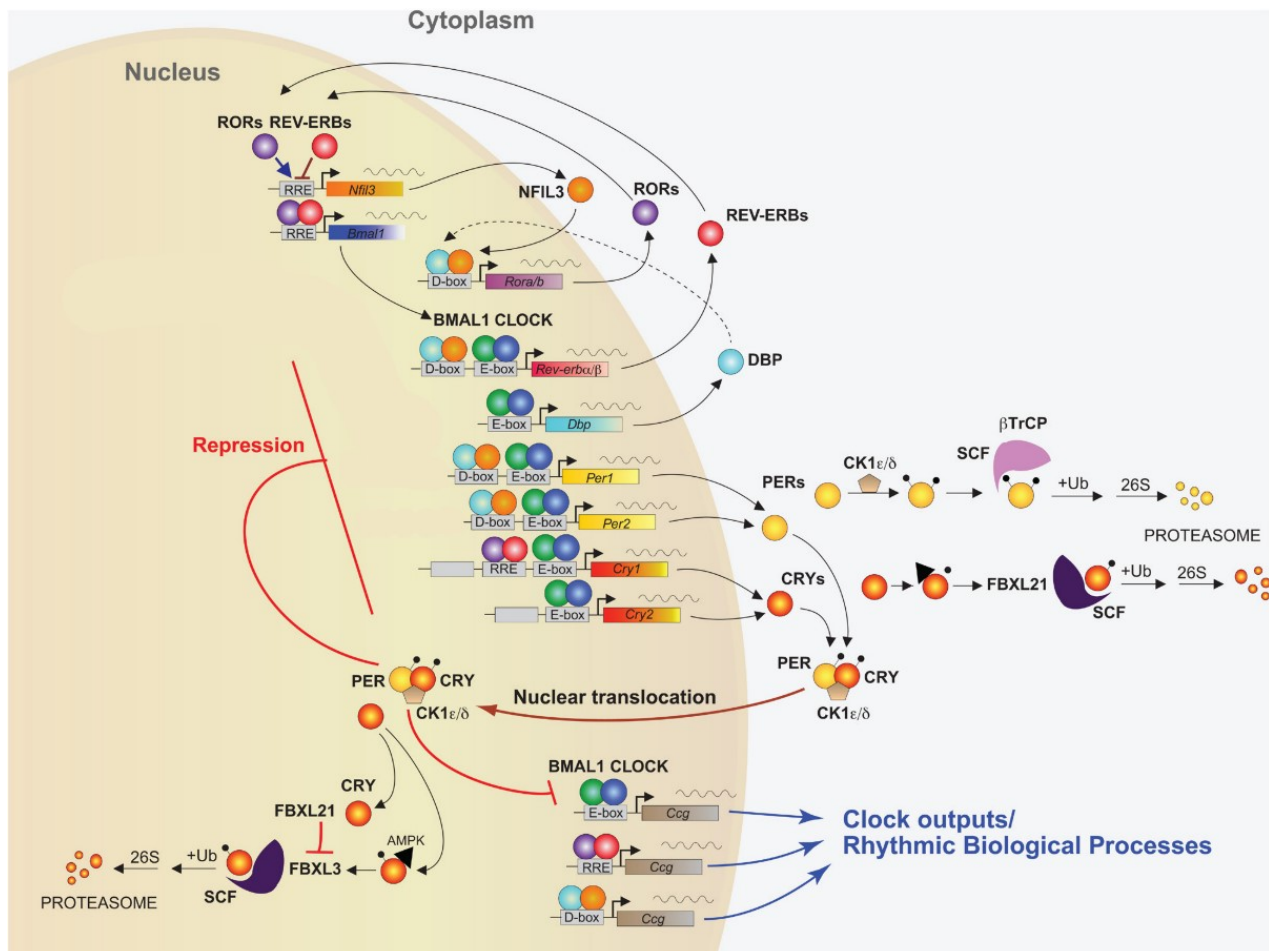
### 2.1.1 Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky

Základ první zpětnovazebné smyčky tvoří transkripční faktory CLOCK a BMAL1. Jedná se o transkripční aktivátory obsahující DNA-vazebné motivy bHLH (basic helix-loop-helix) a PAS domény, které zajišťují proteinové interakce (Huang *et al.*, 2012). CLOCK a BMAL1 společně tvoří heterodimerní komplex CLOCK/BMAL1, který se váže na E-box regulačních elementů hodinových genů *Per* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) a *Cry* (*Cry1*, *Cry2*) a spouští jejich transkripci (Gekakis *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999). Vzniklé represorové proteiny PER a CRY spolu interagují a poté se přemísťují do jádra, kde vazbou na CLOCK/BMAL1 komplex potlačují svou vlastní genovou expresi (Rosensweig *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 2006). Následuje pokles hladin proteinů PER a CRY v důsledku této negativní zpětné vazby a činnosti regulačních enzymů, mezi které patří kasein kinázy 1 (CK1) (Akashi *et al.*, 2002) nebo E3 ubiquitin ligázy FBXL3 a FBXL21 (F-box and leucine-rich repeat protein 3/21) (Yoo *et al.*, 2013) podílející se na degradaci daných proteinů v proteasomech. Díky snížené hladině represorových proteinů v jádře dojde k obnovení působení CLOCK/BMAL1 komplexu, čímž začíná nový cyklus transkripce genů *Per* a *Cry*. Celý cyklus této zpětnovazebné smyčky trvá přibližně 24 hodin.

Komplex CLOCK/BMAL1 figuruje i ve druhé zpětnovazebné smyčce, v rámci které aktivuje expresi genů *Nr1d1* a *Nr1d2* (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1/2) kódujících jaderné receptory

REV-ERB $\alpha$  a REV-ERB $\beta$ . Tyto receptory kompetují s ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  a ROR $\gamma$  (retinoic acid-related orphan receptors) o vazbu na ROR-vazebné elementy (ROREs) v promotoru genu *Bmal1*. Výsledkem kompetice je buď inhibice *Bmal1* transkripce v případě vazby REV-ERB nebo aktivace genové exprese *Bmal1* zprostředkovaná vazbou ROR (Guillaumond *et al.*, 2005; Preitner *et al.*, 2002).

Třetí zpětnovazebná smyčka je založena na působení transkripčních faktorů DBP (D-box binding protein) a NFIL3 (nuclear factor interleukin 3-regulated) známého též jako E4BP4 (adenovirus E4 promoter binding protein 4). Exprese DBP je regulována komplexem CLOCK/BMAL1 (Ripperger & Schibler, 2006) a cirkadiální oscilace proteinových hladin DBP jsou téměř antifázické k oscilacím hladin NFIL3 (Mitsui *et al.*, 2001). Oba faktory se váží na stejné vazebné místo – D-box v regulační oblasti hodinových genů – přičemž DBP aktivuje transkripci cílových genů a NFIL3 ji naopak potlačuje (Yamajuku *et al.*, 2011). Mezi hodinové geny, které obsahují D-box a jsou ovlivňovány touto smyčkou, patří *Per* geny a geny pro ROR a REV-ERB receptory (Ueda *et al.*, 2005).



**Obr. 2: Základní komponenty molekulárních cirkadiálních hodin savců.** V nákresu jsou vyobrazeny tři transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky. První smyčku reprezentují transkripční aktivátory CLOCK & BMAL1 a transkripční represory PER & CRY, které interakcí s CLOCK/BMAL1 komplexem potlačují svou vlastní transkripci. Druhá smyčka zahrnuje CLOCK/BMAL1-zprostředkovanou aktivaci

exprese jaderných receptorů REV-ERB, jež kompetují s ROR receptory a regulují transkripci *Bmal1*. Ve třetí smyčce působí proteiny DBP (regulované CLOCK/BMAL1) a NFIL3 (regulované ROR/REV-ERB), které se váží na D-box v promotorech mnoha hodinových genů a poskytují další úroveň regulace jejich exprese. CLOCK/BMAL1, ROR/REV-ERB a DBP/NFIL3 navíc ovlivňují transkripci velkého množství hodinami řízených genů. (Převzato a upraveno dle Cox & Takahashi, 2019)

Tyto transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky tvoří základ molekulární podstaty cirkadiálního systému. Na ustanovení a udržování buněčných hodin generujících cirkadiální rytmy se však podílí i další molekulární pochody, a to zejména post-transkripční a post-translační regulační mechanismy.

### 2.1.2 Role post-transkripčních & post-translačních modifikací

Cirkadiální regulace *de novo* transkripce je vysvětlení pro pouhých ~22 % z celkového počtu rytmicky oscilujících mRNA transkriptů, což značí významnou roli post-transkripční regulace v molekulárních hodinách (Koike *et al.*, 2012). Post-transkripční mechanismy ovlivňující cirkadiální rytmy zahrnují regulaci splicingu (McGlincy *et al.*, 2012), polyadenylace (Kojima *et al.*, 2012) nebo působení microRNA (miRNA).

miRNA je přibližně 21 nukleotidů dlouhá jednovláčková RNA molekula, která je svou sekvencí částečně komplementární k molekule cílového mRNA transkriptu. S tímto transkriptem díky komplementaritě interaguje a inhibuje tím jeho translaci nebo zprostředkuje mRNA degradaci (Filipowicz *et al.*, 2008). Příkladem miRNA ovlivňujících cirkadiální systém jsou mozkově specifické miR-219 a miR-132, jejichž hladiny vykazují v suprachiasmatickém jádře cirkadiální oscilace. miR-219 je díky E-boxu v promotorové oblasti řízena CLOCK/BMAL1 komplexem a funguje jako regulátor délky cirkadiální periody. miR-132, jejíž aktivace je indukovaná světelnými stimuly, reguluje expresi hodinového genu *Per*. Mezi předpokládané funkce miR-132 patří negativní modulace světelné synchronizace, tedy světlem indukovaného fázového posunu hodin, což může sloužit jako zpětnovazebná regulace citlivosti cirkadiálního systému na světelnou stimulaci (Cheng *et al.*, 2007).

