

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Lucie Turečková

**Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s fenotypem
vyhraněného chronotypu**

**Association of selected polymorphisms with clock genes with a
extreme chronotypes**

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Roman Šolc, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 11.8. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce paní doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za cenné rady, ochotu, trpělivost a podporu při vypracovávání této práce. Stejně tak děkuji mému konzultantovi RNDr. Romanovi Šolcovi, Ph.D. za vhodné připomínky, řádné vedení a zaškolení během prováděných experimentů a výpomoc se statistickým zpracováním. Ráda bych poděkovala i paní RNDr. Štěpánce Hrdé, Ph.D. z laboratoře sekvenací DNA za její ochotu a užitečné rady. Děkuji i mé rodině a příteli za jejich podporu. Závěrem bych ráda poděkovala všem zúčastněným dobrovolníkům, bez kterých by tato diplomová práce nebyla zrealizována.

Abstrakt:

Cirkadiánní systém se u organismů vyvinul jako adaptace na periodické změny prostředí. Jeho úlohou je zajistit pravidelnou synchronizaci mezi solárním cyklem a vnitřní periodou organismu, a generovat signály, kterými jsou synchronizovány behaviorální a fyziologické procesy v těle se solárním cyklem. Celý mechanismus probíhá na úrovni buňky, kde dochází k pravidelným oscilacím transkripčně translačních smyček hodinových genů během 24 hodin, čímž je zajištěn pravidelný rytmus organismu. Cirkadiánní systém však u lidí nemusí generovat stejně dlouhou periodu a může se lišit v míře synchronizace s vnějším cyklem. V důsledku toho dochází ke vzniku tzv. individuálních časových preferencí. Tyto odlišné preference se označují jako chronotypy, které se dělí do pěti kategorií: extrémně večerní, mírně večerní, nevyhraněný, mírně ranní a extrémně ranní typ. Za jednu z možných příčin těchto odlišností jsou považovány polymorfismy hodinových genů. Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s extrémními chronotypy je předmětem této diplomové práce. Od dobrovolníků s extrémními chronotypy jsme získali vzorek slin pro izolaci DNA. Využitím molekulárních metod PCR, restriční štěpení a sekvenace jsme provedli genotypizaci vybraných polymorfismů hodinových genů *Bmal1*, *Clock*, *Per2* a *Per3*. Statistické a korelační analýzy ukázaly, že u polymorfismu genu *Clock* (T3111C) asociuje alela C s ranním chronotypem. Naše výsledky také naznačují, že kombinace haplotypů s polymorfismem genu *Clock* je ovlivněna zjištěnou asociací alely C a ranního chronotypu. S ranním chronotypem také asociuje kombinace genotypů „(AG + AA)/(55 + 45)“ haplotypu *Bmal1/Per3*. Naše práce významně rozšiřuje poznatky jiných laboratoří a potvrzuje předpoklad, že cirkadiánní fenotyp člověka není dán jednoduchou změnou v proteinové struktuře danou jedním polymorfismem, ale je nejspíše formován specifickým vzorcem provázaných polymorfismů hodinových genů.

Klíčová slova: cirkadiánní systém, chronotypy, polymorfismus, hodinové geny

Abstract:

The circadian system has evolved in organisms as an adaptation to periodic changes in the environment. Its task is to ensure regular entrainment between the solar cycle and the internal period of the organism, and to generate signals that synchronize behavioral and physiological processes in the body with the solar cycle. The whole mechanism takes place at the cell level, where there are regular oscillations of the transcriptional translation loops of the clock genes occur within 24 hours, thus ensuring a regular rhythm of the organism. However, the circadian system may not generate the same length of period in humans and may differ in the degree of entrainment with the external cycle. Based on that there are developed so-called individual time preferences. These different preferences are referred to as chronotypes, which fall into five categories: extremely evening, moderate evening, intermediate, moderate morning, and extremely morning type. Clock gene polymorphisms are considered to be one of the possible causes of these differences. The association of selected clock gene polymorphisms with extreme chronotypes is the subject of this diploma thesis. We obtained a saliva sample for DNA isolation from volunteers with extreme chronotypes. Using molecular methods of PCR, restriction digest and sequencing, we genotyped selected polymorphisms of the clock genes *Bmal1*, *Clock*, *Per2* and *Per3*. Statistical and correlation analyzes showed that in the *Clock* (T3111C) polymorphism, the C allele associates with the morning chronotype. Our results also suggest that the combination of haplotypes with the *Clock* gene polymorphism is affected by the observed association between the C allele and the morning chronotype. The combination "(AG + AA) / (55 + 45)" of the *Bmal1/Per3* haplotype also associates with the morning chronotype. Our work significantly expands the knowledge of other laboratories and confirms the assumption that the circadian phenotype of humans is not given by a simple change in protein structure given by a single polymorphism, but is most likely formed by a specific pattern of linked clock gene polymorphisms.

Keywords: circadian system, chronotypes, polymorphism, clock genes

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	1
2. ÚVOD	3
3. LITERÁLNÍ PŘEHLED	4
3.1. Cirkadiánní systém	4
3.2. Molekulární hodiny cirkadiánního systému	5
3.3. Struktura a dráhy suprachiasmatických jader	8
3.4. Lidské chronotypy a polymorfismy hodinových genů	9
3.4.1. Chronotypy a jejich měření	9
3.4.2. Rozložení a charakteristika chronotypů	9
3.4.3. Exprese hodinových genů během 24 hodin a rozdíl u chronotypů	11
3.4.4. Polymorfismy hodinových genů u extrémních chronotypů	12
3.4.4.1. Polymorfismus v genu <i>Per3</i>	13
3.4.4.2. Jedno-nukleotidové polymorfismy (SNP)	14
3.4.4.3. Vzájemná provázanost jednotlivých polymorfismů	15
4. CÍLE PRÁCE	16
5. POUŽITÉ METODY A VYBAVENÍ	16
5.1. Validovaný dotazník, respondenti a odběr vzorků slin	16
5.2. Izolace DNA	17
5.3. Výběr polymorfismů	18
5.4. Polymerázová řetězová reakce	18
5.6. Určení délky sekvence genu <i>Per3</i>	20
5.7. Restrikční štěpení a určení sekvence genu <i>Clock</i>	21
5.8. Sekvenační metody pro určení sekvencí u genů <i>Per2</i> a <i>Bmall</i>	22
5.9. Statistické metody	24
6. VÝSLEDKY	25
6.1. Stanovení chronotypů a distribuce participantů	25
6.2. Vyhodnocení zastoupení jednotlivých polymorfismů ve skupinách ranních a večerních typů.	26
6.2.1. SNP T3111C genu <i>Clock</i>	27
6.2.2. VNTR polymorfismus genu <i>Per3</i>	29
6.2.3. SNP C111G genu <i>Per2</i>	31
6.2.4. SNP A-1420G genu <i>Bmall</i>	32
6.3. Analýza vztahu mezi provázanými polymorfismy na úrovni dvojic s ranním či večerním chronotypem	34
6.3.1. Kombinace <i>Clock</i> – <i>Bmall</i>	35
6.3.2. Kombinace <i>Clock</i> – <i>Per2</i>	39
6.3.3. Kombinace <i>Clock</i> – <i>Per3</i>	42
6.3.4. Kombinace <i>Per3</i> – <i>Bmall</i>	46
6.3.5. Kombinace <i>Per2</i> – <i>Bmall</i>	50
6.3.6. Kombinace <i>Per2</i> – <i>Per3</i>	52
7. DISKUSE	55
8. ZÁVĚR	60
9. POUŽITÁ LITERATURA	61
10. PŘÍLOHY	72

1. SEZNAM ZKRATEK

4R = 4x opakující se (z angl. 4-repeat)

5R = 5x opakující se (z angl. 5-repeat)

A = adenin

AMPK = AMP-aktivovaná protein kináza

β -TrCP = β -transducin repeat containing protein

bHLH = basic helix-loop-helix

Bmal1 = Brain and Muscle ARNT-Like 1

C = cytosin

CCG = hodinami kontrolované geny (z ang. clock control genes)

CK1 ϵ/δ = kasein kináza 1 ϵ/δ

Clock = Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

Cry 1/2 = Cryptochrome 1/2

dmSCN = dorsomediální suprachiasmatická jádra

DSPS = syndrom opožděné fáze spánku (z angl. delayed-sleep-phase syndrome)

E-box = Enhancer box

FBXL3 = F-box like E3 ligáza

FBXL21 = F-box like E21 ligáza

G = guanin

GABA = kyselina γ -aminomáselná

MCTQ = Munich Chronotype Questionnaire

MEQ = Morningness Eveningness Questionnaire

Nr2d1 = Nuclear Receptor Subfamily 2 Group D Member 1

PCR = polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)

Per 1/2/3 = Period 1/2/3

Ror α = Retinoic acid receptor-related orphan receptor α

RTH = retinohypothalamický trakt

SNP = jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)

SCN = suprachiasmatická jádra

T = thymin

UTR = nepřekládaná oblast (z angl. untranslated region)

VIP = vazointestiální peptid

vlSCN = ventrolaterální suprachiasmatická jádra

VNTR = variabilní počet tandemových repetitiv (z angl. „Variable Number of Tandem Repeat polymorphism“)