Výzkum post-translačních modifikací, které v cirkadiálním systému rovněž hrají důležitou roli, započal po objasnění molekulární podstaty *tau* mutace. *Tau* mutace byla objevena u křečků syrských, u kterých způsobovala zkrácení periody cirkadiálních rytmů v lokomoci z obvyklých 24 h na 22 h nebo 20 h v závislosti na tom, zda se jednalo o zvíře heterozygotní či homozygotní pro danou mutaci (Ralph & Menaker, 1988). Ukázalo se, že příčinou tohoto fenotypu je mutace v genu pro kasein kinázu CK1 $\epsilon$ , v jejímž důsledku enzym ztrácí schopnost účinně fosforylovat PER proteiny (Lowrey *et al.*, 2000). Dále bylo prokázáno, že CK1 $\epsilon$  a jí zprostředkovaná fosforylace ovlivňuje buněčnou lokalizaci PER, jeho schopnost blokovat CLOCK/BMAL1 komplex a také jeho proteasomální degradaci (Eide *et al.*, 2005; Vielhaber *et al.*, 2000). Tyto výsledky značí, že enzymy CK1 tvoří nezbytnou součást savčích hodin,

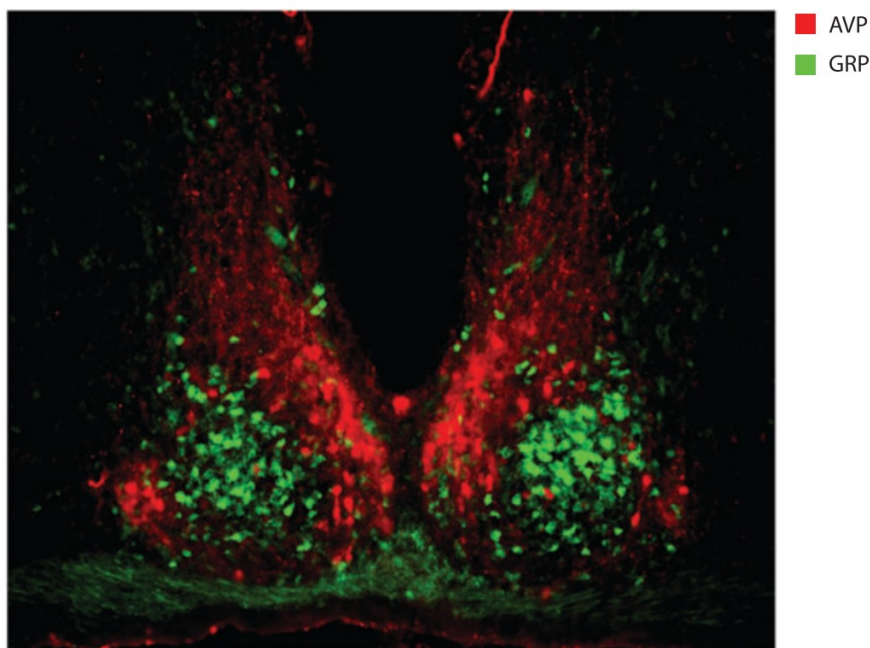
kteřá se fosforylací represorového proteinu PER podílí na regulaci délky cirkadiánní periody. Různé druhy kináz byly od té doby identifikovány jako regulátory cirkadiánních hodin (Kon *et al.*, 2015) a u mnoha hodinových proteinů včetně CLOCK, BMAL1, CRY1, CRY2, PER1 a PER2 byla prokázána modifikace fosforylací (Brenna & Albrecht, 2020).

Mezi další post-translační modifikace hodinových proteinů patří sumoylace (Cardone *et al.*, 2005), acetylace (Hirayama *et al.*, 2007), ADP-ribosylace (Asher *et al.*, 2010) nebo ubiquitinace. Ubiquitin, 76 aminokyselin dlouhý polypeptid, se kovalentně váže na lysinové zbytky cílových proteinů, na kterých může tvořit polyubiquitinové řetězce. V závislosti na pozici ubiquitinovaného lysinu a délce řetězce plní tato post-translační modifikace různé funkce včetně regulace aktivity a stability cílového proteinu, ovlivnění jeho subcelulární lokalizace, regulace meziproteinových interakcí nebo zprostředkování degradace proteinu v proteasomu (Mukhopadhyay & Riezman, 2007). Ubiquitinace spojené s cirkadiánním systémem se účastní dva již zmiňované enzymy – E3 ubiquitin ligázy FBXL3 a FBXL21. FBXL3 je lokalizována exkluzivně v jádře, kde se účastní ubiquitinace a následné degradace hodinového proteinu CRY. FBXL21 ubiquitínuje CRY v cytoplasmě, ale zároveň působí antagonisticky vůči FBXL3, což má na CRY proteiny v konečném důsledku stabilizační efekt. V absenci FBXL21 tak dochází k rychlejšímu obratu CRY a zkrácení cirkadiánní periody, přičemž ztráta funkce FBXL3 má účinek zcela opačný. Rovnováha mezi degradací a stabilizací CRY proteinů zajištěná kombinovaným působením FBXL3 a FBXL21 je tudíž nezbytná pro udržení 24-hodinových oscilací cirkadiánních hodin (Hirano *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2013).

## 2.2 Suprachiasmatické jádro jako hlavní oscilátor cirkadiánního systému

Mezi klíčové předpoklady pro správné fungování cirkadiánního systému patří vzájemná synchronizace jednotlivých oscilátorů v těle a synchronizace jejich cirkadiánních rytmů s 24-hodinovým solárním dnem. Právě tyto funkce zajišťuje hlavní cirkadiánní oscilátor, kterým je u savců suprachiasmatické jádro (SCN). Úloha SCN jako hlavního cirkadiánního oscilátoru byla experimentálně prokázána v sérii pokusů zaměřených na transplantaci či destrukci této mozkové oblasti. Elektrickou lézí SCN byla u zvířecích modelů navozena ztráta rytmicity např. v lokomoci či v produkci hormonů (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). Transplantace fetální tkáně SCN obnovila cirkadiánní rytmy v lokomoci u původně arytmičtých zvířat s poškozeným SCN (Lehman *et al.*, 1987), přičemž délka periody oscilací byla určena genotypem dárce bez ohledu na původní genotyp příjemce (Ralph *et al.*, 1990). SCN navíc vykazuje cirkadiánní rytmy v neuronální aktivitě i v případě *in vivo* fyzické izolace od ostatních mozkových oblastí, které v důsledku přerušení kontaktu se SCN naopak rytmicitu ztrácí (Inouye & Kawamura, 1979).

SCN je párová neuronální struktura předního hypothalamu, která se nachází přímo nad optickým chiasmatem. Skládá se z přibližně 20 000 neuronů, které mohou být rozděleny do dvou subpopulací tvořících odlišné anatomické oblasti (Obr. 3) – ventrální jádro (z angl. core) a dorsální obal (z angl. shell) (Abrahamson & Moore, 2001). Neurony jádrové oblasti exprimují především vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP) nebo gastrin-uvolňující peptid (GRP), přijímají signály z retiny a podílí se na interní synchronizaci SCN (Yamaguchi *et al.*, 2003). Neurony obalu, které jádro obklopují, produkují arginin vasopresin (AVP), přijímají signály z nevizuálních kortikálních a subkortikálních oblastí mozku a účastní se synchronizace periferních oscilátorů (Evans *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2002).



**Obr. 3: Řez myším suprachiasmatickým jádrem.** Oblast ventrálního jádra (core) je značena zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) exprimovaným v neuronech produkujících GRP (zelená barva). Oblast dorsálního obalu (shell) je značena imunofluorescenčním barvením AVP (červená barva). Mezi levým a pravým SCN je třetí mozková komora a ve spodní části se nachází optické chiasma. (Převzato a upraveno dle Welsh *et al.*, 2009)

Ačkoliv SCN neurony stejně jako ostatní tělní buňky obsahují autoregulační molekulární hodiny, od ostatních oscilátorů se liší v několika podstatných ohledech. Prvním z nich je vysoká míra organizovaného propojení SCN neuronů v neuronální síť. Toto intercelulární spojení zajišťuje neuronům vzájemnou interní synchronii, díky které SCN generuje robustní a stabilní cirkadiální rytmy (Herzog *et al.*, 2004). Jako hlavní interní synchronizační prvek slouží neuropeptid VIP, jehož absence u SCN neuronů vede ke ztrátě schopnosti vzájemné synchronizace (Aton *et al.*, 2005).

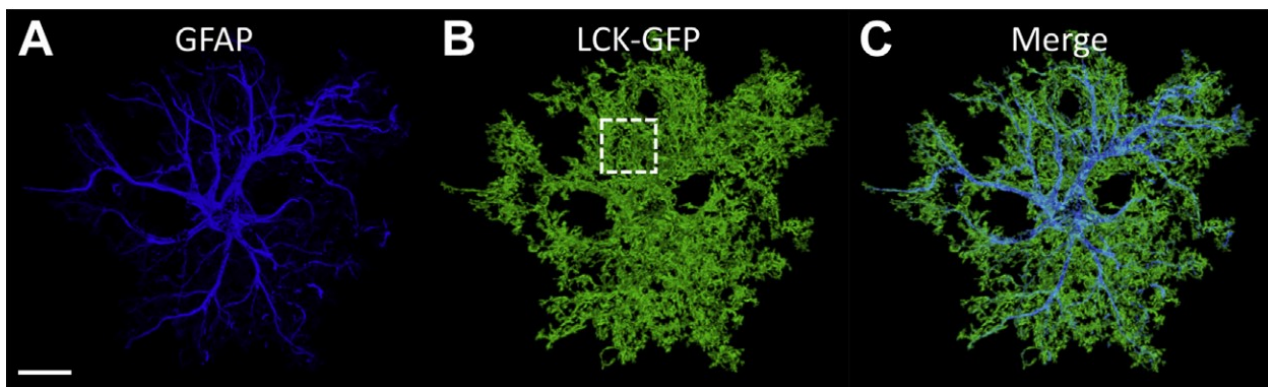
Dalším charakteristickým rysem hlavního oscilátoru je přímé spojení s retinou. Světlo, které je považováno za hlavní externí synchronizační faktor cirkadiálních hodin, díky němu dokáže ovlivnit

fázi cirkadiálních oscilací v procesu světelné synchronizace. Informace o světle je vedena retinohypothalamickým traktem (RTH), který představuje monosynaptickou dráhu mezi fotosenzitivními retinálními gangliovými buňkami (ipRGCs z angl. intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) a jádrovou oblastí SCN (Berson *et al.*, 2002; Güler *et al.*, 2008; Moore & Lenn, 1972). V důsledku aktivace gangliových buněk dochází v SCN k uvolňování neuropeptidů glutamátu a PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Hannibal *et al.*, 2000), jejichž působení vede ke vtoku vápníku, aktivaci proteinkináz a fosforylaci transkripčního faktoru CREB (cAMP response element-binding protein) (Meijer & Schwartz, 2003; Michel *et al.*, 2006). CREB se následně váže na regulační elementy hodinových genů *Per1* a *Per2* (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002) a pozitivně ovlivňuje jejich expresi (Lee *et al.*, 2010). Světelná indukce hodinových genů *Per* představuje způsob regulace základních zpětnovazebných smyček, v jejímž důsledku mohou být cirkadiální hodiny resetovány a přizpůsobeny světelným rytmům vnějšího prostředí (Shigeyoshi *et al.*, 1997).

Třetí důležitou charakteristikou SCN je schopnost synchronizace cirkadiálních rytmů v ostatních oblastech mozku a v periferních orgánech, která umožňuje předat informace o vnějším prostředí dalším buňkám organismu. Tato systémová regulace je zprostředkována především hormonálními (Balsalobre *et al.*, 2000) a autonomně-neuronálními (Vujović *et al.*, 2008) výstupy SCN, ale také modulací tělesné teploty (Brown *et al.*, 2002) nebo potravního chování (Stokkan *et al.*, 2001).

### 3 Astrocyty

Mezi gliovými buňkami centrální nervové soustavy (CNS) rozlišujeme tři základní buněčné typy – mikroglie, oligodendrocyty a astrocyty. Astrocyty (Obr. 4) jsou z neuroglií CNS nejpočetnější a vyskytuje se u nich značná rozmanitost ve fyziologických vlastnostech a morfologii. Exprimují širokou škálu receptorů, kanálů a transportérů a disponují mechanismy pro sekreci až 200 bioaktivních molekul včetně transmiterů, neuromodulátorů, růstových faktorů a hormonů (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Díky těmto vlastnostem mohou astrocyty vykonávat řadu fyziologických funkcí.



**Obr. 4: Obrázek astrocytární buňky s vysokým rozlišením.** (A) Imunohistochemické barvení GFAP (glial fibrillary acidic protein) je znázorněno modrou barvou. Jedná se o filamentární protein, jehož funkcí je zachování strukturální integrity astrocytu a účast na transportu proteinů. (B) Vizualizace astrocytární plazmatické membrány pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Uprostřed zarámované oblasti se nachází specifický tvar plazmatické membrány, která v daných místech obklopuje synaptický aparát. (C) Sloučený obrázek znázorňující vztah mezi skeletárním GFAP a tvarem architektury plazmatické membrány. Měřítka obrázků (A-C) = 10  $\mu\text{m}$ . (Převzato a upraveno dle Scofield, 2018)

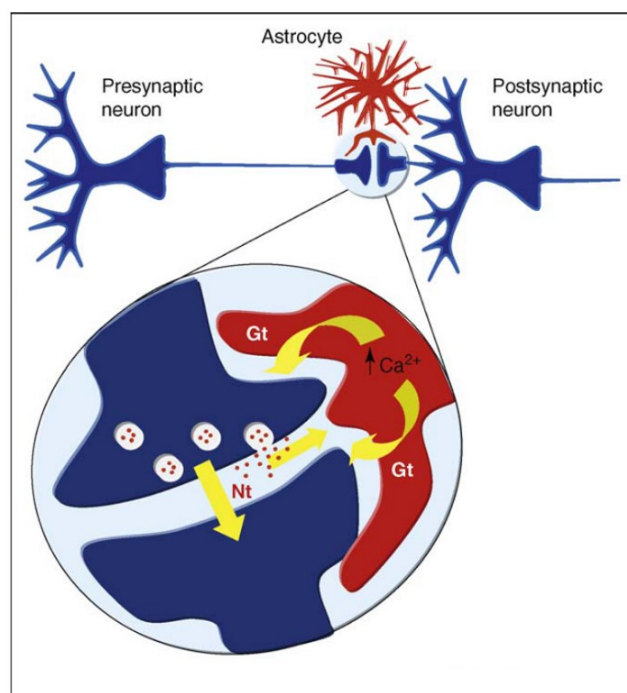
#### 3.1 Funkce astrocytů

Díky své heterogenitě mohou astrocyty vykonávat různé funkce, mezi které patří: (i) regulace neurogeneze a synaptogeneze (Ashton *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012); (ii) strukturální funkce napomáhající ustanovit mikroarchitekturu CNS (Halassa, Fellin, Takano, *et al.*, 2007); (iii) tvorba a regulace hematoencefalické bariery (Heithoff *et al.*, 2021; Janzer & Raff, 1987); (iv) metabolická podpora neuronů (Choi *et al.*, 2012); (v) homeostatické funkce týkající se například regulace extracelulárního pH či neurotransmiterů (Rothstein *et al.*, 1996; Theparambil *et al.*, 2020); a (vi) funkce signalizační zahrnující mj. uvolňování transmiterů a regulaci synaptické transmise (Araque *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2005).

Účast astrocytů na synaptické transmissi se dostala do popředí neurobiologických výzkumů zejména od 90. let, kdy byl vědecké veřejnosti představen koncept tripartitní synapse (Araque *et al.*, 1999). Ten na rozdíl od dříve přijímaného paradigmatu, že se mozkových funkcí účastní výhradně neurony, predikuje regulaci informačního přenosu koordinovanou aktivitou neuronů a glií.

### 3.1.1 Tripartitní synapse

Koncept tripartitní synapse je založen na existenci obousměrné komunikace mezi astrocyty a neurony (Obr. 5). Popisuje, že astrocyty díky receptorům pro neurotransmitery dokáží zaznamenat neuronální respektive synaptickou aktivitu a reagovat na ni zvýšením intracelulární koncentrace vápníku. V důsledku vápníkové signalizace začnou astrocyty produkovat tzv. gliotransmitery, které zpětně ovlivňují neurony a synaptický přenos (Araque *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2009). Účinky tohoto procesu, zvaného gliotransmise, se různí v závislosti na typu gliotransmiteru, neuronálním prostředí a druhu receptoru, na který se gliotransmitter váže (Durkee & Araque, 2019). Tripartitní synapse je tedy funkčně určena třemi prvky – presynaptickým neuronem, postsynaptickým neuronem a přilehlým astrocytem – jež společně zajišťují a regulují informační tok.



**Obr. 5: Schéma tripartitní synapse.** Grafické znázornění představující přenos informace mezi neuronálními prvky a astrocytem tripartitní synapse. Na neurotransmitery (Nt) uvolňované během synaptické aktivity astrocyty reagují zvýšením vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a zpětně regulují neuronální excitabilitu a synaptický přenos prostřednictvím uvolňování gliotransmiterů (Gt) závislém na vápníkové signalizaci. (Převzato a upraveno dle Perea *et al.*, 2009)



## 3.2 Vápníková signalizace v astrocytech

Narozdíl od neuronů nejsou astrocyty elektricky excitabilní, vykazují však excitabilitu založenou na změnách intracelulární koncentrace vápníku (Aguado *et al.*, 2002; Pasti *et al.*, 1997).

Ionty vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) patří mezi nejrozšířenější a nejuniverzálnější signální molekuly, které působí ve většině buněčných typů včetně astrocytů. Buněčná koncentrace vápníku ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) se různí v závislosti na lokalizaci – v cytoplasmě je během klidového stavu  $[\text{Ca}^{2+}]$  udržována na nízké úrovni (~100 nM), a to zejména v kontrastu s mnohonásobně vyšší extracelulární  $[\text{Ca}^{2+}]$ , která se pohybuje v řádu mM (Clapham, 2007). Vyšší  $[\text{Ca}^{2+}]$  se nachází rovněž v některých buněčných organelách, mezi které patří mitochondrie a endoplazmatické retikulum (ER) (De la Fuente *et al.*, 2013; Moreau *et al.*, 2006). Velké koncentrační gradienty umožňují pohyb  $\text{Ca}^{2+}$  mezi těmito organelami a cytoplasmou nebo mezi cytoplasmou a extracelulárním prostředím. To vede k fluktuacím cytoplazmatického vápníku, přičemž elevace  $[\text{Ca}^{2+}]$  v buňce plní signalizační funkce.

Zvýšení cytoplazmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) může být indukováno intracelulárními posly, extracelulárním stimulem nebo změnami membránového potenciálu (Bagur & Hajnóczky, 2017). V astrocytech vápníková signalizace nastává buď spontánně tj. bez vlivu neuronální aktivity nebo vzniká jako odpověď na neuronální stimulaci (Hirase *et al.*, 2004). Mezi důsledky zvýšení astrocytární  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  patří uvolňování signálních molekul, které působí na sousední neurony a modulují synaptický přenos (viz 3.3.3).

### 3.2.1 Mechanismy vápníkové signalizace v astrocytech

Nejrozšířenější mechanismus pro elevaci astrocytární  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  představuje vylití  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásobníků těchto iontů. K tomu dochází po aktivaci receptorů spřažených s G-proteiny (tzv. metabotropních receptorů), mezi které řadíme mj. i skupinu receptorů pro glutamát (Biber *et al.*, 1999). Aktivace receptoru vede ke stimulaci fosfolipázy C (PLC), která indukuje produkci diacylglycerolu (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfátu ( $\text{IP}_3$ ).  $\text{IP}_3$  se váže na  $\text{IP}_3$  receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) a následně dochází k uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  z ER do cytoplazmy (Aguilhon *et al.*, 2008). Zpětné vychytávání  $\text{Ca}^{2+}$  do lumen ER probíhá pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázové pumpy SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase).

Pokles koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v ER spustí odlišný mechanismus vápníkové signalizace nazývaný SOCE (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry), při kterém dochází ke vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostředí do buňky. Vtok iontů je zajištěn otevřením plazmatických kanálů SOCs (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels), které zahrnují například některé druhy TRP kanálů (Golovina, 2005). Mezi funkce SOCE patří posílení vápníkové signalizace (zvyšováním koncentrace cytoplazmatického  $\text{Ca}^{2+}$ ) a doplnění zásob  $\text{Ca}^{2+}$  v ER (Okubo *et al.*, 2020).

Vápníkové signalizace v astrocytech se účastní rovněž ionotropní  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilní receptory, které jsou aktivovány působením neurotransmiterů (zejm. glutamátu a ATP). Jedná se o ionotropní AMPA/NMDA glutamátové receptory a P2X purinoreceptory, jejichž stimulace vede ke vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  do cytoplazmy (Lalo *et al.*, 2011). S gradientem  $\text{Na}^+$  souvisí také aktivita NCX (sodium/calcium exchanger), který může indukovat zvyšování i snižování  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  v závislosti na intracelulární koncentraci  $\text{Na}^+$  a membránovém potenciálu (Rose *et al.*, 2020). V neposlední řadě se na změnách astrocytární  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  podílí mitochondrie, které mohou (stejně jako ER) plnit funkci intracelulárního zásobníku  $\text{Ca}^{2+}$  a uvolňovat  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriálním exchangerem NLCX (Parnis *et al.*, 2013).

Obecně shrnuto, transport  $\text{Ca}^{2+}$  je uskutečňován pomocí různých membránových  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (plazmatických i intracelulárních), transportérů a pump. Každý buněčný typ obsahuje specifickou kombinaci těchto transportních prvků, což umožňuje přizpůsobení vápníkové signalizace potřebám daných buněk (Berridge *et al.*, 2000). U astrocytů se díky tomu vyskytují různé formy vápníkové signalizace, která může být omezena na jedinou buňku resp. její mikrodoménu nebo může mít intercelulární dosah, kdy dochází k šíření signálu do okolních buněk ve formě tzv. vápníkových vln (Di Castro *et al.*, 2011; Kuga *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Vápníkové vlny

Intercelulární vápníkové vlny (ICWs z angl. intercellular calcium waves) představují proces šíření elevací  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  v rámci multiceulárních syncytií. Vyskytují se u mnoha buněčných typů a zahrnují uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob (Leybaert & Sanderson, 2012). Existují dva mechanismy transmise ICWs mezi astrocyty, přičemž první z nich probíhá skrz gap junctions a druhý je zprostředkován extracelulárními posly (Fujii *et al.*, 2017).

Astrocytární syncytia vykazují vysokou míru buněčné konektivity, která je zajištěna těsnými buněčnými spoji (tzv. gap junctions), jež se skládají z bílkovinných konexinů. Tyto kanály představují spojení mezi cytoplazmami sousedních buněk a umožňují rychlou mezibuněčnou komunikaci ve formě prosté difúze široké škály malých molekul včetně energetických metabolitů, iontů a druhých poslů (Pannasch & Rouach, 2013). Mezi tyto molekuly patří i  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{IP}_3$ , které se na zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  mohou podílet buď přímo nebo prostřednictvím stimulace  $\text{IP}_3\text{R}$ .

Druhým způsobem šíření ICWs je parakrinní signalizace, v rámci které je signální molekula uvolněna do extracelulárního prostředí a následně vazbou na membránové receptory sousedních buněk indukuje zvýšení jejich  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Tímto extracelulárním poslem je v astrocytech molekula ATP (Guthrie *et al.*, 1999), která se po svém uvolnění váže na metabotropní purinergní receptory, čímž spustí uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  z ER.