2. ÚVOD

Cirkadiánní systém je endogenní mechanismus, který se u organismů vyvinul jako adaptace na variabilitu vnějšího prostředí, zejména na střídání světla a tmy. Zajišťuje pravidelnou synchronizaci fází mezi vnější periodou prostředí a vnitřní časovou periodou organismu. Podstata cirkadiánního systému je tvořena zejména na molekulární úrovni, a to interakcí transkripčně translačních zpětnovazebných smyček hodinových genů, vyskytujících se téměř ve všech tkáních a orgánech. Hodinové geny jsou zodpovědné za expresi tzv. hodinami kontrolovaných genů (CCG z angl. clock control genes), které regulují tkáňové funkce buď v buňkách samotných, nebo generují signál šířený ven z buňky. Centrální strukturou cirkadiánního systému jsou suprachiasmatická hypothalamická jádra (SCN), odkud je generován seřizovací signál nesoucí informaci o denní době.

Mezi lidmi existují výrazné rozdíly v tzv. diurnálních preferencích, což jsou preference vhodné doby pro různé aktivity dle přirozeného vnitřního nastavení. Rozdíly v tomto vnitřním nastavení jsou zodpovědné za vznik různých cirkadiánních fenotypů neboli chronotypů. Chronotypy se rozdělují do pěti kategorií definovaných na základě subjektivních dotazníků sestavených Hornem a Östbergem („Morningness Eveningness Questionnaire“ = MEQ) a Roennebergem („Munich Chronotype Questionnaire“ = MCTQ).

Významnou skupinou v populaci jsou extrémní chronotypy, ať už ranní či večerní. U osob s extrémním chronotypem se předpokládá, že jejich diurnální preference mají příčinnou souvislost s tzv. polymorfismy hodinových genů. Jejich přesný vliv na vznik chronotypů však stále není zcela objasněn.

V této diplomové práci jsme se pokusili genotypizovat vybrané polymorfismy v hodinových genech *Bmal1*, *Clock*, *Per2* a *Per3* u osob s extrémním chronotypem (určeným dotazníkem MEQ) v české populaci. Se získanými daty jsme provedli statistickou analýzu a polymorfismy jsme analyzovali jako provázané haplotypy.

3. LITERÁLNÍ PŘEHLED

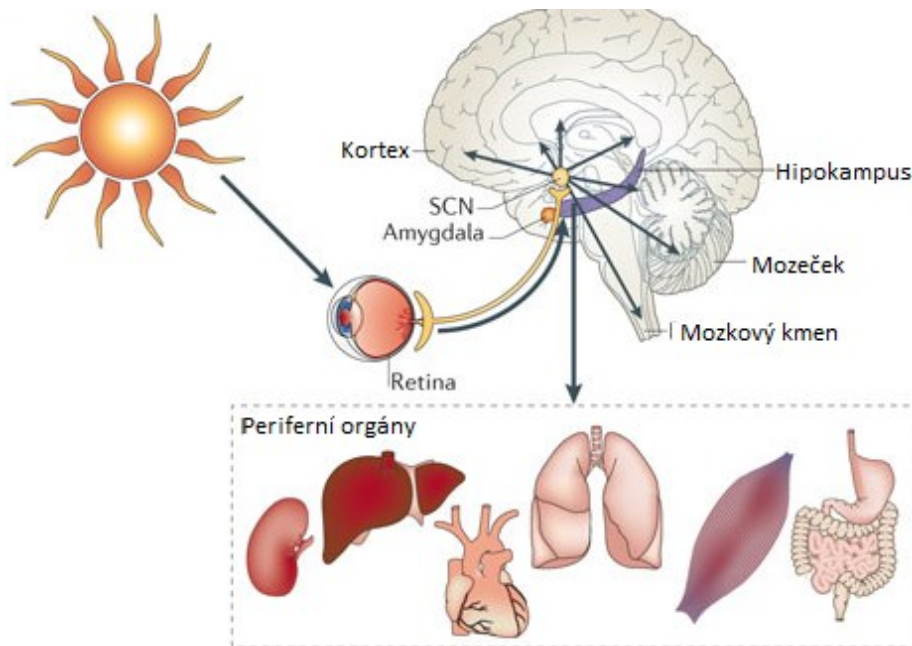
3.1. Cirkadiánní systém

Fakt, že se planeta Země pravidelně otáčí kolem své osy, je znám již od 17. století. Tento jev přináší cyklické změny prostředí, kterým se musely přizpůsobit všechny organismy na Zemi. Jako evoluční adaptace na tuto skutečnost se u nich vyvinul mechanismus měřící čas, reagující na pravidelné změny v prostředí během 24 hodin. Tyto hodiny mají svou vlastní vnitřní periodu, která je pravidelně synchronizována s vnějšími periodickými ději. Mezi takové děje řadíme zejména střídání světla a tmy během dne a noci, dále dostupnost potravy či pohybovou aktivitu. Perioda cyklu generovaná tímto mechanismem trvá přibližně den, proto dostal název cirkadiánní systém ze slov „Circa dies“ = „přibližně den“ (Morris et al., 2012). V neměnném prostředí bez vnějších inputů běží u člověka aktivita cirkadiánního systému volně s vnitřní periodou *tau*, která je cca 24,5 hodin (Burgess a Eastman, 2008; Sack et al., 1992). Světlo má však silný synchronizační účinek, proto je u člověka tato perioda seřízena na 24 hodin (Wright et al., 2001).