Vápníkové vlny u astrocytů slouží jako prostředek intercelulární komunikace (Nedergaard, 1994) a spekuluje se také o jejich roli v modulaci synaptické aktivity (Fiacco & McCarthy, 2004). Díky svému výskytu v patologických podmínkách jsou ICWs rovněž asociovány s některými nemocemi. Příkladem může být objev spontánních ICWs v blízkosti amyloidních plaků u myši s Alzheimerovou chorobou (Kuchibhotla *et al.*, 2009).

### 3.3 Gliotransmise

Gliotransmise je proces uvolnění chemických transmitterů (tzv. gliotransmitterů) z astrocytů, který nastává v důsledku vápníkové signalizace a podílí se na intercelulární komunikaci (Halassa, Fellin & Haydon, 2007). Aby mohla být chemická látka nazývána gliotransmitterem, musí splňovat soubor specifických podmínek – musí být syntetizována nebo skladována v gliových buňkách, její uvolnění musí být regulováno fyziologickými či patologickými stimuly a mělo by vést k rychlé odpovědi v okolních buňkách a nakonec, tato látka musí být významnou součástí (pato)fyziologických procesů (Parpura & Zorec, 2010). Výčet známých gliotransmitterů zahrnuje různé druhy peptidů, nukleotidů a aminokyselin. Mezi nejdůležitější z nich řadíme glutamát a ATP (Halassa, Fellin & Haydon, 2007).

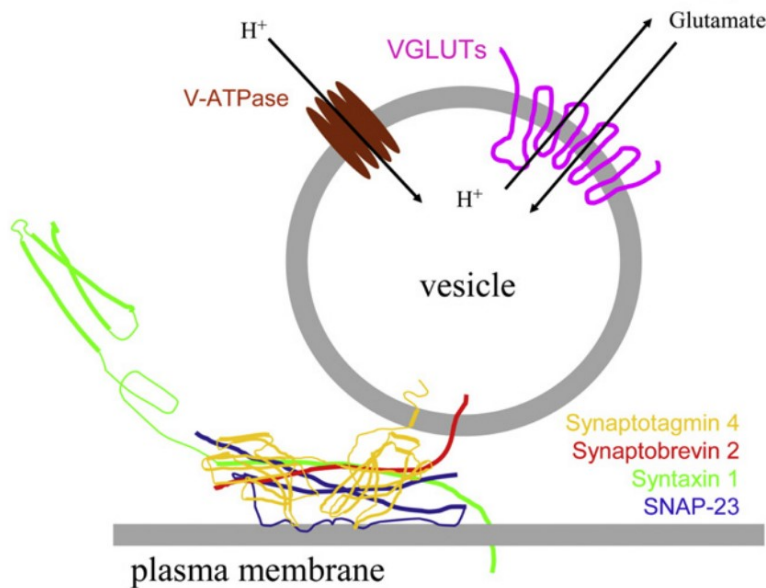
#### 3.3.1 Glutamát jako gliotransmitter

Glutamát slouží jako jeden z hlavních excitačních neurotransmitterů v mozku a funguje rovněž jako gliotransmitter. Astrocyty umí glutamát syntetizovat *de novo* a také absorbovat pomocí glutamátových transportérů, mezi které patří EAAT1 a EAAT2 někdy nazývané jako GLAST a GLT1. Dále astrocyty glutamát metabolizují na glutamin činností glutaminové syntetázy (GS) nebo jej uvolňují do extracelulárního prostředí v rámci procesu gliotransmise (Harada *et al.*, 2015; Hertz, 2006). Po svém uvolnění do extracelulárního prostoru působí glutamát na glutamátové receptory, mezi které patří metabotropní receptory a ionotropní NMDA, AMPA a kainátové receptory (Kew & Kemp, 2005).

Nezbytnost  $\text{Ca}^{2+}$  pro glutamátovou gliotransmisi byla prokázána v pokusech, v rámci kterých blokáce zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]$  v cytoplasmě astrocytů vedla k inhibici uvolňování glutamátu (Parpura *et al.*, 1994). Redukce uvolňovaného glutamátu rovněž nastala v případě využití  $\text{Ca}^{2+}$  chelátoru BAPTA, který zvyšuje puřovací kapacitu pro cytoplazmatický  $\text{Ca}^{2+}$ , nebo při vyčerpání intracelulárních zásobníků  $\text{Ca}^{2+}$  působením thapsigarginu (Innocenti *et al.*, 2000).

Obecně přijímaným mechanismem pro uvolňování glutamátu z astrocytů je  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní exocytóza (Obr. 6). Aby byla buňka schopná uvolňovat látky prostřednictvím exocytózy, musí mít k dispozici specifický buněčný aparát. Jeho důležitou součástí je SNARE komplex, který zahrnuje proteiny syntaxin, synaptobrevin a SNAP-23 (synaptosomal-associated protein of 23 kDa) (Montana *et al.*, 2006). Tento komplex zajišťuje fúzi váčkové a plazmatické membrány, která je pro exocytózu nezbytná. Další důležitou součástí představují proteiny účastníci se plnění váčků – V-ATPázy, které

vytváří protonový gradient mezi lumen váčku a cytoplasmou, a vezikulární glutamátové transportéry (VGLUTs), které tento gradient využívají k transportu transmitterů do váčku (Montana *et al.*, 2006). Množství studií zkoumalo důležitost těchto procesů pro astrocytární uvolňování glutamátu. Patří mezi ně pokusy s inhibitory SNARE komplexu (různé druhy toxinů, např. tetanotoxin či botulotoxin), inhibitory V-ATPázy (bafilomycin A) nebo alosterické modulátory VGLUT (Rose Bengal) působící inhibicí transportu glutamátu do váčků. Ve všech uvedených případech byl v rámci experimentů zaznamenán významný pokles v uvolňování glutamátu (Araque *et al.*, 2000; Montana *et al.*, 2004).



**Obr. 6: Uvolňování glutamátu prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní exocytózy.** Transport glutamátu z cytoplazmy do váčku probíhá pomocí vezikulárních glutamátových transportérů (VGLUTs), které pro svou funkci využívají protonový gradient generovaný V-ATPázou. Glutamát akumulovaný ve váčku je uvolněn z astrocytu po fúzi váčku s plazmatickou membránou. Tento fúzní proces je zprostředkován synaptotagminem 4 a SNARE proteiny: syntaxinem 1, synaptobrevinem 2 a SNAP-23. (Převzato a upraveno dle Parpura & Zorec, 2010)

Glutamát může být z astrocytů uvolňován i odlišnými způsoby, mezi které patří uvolnění ionotropními purinergními receptory, uvolnění membránovými transportéry nebo uvolnění skrz gap junctions (Harada *et al.*, 2015). Detaily týkající se rozsahu a specifity užívání těchto mechanismů však prozatím nejsou objasněny.

### 3.3.2 ATP jako gliotransmitter

ATP je kromě důležitého energetického zdroje pro buňky také signální molekulou, která se účastní intercelulární komunikace v mozku. Po svém uvolnění do extracelulárního prostoru může přímo působit na purinergní receptory, mezi které patří ionotropní P2X a metabotropní P2Y receptory. Jako signální molekuly slouží rovněž jeho metabolické produkty – ADP, AMP a adenosin – vznikající hydrolýzou ATP, kterou zajišťují enzymy ektonukleotidázy (Abbraccio *et al.*, 2009).

Obecným mechanismem ATP gliotransmise je stejně jako v případě glutamátu  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní exocytóza (Pangršič *et al.*, 2007). Potvrzuje to pozorování, že je astrocytární uvolňování ATP redukováno bafilomycinem A a tetanotoxinem (Coco *et al.*, 2003), a objev vezikulárního nukleotidového transportéru (VNUT), který je zodpovědný za váčkovou akumulaci ATP (Sawada *et al.*, 2008). Na astrocytární exocytóze ATP se podílí rovněž lysozomy, které ATP uskladňují a v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$  také uvolňují (Zhang *et al.*, 2007). Další mechanismy pro uvolňování ATP z astrocytů zahrnují například gap junctions, P2X receptory nebo aniontové kanály (Illes *et al.*, 2019).

### 3.3.3 Důsledky astrocytární gliotransmise

Gliotransmitery uvolněné do extracelulárního prostředí aktivují receptory neuronů a zprostředkují astrocytární regulaci neuronální aktivity a synaptické transmise. Obecné shrnutí konkrétních účinků jednotlivých gliotransmiterů je velmi obtížné, neboť gliotransmisí zprostředkovaná signalizace mezi astrocyty a neurony je značně komplexní a závisí na mnoha faktorech. Prvním z nich je diverzita v neuronálním signálu (např. typu neurotransmiteru), který astrocyt přijímá a specificky na něj reaguje elevací  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a následnou gliotransmisí. Konkrétní astrocyt navíc může uvolňovat více typů gliotransmiterů, které mají různé funkční důsledky na neurony a synaptickou fyziologii. Zároveň se různí i účinky jediného gliotransmiteru, a to v závislosti na neuronálním prostředí, presynaptické či postsynaptické lokalizaci jeho receptorů a konkrétním typu aktivovaného receptoru (Covelo & Araque, 2018; Durkee & Araque, 2019).

Glutamátová gliotransmise tak dokáže působit excitačně a posílit synaptickou transmissi aktivací presynaptických NMDA receptorů (Jourdain *et al.*, 2007) nebo zvýšit neuronální excitabilitu skrz extrasynaptické NMDA receptory (Fellin *et al.*, 2004). Její působení však může mít také inhibiční účinky, příkladem při aktivaci presynaptických kainátových (Liu *et al.*, 2004) nebo metabotropních glutamátových receptorů (Andersson *et al.*, 2007). Podobně také gliotransmitter ATP (potažmo jeho metabolity) může mít na synaptickou transmissi inhibiční i excitační vliv (Martin-Fernandez *et al.*, 2017).

V souvislosti s gliotransmisí je nutné zmínit rovněž kontroverzi s ní spojenou. Ačkoliv existuje velké množství studií, které model gliotransmise a astrocytární modulace synaptického přenosu podporují, najdou se i odpůrci těchto konceptů. Ti kritizují zejména výzkumné metody experimentů (např. užívání neselektivních látek ovlivňujících astrocytární i neuronální buňky) a prohlašují, že uvolňování transmiterů je za fyziologických podmínek specializací neuronů, nikoli astrocytů (Fiacco & McCarthy, 2018). Zda jsou tyto postřehy validní a skutečně vyvracejí funkční roli gliotransmise, však zůstává otázkou.

## 4 Cirkadiánní systém v astrocytech

Rytmické procesy řízené cirkadiánním systémem byly kromě jiných buněčných typů pozorovány také v astrocytech. Tato kapitola se zaměřuje na důkazy, molekulární podstatu i fyziologické důsledky cirkadiánního chování astrocytů.

### 4.1 Důkazy cirkadiánních rytmů v astrocytech

Rytmická exprese hodinových genů byla prokázána v primárních kulturách astrocytů za užití reportérového genu luciferázy (*Luc*), který slouží jako nástroj pro detekci transkripční aktivity DNA v reálném čase (Alam & Cook, 1990). Bioluminiscence indukovaná přepisem genů *Per1<sup>Luc</sup>*, *Per2<sup>Luc</sup>* a *Bmal1<sup>Luc</sup>* umožnila zaznamenat rytmy v expresi daných genů a prokázat cirkadiánní periodu jejich oscilací (Prolo *et al.*, 2005; Yagita *et al.*, 2010). Tyto výsledky dokazují, že astrocyty disponují molekulárním cirkadiánním mechanismem, jehož podstatou jsou vzájemné interakce hodinových genů a jejich proteinů.

V rámci zkoumání vlivu hodinových genů na fyziologii astrocytů byly objeveny cirkadiánní rytmy v expresi a distribuci GFAP (glial fibrillary acidic protein), které přetrvávaly i v podmínkách konstantní tmy (Leone *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2005). GFAP je specifický strukturní protein astrocytů a lze jej detekovat pomocí imunohistochemických metod. Vysokou míru GFAP imunoreaktivity vykazuje SCN, proto mohou být cirkadiánní rytmy GFAP považovány za jeden z markerů rytmické aktivity molekulárních hodin (Lavialle & Servière, 1993).

Mezi další projevy cirkadiánního systému v astrocytech patří rytmy v genové expresi a proteinových hladinách glutamátového transportéru GLAST, rytmy v aktivitě glutaminové syntetázy nebo rytmy v uvolňování gliotransmiterů (viz dále).

### 4.2 Cirkadiánní rytmy spojené s gliotransmisí

#### 4.2.1 Rytmy v uvolňování ATP

V kultuře myších kortikálních astrocytů byly s využitím luciferázové bioluminiscence pozorovány rytmy v uvolňování ATP do extracelulárního prostoru s periodou přibližně 24 h. Až 75 % astrocytárních kultur vykazovalo tyto cirkadiánní oscilace po dobu minimálně tří dnů (v závislosti na přísnosti kritérií pro statistické potvrzení periody a amplitudy oscilací). Pro zjištění, zda rytmy uvolňování ATP závisí na hodinových genech, byla testována koncentrace extracelulárního ATP u astrocytů s mutacemi v genech *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* a *Bmal1*. Experimenty ukázaly, že rytmus v uvolňování ATP byl výrazně ovlivněn v případě *Clock*, *Per1* a *Per2* mutací, které indukovaly ztrátu oscilací ATP u většiny zkoumaných kultur. Nízké procento mutovaných kultur vykazovalo narušené cirkadiánní rytmy, přičemž množství uvolňovaného ATP bylo oproti WT (wild

type) kulturám až o polovinu nižší. Z těchto výsledků vyplývá, že astrocytární uvolňování ATP je pod kontrolou cirkadiálního systému a závisí na funkčních hodinových genech *Clock*, *Per1* a *Per2* (Marpegan *et al.*, 2011).

K obdobným závěrům došli i autoři studie Womac *et al.* (2009), ve které byly pozorovány rytmické fluktuační hladin extracelulárního ATP nejen v kulturách kortikálních astrocytů a buněk SCN, ale také *in vivo* v SCN zvířecích modelů (Womac *et al.*, 2009). Cirkadiální oscilace v uvolňování ATP a jeho akumulaci v extracelulárním prostředí by tak mohly představovat jeden z přirozených fyziologických výstupů molekulárních hodin v astrocytech SCN i dalších mozkových oblastí.

Mechanismus rytmického uvolňování ATP prozatím není objasněn. Důležitou roli v něm prokazatelně hraje  $Ca^{2+}$ , neboť narušení  $IP_3$  signalizace vede ke ztrátě rytmicity a k snížení extracelulárních hladin ATP. Naopak mutace v proteinech SNARE komplexu a jimi inhibovaná schopnost exocytózy nemá na rytmicitu uvolňování ATP žádný vliv. Tyto výsledky značí, že exocytóza se buď cirkadiálních rytmů v ATP gliotransmisi neúčastní nebo může být v případě potřeby nahrazena jiným mechanismem (Marpegan *et al.*, 2011).

Mezi předpokládané funkce ATP patří vyvolání transmise vápníkových vln a zprostředkování intercelulární signalizace mezi astrocyty a neurony (viz 3.2.2). Objev rytmické podstaty gliotransmise dal vzniknout předpokladům, že by ATP mohl fungovat jako jeden z prvků regulujících aktivitu a případně i synchronizaci buněk SCN (Womac *et al.*, 2009). Pro synchronizaci astrocytárních cirkadiálních rytmů však tento předpoklad neplatí, jak prokázal ve svém pokusu Marpegan *et al.* (2011). V astrocytech s blokovanou  $IP_3$  signalizací, která vede ke ztrátě rytmů ATP gliotransmise, totiž probíhá normální cirkadiální exprese hodinových genů. Není však vyloučeno, že astrocyty produkovaný ATP nebo jeho metabolity mohou sloužit jako astrocytární cirkadiální výstup a ovlivňovat jiné typy buněk, neboť receptory pro ATP se hojně nachází v neuronech i gliových buňkách v celém objemu mozku (Burnstock & Knight, 2004).

#### 4.2.2 Rytmus v absorpci a uvolňování glutamátu

Cirkadiální rytmus v absorpci glutamátu kortikálními astrocyty byl zkoumán na kultivovaných astrocytech z myši s různými cirkadiálními genotypy. Bylo zjištěno, že absorpce glutamátu je výrazně redukována v případě mutací v hodinových genech *Clock* a *Per2*. Absence funkčních genů *Clock* a *Npas2* (ale již ne *Per2*) rovněž negativně ovlivnila množství mRNA i hladinu proteinů glutamátového transportéru astrocytů GLAST, který se procesu absorpce účastní. Klíčovým zjištěním těchto pokusů a porovnání s WT modely bylo, že ač je glutamátová absorpce v kortikálních astrocytech závislá na hodinových genech, nevykazuje žádné rytmické fluktuační v čase. Tyto výsledky dokazují necirkadiální charakter absorpce *in vitro*, zároveň ale nezavrhují možnost, že by rytmické vzorce mohla

vykazovat v *in vivo* podmínkách. Prokazatelně je však modulována hodinovými geny a jejich proteinovými produkty, které s největší pravděpodobností ovlivňují transkripci genů či stabilitu proteinů zapojených do astrocytární absorpce glutamátu (Beaulé *et al.*, 2009).

Studie autorů Leone *et al.* (2015) se zaměřila na astrocyty v kulturách SCN. Hypotéza pro tuto studii vycházela z předpokladu, že glutamátergní vedení informace o světle do SCN indukuje v astrocytech SCN zvýšenou míru absorpce glutamátu i jeho přeměny na glutamin a naopak tma povede ke snížení těchto procesů. Pro ověření této hypotézy byla měřena míra astrocytární absorpce glutamátu v různých světelných podmínkách. V LD (light-dark) podmínkách byla zaznamenána vyšší absorpce glutamátu během světelné fáze dne než ve tmě, v DD (dark-dark) podmínkách naopak nebyly zaznamenány žádné změny v absorpci mezi subjektivní nocí a dnem. Absorpce glutamátu v SCN tedy vykazuje denní, ale nikoli cirkadiální rytmy (Leone *et al.*, 2015). Další pokus byl zaměřen na glutaminovou syntetázu, která katalyzuje konverzi glutamátu na glutamin a účastní se tak intracelulárního metabolismu astrocytů. Byly pozorovány signifikantní rozdíly v aktivitě glutaminové syntetázy během dne a noci (s vyšší aktivitou během světelné fáze) a to v LD i DD podmínkách. Glutaminová syntetáza tedy je regulována cirkadiálním systémem a její aktivita je zvýšená během subjektivního dne (Leone *et al.*, 2015). Tyto výsledky potvrzují denní i cirkadiální regulaci astrocytárního glutamátového metabolismu a spolu se závěry studie autorů Beaulé *et al.* (2009) dokazují, že absorpce glutamátu astrocyty z různých mozkových oblastí obecně nepodléhá cirkadiální regulaci související s astrocytárními molekulárními hodinami.

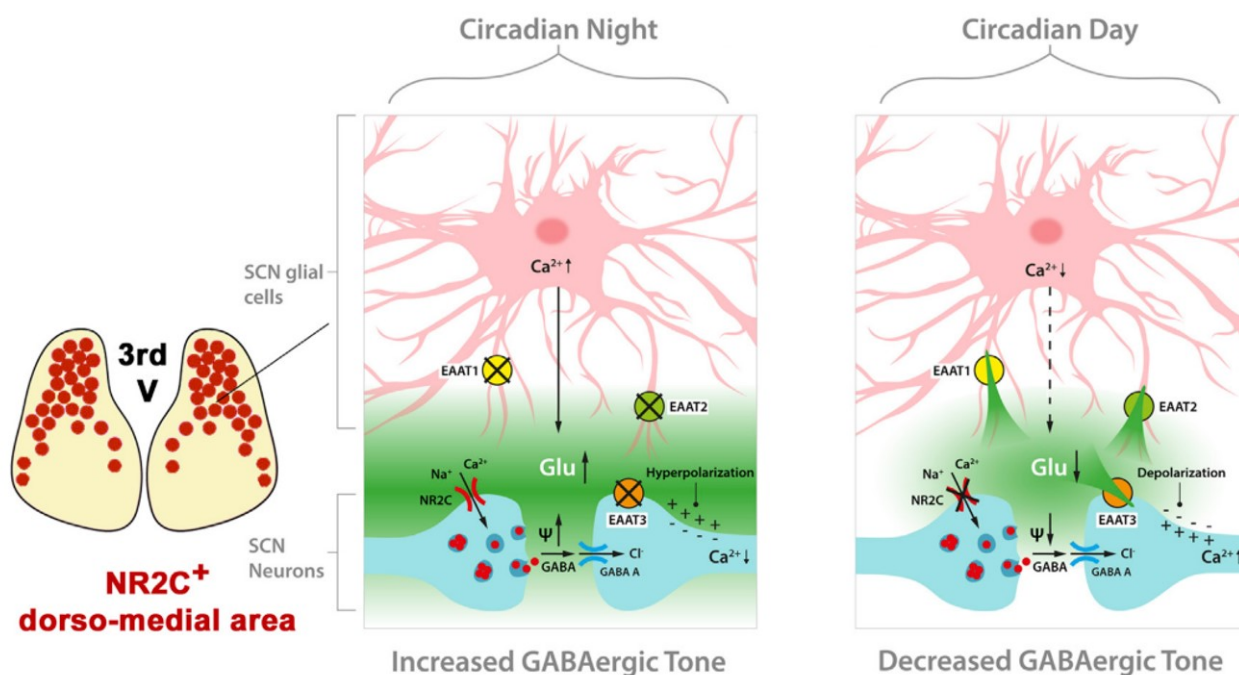
V rámci studie autorů Brancaccio *et al.* (2017) byla v řezech SCN prováděna dlouhodobá detekce hladin cytoplazmatického  $Ca^{2+}$ , která odhalila antifázické cirkadiální rytmy ve fluktuaci neuronální a astrocytární  $[Ca^{2+}]_c$ . Oscilace  $[Ca^{2+}]_c$  v astrocytech byly navíc synchronizovány s rytmy v hladinách extracelulárního glutamátu ( $Glu_e$ ), který patří mezi hlavní gliotransmitery. Pro potvrzení, že  $Glu_e$  pochází z astrocytů a fluktuace v jeho hladinách jsou tím pádem důsledkem cirkadiálních rytmů v glutamátové gliotransmisi, byly zvoleny tři strategie. Nejprve bylo dokázáno, že  $Glu_e$  osciluje v SCN po neomezeně dlouhou dobu i v médiu bez exogenního zdroje Glu, což značí jeho astrocytární původ, neboť neurony glutamát syntetizovat *de novo* neumí (Cesar & Hamprecht, 1995; Gamberino *et al.*, 1997). Dále byla pomocí methionin sulfoximinu (MSO) narušena aktivita glutaminové syntetázy, která je v mozku exprimována zejména v astrocytech (Norenberg, 1979). Blokace GS nejprve zvýšila hladinu cytoplazmatického Glu v astrocytech a potažmo zvýšila i míru jeho uvolňování do extracelulárního prostředí. Ještě zajímavějším zjištěním tohoto pokusu bylo, že zvýšení hladiny  $Glu_e$  bylo doprovázeno tlumením rytmů v  $Per2^{Luc}$  expresi, což značí, že astrocytární regulace  $Glu_e$  je klíčová pro zachování rytmicity v SCN. V rámci poslední strategie byly prostřednictvím selektivní apoptózy v kulturách odstraněny astrocytární či neuronální buňky. Při absenci astrocytů hladina  $Glu_e$  poklesla, při absenci



neuronů naopak došlo k jejímu zvýšení. Tyto výsledky potvrdily astrocytární původ  $\text{Glu}_e$  a také poukázaly na možnou důležitost absorpce Glu neuronů. Glutamátová absorpce a její dopady byly následně zkoumány v experimentech, ve kterých byly inhibovány glutamátové transportéry u gliových buněk (EAAT1, EAAT2) a neuronů (EAAT3). V případě inhibice gliových EAAT nebyly zaznamenány žádné změny v rytmech  $\text{Per2}^{\text{Luc}}$  exprese v SCN, inhibice neuronálních EAAT však vedla k dramatické redukci  $\text{Per2}^{\text{Luc}}$  oscilací. Oscilace  $\text{Glu}_e$  jsou tudíž generovány pomocí rytmů v glutamátové gliotransmisí a neuronální absorpci Glu, přičemž blokáce této absorpce způsobí desynchronizaci buněčných oscilátorů SCN a tím naruší jeho cirkadiánní rytmy (Brancaccio *et al.*, 2017).

Po prokázání účasti astrocytů na udržování rytmicity SCN byl podroben zkoumání mechanismus jejich působení. Na základě výsledků byl vytvořen model astrocyto-neuronální regulace cirkadiánního systému (Obr. 7). Během cirkadiánní noci SCN astrocyty vykazují vysoké hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  a do extracelulárního prostoru uvolňují velké množství glutamátu, který aktivuje NR2C podjednotky NMDA receptorů presynaptických zakončení neuronů. Aktivace NR2C následně umožní uvolňování inhibičního neurotransmiteru GABA, který zprostředkuje inhibici postsynaptických neuronů a tlumení neuronální aktivity v průběhu noci. Opačný scénář platí během cirkadiánního dne, kdy je hladina Glu redukována sníženou mírou astrocytárního uvolňování Glu a jeho intenzivní absorpcí neuronů. Tím je redukována i GABAergní neurotransmise, což opět umožní aktivaci neuronů (Brancaccio *et al.*, 2017).

Astrocyty by tak mohly sloužit jako zdroj inhibičního signálu potřebného pro vnitřní synchronizaci buněčných oscilátorů v mozku a časová segregace astrocytární a neuronální aktivity jako adaptace pro zvyšování přesnosti cirkadiánních rytmů v obalové části SCN. Tento model demonstruje čistě cirkadiánní roli astrocytů a dokazuje, že astrocyty společně s neuronů významně ovlivňují hlavní oscilátor savců lokalizovaný v SCN a díky této funkci hrají nezastupitelnou roli v udržování cirkadiánních rytmů (Brancaccio *et al.*, 2017).



**Obr. 7: Grafické znázornění navrhovaného modelu pro astrocyto-neuronální regulaci cirkadiálního systému.** (Převzato a upraveno dle Brancaccio *et al.*, 2017)

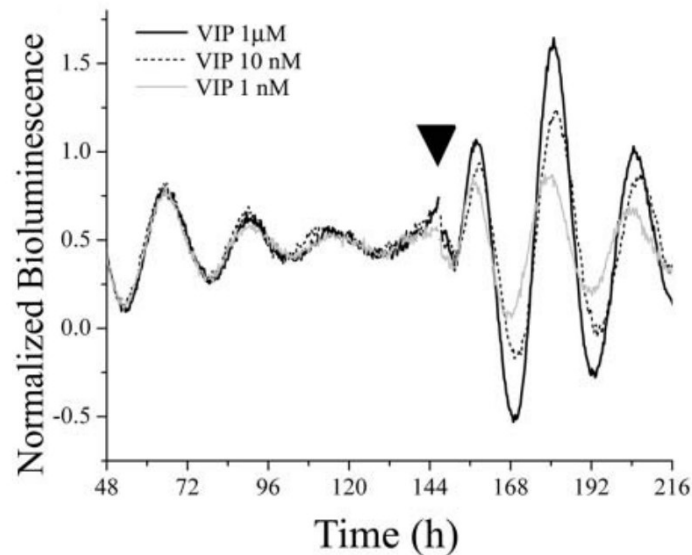
#### 4.3 Intracelulární faktory ovlivňující rytmicitu v astrocytech

S ohledem na komplexitu molekulárních pochodů sdružených s astrocyty je velmi pravděpodobné, že budou astrocytární rytmy *in vivo* ovlivňovány mnoha faktory. Ačkoliv je toto téma prozatím relativně neobjasněné, mezi známé regulátory rytmů astrocytů patří vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP) a tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

V primárních kulturách astrocytů bylo pozorováno spontánní tlumení cirkadiálních rytmů genové exprese hodinových genů, které vedlo k vymizení rytmicity přibližně do týdne od vysetí dané kultury. Možnou příčinou tohoto vývoje byla desynchronizace v rámci populace oscilátorů nebo ztráta rytmicity jednotlivých buněk. Vymizení rytmů bylo možno zabránit kokultivací s buňkami SCN, přičemž kokultivace s kortikálními buňkami na astrocyty podobný efekt neměla (Prolo *et al.*, 2005), což dokazuje důležitost specifických signálů z SCN pro synchronizaci a udržování rytmicity astrocytů.

Ukazuje se, že tímto signálním faktorem by mohl být neuropeptid VIP. VIP je produkován neurony SCN (Abrahamson & Moore, 2001) a zároveň je prokazatelně nezbytný pro jejich synchronizaci (Aton *et al.*, 2005). V pokusech s kultivovanými astrocyty z myši s indukovaným bioluminiscenčním reportérem hodinového genu *Per2* (*Per2<sup>Luc</sup>*) bylo pozorováno, že je VIP schopen obnovit rytmy v spontánně utlumených kulturách (Obr. 8) a jeho pravidelné podávání dokáže astrocyty *in vitro* synchronizovat (Marpegan *et al.*, 2009). Silný efekt VIP na cirkadiální rytmy astrocytů může být důsledkem zvýšení exprese hodinových genů nebo resynchronizace asynchronních astrocytů,

případně kombinací obojího. Ve všech případech tyto výsledky naznačují, že VIP je potenciální synchronizující faktor astrocytů a velmi pravděpodobně zprostředkovává neuro-gliovou komunikaci *in vivo* (Marpegan *et al.*, 2009).



**Obr. 8: Znázornění účinků VIP na astrocytární kultury.** Graf zobrazuje normalizované amplitudy bioluminiscenčních rytmů v kulturách astrocytů před a po podání VIP. Změna charakteru oscilací indukovaná působením VIP je označena šipkou. (Převzato a upraveno dle Marpegan *et al.*, 2009).

Další faktory, které mohou ovlivňovat cirkadiální rytmy astrocytů, jsou molekuly asociované s imunitním systémem. Mezi cirkadiálním a imunitním systémem probíhá vzájemná kooperace, v rámci které cirkadiální systém reguluje imunitní funkce a naopak složky imunitního systému silně ovlivňují cirkadiální rytmy (Cermakian *et al.*, 2013). Odpověď astrocytů na imunitní stimul, konkrétně na prozánětlivý cytokin TNF- $\alpha$ , byla zkoumána na kultuře SCN astrocytů z *Per2<sup>Luc</sup>* myši. V sérii pokusů bylo prokázáno, že TNF- $\alpha$  indukuje změny v molekulárních hodinách SCN astrocytů modulací exprese hodinového genu *Per2*. Astrocyty vystavené působení TNF- $\alpha$  jsou následně schopné vyvolat změny exprese hodinových genů v jiných buněčných typech a navodit fázové posuny v hlavním cirkadiálním oscilátoru (Duhart *et al.*, 2013). Cytokin TNF- $\alpha$  se tak řadí mezi regulátory astrocytárních cirkadiálních rytmů a odkrývá možnou roli SCN astrocytů jako prostředníků v komunikaci mezi imunitním a cirkadiálním systémem.

#### 4.4 Význam cirkadiálních hodin astrocytů

Jednou z nejzajímavějších funkcí, která byla cirkadiálním rytmům astrocytů přisouzena, je přímá účast na fungování hlavního cirkadiálního oscilátoru. Důležitost gliových buněk pro správnou funkci SCN je předpokládána již od 90. let, kdy studie autorů Prosser *et al.* (1994) zkoumala vliv glií na *in vitro* cirkadiální rytmy neuronální aktivity a *in vivo* behaviorální rytmy pokusných zvířat. V rámci

experimentů byly použity látky blokující gap junctions a také látka fluorocitrát, která skrz blokaci Krebsova cyklu inhibuje gliový metabolismus (Swanson & Graham, 1994). Výsledky studie prokázaly, že narušení fyziologických procesů v gliových buňkách vede ke změnám cirkadiálního vzorce neuronální aktivity a k behaviorální arytmicitě zvířat (Prosser *et al.*, 1994).

Skutečnou povahu účasti glií na fungování cirkadiálních hodin SCN odhalil již zmiňovaný Brancaccio *et al.* (2017), který představil SCN astrocyty jako rovnocenné partnery SCN neuronů a navrhl model neuro-astrocytární regulace cirkadiálních rytmů (viz 4.2.2). Ve svém recentnějším výzkumu navíc dokázal, že v případě absence neuronálních hodin jsou astrocyty schopny autonomně řídit molekulární oscilace v SCN a cirkadiální rytmy v chování zvířecích modelů. V rámci experimentů byl využit přístup buněčně specifického obnovení exprese *Cry1* v SCN myši s nefunkčními *Cry* geny a tím i nefunkčními molekulárními hodinami. Navozením exprese *Cry1* v astrocytech bylo možno indukovat cirkadiální expresi *Per2<sup>Luc</sup>* v SCN a rytmické vzorce v lokomoci u původně arytmičtých myší. Mechanismus stojící za působením astrocytů jako generátorů cirkadiálních rytmů spočívá v obnovení rytmické exprese hodinových genů neuronů prostřednictvím regulace cirkadiálních oscilací neuronální  $[Ca^{2+}]_c$ , přičemž důležitou roli opět zastává glutamátová gliotransmise (Brancaccio *et al.*, 2019).

Novější studie dokazují, že astrocytární hodiny ovlivňují i celou řadu dalších procesů. Jako příklad může sloužit vliv na energetický metabolismus a délku životnosti, který se u myších modelů projeví při astrocytární delecí hodinového genu *Bmal1* (Barca-Mayo *et al.*, 2020). V důsledku delece tohoto hodinového genu dochází k astroglióze – buněčným změnám nastávajícím v astrocytech v reakci na poškození či nemoc CNS (Sofroniew, 2014) – a apoptóze hypotalamických astrocytů, což má za následek změny v hypotalamických funkcích. Ty se mohou projevit změnami v metabolismu a zvýšené tělesné hmotnosti, které byly spolu s kratší životností pozorovány u zkoumaných zvířecích modelů. Společně tyto výsledky naznačují, že by delece *Bmal1* v astrocytech mohla vést k předčasnému stárnutí (Barca-Mayo *et al.*, 2020).

## 5 Závěr

Přímým důkazem existence cirkadiálního systému astrocytů je pozorování rytmické exprese hodinových genů v astrocytárních kulturách. Astrocyty tudíž disponují molekulárním cirkadiálním mechanismem, který se dále projevuje například rytmickou produkcí a distribucí proteinu GFAP, oscilacemi v proteinových hladinách glutamátového transportéru GLAST nebo rytmickou aktivitou glutaminové syntetázy.

Také proces gliotransmise, při kterém dochází k uvolňování gliotransmiterů do extracelulárního prostředí, podléhá cirkadiální kontrole. Rytmické oscilace byly pozorovány ve výlevu ATP i glutamátu, což dokazuje cirkadiální charakter astrocyto-neuronální komunikace. Právě glutamátové gliotransmisi byl v této souvislosti přisouzen velmi zajímavý fyziologický význam v podobě účasti na generování a udržování rytmů v hlavním cirkadiálním oscilátoru a potažmo i v celém organismu.

Bylo zjištěno, že zapojení astrocytů do ustanovení cirkadiální rytmicity SCN probíhá zejména během cirkadiální noci. Tehdy astrocyty do extracelulárního prostředí uvolňují velké množství glutamátu, který následně indukuje GABAergní neurotransmisi. V důsledku působení tohoto inhibičního neurotransmiteru dochází k tlumení aktivity SCN neuronů. Během cirkadiálního dne naopak množství extracelulárního glutamátu vlivem snížené míry gliotransmise a zvýšené míry neuronální absorpce značně klesá a aktivita neuronů se zvyšuje. Tato forma noční inhibiční signalizace hraje roli v interní synchronizaci jednotlivých buněčných oscilátorů v SCN, která je nezbytným předpokladem správné funkce SCN. Astrocyty tak významně regulují hlavní cirkadiální oscilátor a jeho chod navíc dokáží zachovat i v nepřítomnosti neuronálních hodin. Díky těmto vlastnostem představují astrocyty klíčové prvky pro fungování cirkadiálního systému.

Vliv astrocytárních hodin je však patrný i v řadě jiných fyziologických procesů, mezi které patří regulace energetického metabolismu nebo délky životnosti. Astrocyty a jejich cirkadiální hodiny, které byly dříve vnímány spíše jako nepříliš podstatná součást našeho cirkadiálního systému, tak bezpochyby vykonávají mnohem důležitější a zajímavější funkce, než by se původně mohlo zdát.

## 6 Seznam literatury

- \*Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1–2), 172–191. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02890-6)
- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J. F., Carmona, M. A., & Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9430–9444. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-21-09430.2002>
- \*Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A. B., Sweger, E. J., Minton, S. K., Taves, S. R., Casper, K. B., Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2008). What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron*, 59(6), 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) and CKI $\delta$  in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1693–1703. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1693-1703.2002>
- \*Alam, J., & Cook, J. L. (1990). Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry*, 188(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90601-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90601-5)
- Andersson, M., Blomstrand, F., & Hanse, E. (2007). Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *Journal of Physiology*, 585(3), 843–852. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142737>
- Araque, A., Li, N., Doyle, R. T., & Haydon, P. G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 666–673. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-02-00666.2000>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 10(6), 2129–2142. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00221.x>
- \*Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M. O., & Schibler, U. (2010). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding. *Cell*, 142(6), 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.016>
- Ashton, R. S., Conway, A., Pangarkar, C., Bergen, J., Lim, K.-I., Shah, P., Bissell, M., & Schaffer, D. V. (2012). Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nature Neuroscience*, 15(10), 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/nn.3212>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8(4), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn1419>

- \*Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell*, 66(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289(5488), 2344–2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Barca-Mayo, O., Boender, A. J., Armirotti, A., & De Pietri Tonelli, D. (2020). Deletion of astrocytic BMAL1 results in metabolic imbalance and shorter lifespan in mice. *Glia*, 68(6), 1131–1147. <https://doi.org/10.1002/glia.23764>
- Beaulé, C., Swannstrom, A., Leone, M. J., & Herzog, E. D. (2009). Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007476>
- \*Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Biber, K., Laurie, D. J., Berthele, A., Sommer, B., Tölle, T. R., Gebicke-Härter, P. J., Van Calker, D., & Boddeke, H. W. G. M. (1999). Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721671.x>
- Brancaccio, M., Edwards, M. D., Patton, A. P., Smyllie, N. J., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2019). Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*, 363(6423), 187–192. <https://doi.org/10.1126/science.aat4104>
- Brancaccio, M., Patton, A. P., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*, 93(6), 1420-1435.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.030>
- \*Brenna, A., & Albrecht, U. (2020). Phosphorylation and Circadian Molecular Timing. *Frontiers in Physiology*, 11(November), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.612510>
- Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology*, 12(18), 1574–1583. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01145-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01145-4)
- \*Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*, 240, 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
- Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J. J., & Sassone-Corsi, P. (2005). Cell biology: Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*, 309(5739), 1390–1394. <https://doi.org/10.1126/science.1110689>
- \*Cermakian, N., Lange, T., Golombek, D., Sarkar, D., Nakao, A., Shibata, S., & Mazzocchi, G. (2013). Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiology International*, 30(7), 870–888. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.782315>

- Cesar, M., & Hamprecht, B. (1995). Immunocytochemical Examination of Neural Rat and Mouse Primary Cultures Using Monoclonal Antibodies Raised Against Pyruvate Carboxylase. *Journal of Neurochemistry*, *64*(5), 2312–2318. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64052312.x>
- Cheng, H.-Y. M., Papp, J. W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J. P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., & Obrietan, K. (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, *54*(5), 813–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.017>
- Choi, H. B., Gordon, G. R. J., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R. L., Martinez, J., Milner, T. A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Tresguerres, M., Levin, L. R., Buck, J., & MacVicar, B. A. (2012). Metabolic Communication between Astrocytes and Neurons via Bicarbonate-Responsive Soluble Adenylyl Cyclase. *Neuron*, *75*(6), 1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.032>
- \*Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 1354–1362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209454200>
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *ELife*, *7*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.32237>
- \*Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, *63*(4), R93–R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>
- Czeisler, C. A., Richardson, G. S., Zimmerman, J. C., Moore-Ede, M. C., & Weitzman, E. D. (1981). Entrainment of human circadian rhythms by light-dark cycles: a reassessment. *Photochemistry and Photobiology*, *34*(2), 239–247. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1981.tb08993.x>
- De la Fuente, S., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2013). Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca<sup>2+</sup>-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*, *54*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.04.001>
- Di Castro, M. A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., & Volterra, A. (2011). Local Ca<sup>2+</sup> detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1276–1284. <https://doi.org/10.1038/nn.2929>
- Duffield, G. E., Best, J. D., Meurers, B. H., Bittner, A., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2002). Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Current Biology*, *12*(7), 551–557. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00765-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00765-0)
- Duhart, J. M., Leone, M. J., Paladino, N., Evans, J. A., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A. J., & Golombek, D. A. (2013). Suprachiasmatic Astrocytes Modulate the Circadian Clock in Response to TNF- $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, *191*(9), 4656–4664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300450>
- \*Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication. *Neuroscience*, *396*, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>
- Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., & Virshup, D. M. (2005). Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI $\epsilon$ -Regulated Proteasome-



- Mediated PER2 Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(7), 2795–2807.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.7.2795-2807.2005>
- Evans, J. A., Suen, T. C., Callif, B. L., Mitchell, A. S., Castanon-Cervantes, O., Baker, K. M., Kloehn, I., Baba, K., Teubner, B. J. W., Ehlen, J. C., Paul, K. N., Bartness, T. J., Tosini, G., Leise, T., & Davidson, A. J. (2015). Shell neurons of the master circadian clock coordinate the phase of tissue clocks throughout the brain and body. *BMC Biology*, 13(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-015-0157-x>
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43(5), 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.011>
- Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2004). Intracellular Astrocyte Calcium Waves In Situ Increase the Frequency of Spontaneous AMPA Receptor Currents in CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(3), 722–732. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2859-03.2004>
- Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2018). Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(1), 3–13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017>
- \*Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102–114.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Fujii, Y., Maekawa, S., & Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13243-0>
- Gamberino, W. C., Berkich, D. A., Lynch, C. J., Xu, B., & LaNoue, K. F. (1997). Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2312–2325. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062312.x>
- 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(5369), 1564–1569. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>
- Golovina, V. A. (2005). Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, 564(3), 737–749.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085035>
- Grundschober, C., Delaunay, F., Pühlhofer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T., & Nef, P. (2001). Circadian Regulation of Diverse Gene Products Revealed by mRNA Expression Profiling of Synchronized Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46751–46758.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107499200>
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), 391–403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>
- Güler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H. W., Barnard, A. R., Cahill, H., Badea, T. C., Zhao, H., Hankins, M. W., Berson, D. M., Lucas, R. J., Yau, K. W., & Hattar, S. (2008).

- Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, 453(7191), 102–105. <https://doi.org/10.1038/nature06829>
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V. L., Charles, A. C., & Kater, S. B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *Journal of Neuroscience*, 19(2), 520–528. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-02-00520.1999>
- \*Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005>
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6473–6477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>
- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O. P., & Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *Journal of Comparative Neurology*, 418(2), 147–155. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000306\)418:2<147::aid-cne2>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000306)418:2<147::aid-cne2>3.0.co;2-%23)
- \*Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2015). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 499. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499>
- \*Harmer, S. L., Panda, S., & Kay, S. A. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(May), 215–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.215>
- Heithoff, B. P., George, K. K., Phares, A. N., Zuidhoek, I. A., Munoz-Ballester, C., & Robel, S. (2021). Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia*, 69(2), 436–472. <https://doi.org/10.1002/glia.23908>
- \*Hertz, L. (2006). Glutamate, a neurotransmitter-And so much more. A synopsis of Wierzbica III. *Neurochemistry International*, 48(6–7), 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.021>
- Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y., & Tei, H. (2004). Temporal Precision in the Mammalian Circadian System: A Reliable Clock from Less Reliable Neurons. *Journal of Biological Rhythms*, 19(1), 35–46. <https://doi.org/10.1177/0748730403260776>
- Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K. I., & Fukada, Y. (2013). FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 152(5), 1106–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.054>
- Hirase, H., Qian, L., Barthó, P., & Buzsáki, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biology*, 2(4), 494–499. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020096>
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., & Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450(7172), 1086–1090. <https://doi.org/10.1038/nature06394>
- Huang, N., Chelliah, Y., Shan, Y., Taylor, C. A., Yoo, S. H., Partch, C., Green, C. B., Zhang, H., & Takahashi, J. S. (2012). Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. *Science*, 337(6091), 189–194. <https://doi.org/10.1126/science.1222804>

- \*Illes, P., Burnstock, G., & Tang, Y. (2019). Astroglia-Derived ATP Modulates CNS Neuronal Circuits. *Trends in Neurosciences*, 42(12), 885–898. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.006>
- Innocenti, B., Parpura, V., & Haydon, P. G. (2000). Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 20(5), 1800–1808. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-05-01800.2000>
- Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), 5962–5966. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5962>
- Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101), 253–257. <https://doi.org/10.1038/325253a0>
- Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., & Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience*, 10(3), 331–339. <https://doi.org/10.1038/nn1849>
- \*Kew, J. N. C., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179(1), 4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 338(6105), 349–354. <https://doi.org/10.1126/science.1226339>
- Kojima, S., Sher-Chen, E. L., & Green, C. B. (2012). Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes and Development*, 26(24), 2724–2736. <https://doi.org/10.1101/gad.208306.112>
- Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., & Fukada, Y. (2015). Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations. *Communicative and Integrative Biology*, 8(4), 1–4. <https://doi.org/10.4161/19420889.2014.982405>
- \*Korf, H.-W., & von Gall, C. (2016). Circadian Physiology. In D. W. Pfaff & N. D. Volkow (Eds.), *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical* (pp. 2203–2239). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3474-4\\_65](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3474-4_65)
- Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T., & Bacskai, B. J. (2009). Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. *Science*, 323(5918), 1211–1215. <https://doi.org/10.1126/science.1169096>
- Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2011). Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *Journal of Neuroscience*, 31(7), 2607–2614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5319-10.2011>
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4)
- \*Lalo, U., Pankratov, Y., Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2011). Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: What is the role of “excitable” molecules in non-excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5), 992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.007>

- Landgraf, D., Wang, L. L., Diemer, T., & Welsh, D. K. (2016). NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genetics*, *12*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005882>
- Lavialle, M., & Servière, J. (1993). Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*, *4*(11), 1243–1246. <https://doi.org/10.1097/00001756-199309000-00008>
- Lee, B., Aiqing Li, Hansen, K. F., Ruifeng Cao, Jae Hwa Yoon, & Obrietan, K. (2010). CREB influences timing and entrainment of the SCN circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, *25*(6), 410–420. <https://doi.org/10.1177/0748730410381229>
- Lehman, M. N., Silver, R., Gladstone, W. R., Kahn, R. M., Gibson, M., & Bittman, E. L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience*, *7*(6), 1626–1638. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-06-01626.1987>
- Leone, M. J., Beaulé, C., Marpegan, L., Simon, T., Herzog, E. D., & Golombek, D. A. (2015). Glial and light-dependent glutamate metabolism in the suprachiasmatic nuclei. *Chronobiology International*, *32*(4), 573–578. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1006328>
- Leone, M. J., Marpegan, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A., & Golombek, D. A. (2006). Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *Journal of Neuroscience Research*, *84*(7), 1521–1527. <https://doi.org/10.1002/jnr.21042>
- \*Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca<sup>2+</sup> waves: Mechanisms and function. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1359–1392. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2011>
- Li, H., Zhang, S., Zhang, W., Chen, S., Rabearivony, A., Shi, Y., Liu, J., Corton, C. J., & Liu, C. (2020). Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness. *BMC Genomics*, *21*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6639-4>
- Liu, Q. S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., & Nedergaard, M. (2004). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3172–3177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306731101>
- Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, *288*(5465), 483–491. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.483>
- \*Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *5*(47), 407–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
- Marpegan, L., Krall, T. J., & Herzog, E. D. (2009). Vasoactive intestinal polypeptide entrains circadian rhythms in astrocytes. *Journal of Biological Rhythms*, *24*(2), 135–143. <https://doi.org/10.1177/0748730409332042>
- Marpegan, L., Swanstrom, A. E., Chung, K., Simon, T., Haydon, P. G., Khan, S. K., Liu, A. C., Herzog, E. D., & Beaulé, C. (2011). Circadian regulation of ATP release in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *31*(23), 8342–8350. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6537-10.2011>
- Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L. M., Zhao, Z., Martin, E. D., Aguilar, J., Benneyworth, M. A., Marsicano, G., & Araque, A. (2017). Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related

- behavior. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1540–1548. <https://doi.org/10.1038/nn.4649>
- McGlinchy, N. J., Valomon, A., Chesham, J. E., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Ule, J. (2012). Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues. *Genome Biology*, 13(6), R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r54>
- \*Meijer, J. H., & Schwartz, W. J. (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 235–249. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003006>
- Michel, S., Itri, J., Han, J. H., Gniotczynski, K., & Colwell, C. S. (2006). Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC Neuroscience*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-15>
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., & Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes and Development*, 15(8), 995–1006. <https://doi.org/10.1101/gad.873501>
- \*Montana, V., Malarkey, E. B., Verderio, C., Matteoli, M., & Parpura, V. (2006). Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, 54(7), 700–715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.20367>
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X., & Parpura, V. (2004). Vesicular Glutamate Transporter-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 24(11), 2633–2642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3770-03.2004>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 146(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.901460102>
- \*Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>
- Moreau, B., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2006). Biphasic Regulation of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake by Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Concentration. *Current Biology*, 16(16), 1672–1677. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.059>
- \*Mukhopadhyay, D., & Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 315(5809), 201–205. <https://doi.org/10.1126/science.1127085>
- Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 263(5154), 1768–1771. <https://doi.org/10.1126/science.8134839>
- Norenberg, M. D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 27(3), 756–762. <https://doi.org/10.1177/27.3.39099>
- Okubo, Y., Iino, M., & Hirose, K. (2020). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-dependent Ca<sup>2+</sup> refilling in the endoplasmic reticulum in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.006>

- 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)
- Pangršič, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E., Khiroug, L., Giniatullin, R., & Zorec, R. (2007). Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(39), 28749–28758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700290200>
- \*Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, *36*(7), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- Parnis, J., Montana, V., Delgado-Martinez, I., Matyash, V., Parpura, V., Kettenmann, H., Sekler, I., & Nolte, C. (2013). Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role in the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *33*(17), 7206–7219. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5721-12.2013>
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., & Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, *369*(6483), 744–747. <https://doi.org/10.1038/369744a0>
- \*Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*, *63*(1–2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008>
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., & Haydon, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, *310*(5745), 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1116916>
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: A highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*, *17*(20), 7817–7830. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-20-07817.1997>
- \*Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, *32*(8), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Prolo, L. M., Takahashi, J. S., & Herzog, E. D. (2005). Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *25*(2), 404–408. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4133-04.2005>
- Prosser, R. A., Edgar, D. M., Craig Heller, H., & Miller, J. D. (1994). A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Research*, *643*(1–2), 296–301. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90036-1)
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, *247*(4945), 975–978. <https://doi.org/10.1126/science.2305266>

- Ralph, M. R., & Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241(4870), 1225–1227. <https://doi.org/10.1126/science.3413487>
- Ripperger, J. A., & Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nature Genetics*, 38(3), 369–374. <https://doi.org/10.1038/ng1738>
- \*Rose, C. R., Ziemens, D., & Verkhratsky, A. (2020). On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na<sup>+</sup>-transients into intracellular Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell calcium*, 86, 102154. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102154>
- Rosensweig, C., Reynolds, K. A., Gao, P., Laothamatas, I., Shan, Y., Ranganathan, R., Takahashi, J. S., & Green, C. B. (2018). An evolutionary hotspot defines functional differences between CRYPTOCHROMES. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03503-6>
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., & Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16(3), 675–686. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80086-0)
- Santos, J. W. Q., Araújo, J. F., Cunha, M. J. B., Costa, S. O., Barbosa, A. L. C., Mesquita, J. B., & Costa, M. S. M. O. (2005). Circadian variation in GFAP immunoreactivity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biological Rhythm Research*, 36(1–2), 141–150. <https://doi.org/10.1080/09291010400028906>
- Sato, T. K., Yamada, R. G., Ukai, H., Baggs, J. E., Miraglia, L. J., Kobayashi, T. J., Welsh, D. K., Kay, S. A., Ueda, H. R., & Hogenesch, J. B. (2006). Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nature Genetics*, 38(3), 312–319. <https://doi.org/10.1038/ng1745>
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5683–5686. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800141105>
- \*Scofield, M. D. (2018). Exploring the Role of Astroglial Glutamate Release and Association With Synapses in Neuronal Function and Behavior. *Biological Psychiatry*, 84(11), 778–786. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.029>
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., & Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, 91(7), 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8)
- \*Sofroniew, M. V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a020420–a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- 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>

- Swanson, R. A., & Graham, S. H. (1994). Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Research*, 664(1–2), 94–100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91958-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91958-5)
- Theparambil, S. M., Hosford, P. S., Ruminot, I., Kopach, O., Reynolds, J. R., Sandoval, P. Y., Rusakov, D. A., Barros, L. F., & Gourine, A. V. (2020). Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. *Nature Communications*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18756-3>
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7728–7733. <https://doi.org/10.1073/pnas.102075599>
- Tsai, H. H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A. T., Fancy, S. P. J., Merkle, F., Kessaris, N., Alvarez-Buylla, A., Richardson, W. D., & Rowitch, D. H. (2012). Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science*, 337(6092), 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1222381>
- Tsuchiya, Y., Akashi, M., & Nishida, E. (2003). Temperature compensation and temperature resetting of circadian rhythms in mammalian cultured fibroblasts. *Genes to Cells*, 8(8), 713–720. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00669.x>
- Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., & Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics*, 37(2), 187–192. <https://doi.org/10.1038/ng1504>
- \*Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.-H., & Virshup, D. M. (2000). Nuclear Entry of the Circadian Regulator mPER1 Is Controlled by Mammalian Casein Kinase I  $\epsilon$ . *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4888–4899. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.13.4888-4899.2000>
- Vujović, N., Davidson, A. J., & Menaker, M. (2008). Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 295(1), 355–360. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2007>
- \*Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2009). Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72, 551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Womac, A. D., Burkeen, J. F., Neuendorff, N., Earnest, D. J., & Zoran, M. J. (2009). Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 30(5), 869–876. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06874.x>
- Yagita, K., Yamanaka, I., Emoto, N., Kawakami, K., & Shimada, S. (2010). Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC biotechnology*, 10, 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-3>



- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003). Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science*, *302*(5649), 1408–1412. <https://doi.org/10.1126/science.1089287>
- Yamajuku, D., Shibata, Y., Kitazawa, M., Katakura, T., Urata, H., Kojima, T., Takayasu, S., Nakata, O., & Hashimoto, S. (2011). Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Letters*, *585*(14), 2217–2222. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.038>
- 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>
- Yoo, S. H., Mohawk, J. A., Siepk, S. M., Shan, Y., Huh, S. K., Hong, H. K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Chen, Z. J., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2013). Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*, *152*(5), 1091–1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055>
- 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>
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S., & Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature Cell Biology*, *9*(8), 945–953. <https://doi.org/10.1038/ncb1620>