Struktura, která je centrem cirkadiánního systému, se nazývá SCN. Tato jádra jsou lokalizována v místě křížení optického chiasmatu ve ventrálním hypothalamu (Stephan a Zucker, 1972; Moore a Lenn, 1972). SCN mají funkci "pacemakeru". Generují vnitřní rytmus a srovnávají jeho periodu a fázi s časem vnějšího prostředí. O vnější periodě jsou SCN pravidelně informována skrze retinohypothalamický trakt (RTH) vedoucí z retiny oka do SCN (Johnson et al., 1988; Moore a Lenn, 1972). Integrované informace pak SCN předává do organismu a udává jeho tempo (Stephan a Zucker, 1972). Tyto vnitřní hodiny seřizují pravidelný rytmus spánku a bdění, změny teploty (Tsuchiya et al., 2003), imunitní systém (Keller et al., 2009), metabolické procesy (Panda et al., 2002), či produkci hormonů (Moore a Eichler, 1972).

SCN posílají výstupní synchronizační signál do periferních struktur (obr. 1), které mají svoje vlastní buněčné cirkadiánní oscilátory. Tyto oscilátory generují svůj vnitřní časový signál, regulující například metabolismus, či imunitní procesy. Mezi tyto struktury patří například: játra, plíce (Stokkan et al., 2001), buňky bukálních sliznic (Nováková et al., 2013), srdce (Storch et al., 2002), mozkové struktury (Green a Gillette, 1982), svaly (Yamazaki et al., 2000) a další. SCN tedy tímto mechanismem synchronizuje všechny fyziologické procesy se solárním cyklem. Poruchy synchronizace tohoto endogenního oscilátoru vedou

k poruchám spánku, psychiatrickým onemocněním, obezitě, diabetu nebo dokonce k rakovině (Wang et al., 2011).



Obrázek 1: Znárodnění projekce centrálního oscilátoru (SCN) k periferním oscilátorům (srdce, játra, okolní mozkové struktury a další struktury). Centrální hodiny přijímají informaci o denní době prostřednictvím RTH (černá šipka z retiny do SCN). Kromě světelné informace mohou být periferní orgány seřizovány pravidelným příjmem potravy, změnami v tělesné teplotě či pohybové aktivitě (převzato a upraveno z Kondratova a Kondratov, 2012).

3.2. Molekulární hodiny cirkadiálního systému

Hlavní podstatou cirkadiálního systému je synchronizovaná provázanost hlavních a vedlejších autoregulačních transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček (obr. 2). Díky jejich propojení a načasování je zajištěna pravidelná oscilace v expresi tzv. hodinových genů a jejich proteinů, které jsou zodpovědné za generování rytmického signálu.

Hlavní smyčka je zahájena expresí genů *Brain and Muscle ARNT-Like 1 (Bmal1)* a *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock)* v jádře. Po translaci v cytoplazmě tvoří jejich proteiny heterodimerní komplex BMAL1:CLOCK, jejich interakce je zprostředkována pomocí PAS domény. Heterodimer se následně vrací do jádra, kde má roli transkripčního faktoru. Pomocí domény bHLH (basic helix-loop-helix) se váže v promotorové oblasti na tzv. Enhancer box (E-box) genů *Period (Per1/2/3)* a *Cryptochrome (Cry1/2)*, čímž je zahájena jejich transkripce (Gekakis et al., 1998; Kume et al., 1999).

Po jejich translaci se k proteinu PER váže v cytoplazmě kasein kináza 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ), která ho fosforyluje, a společně s proteinem CRY se tento komplex translokuje do jádra, kde má represivní funkci. Inhibičně působí na heterodimer BMAL1:CLOCK, čímž potlačují i svou vlastní expresi (Akashi et al., 2002; Takano et al., 2000).

Tato primární smyčka je ovlivňována smyčkou sekundární, která je zahájena nasednutím heterodimeru BMAL1:CLOCK na E-box genů *Rev-erba* a „*Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (Rora)*“, tím je spuštěna jejich transkripce. Po jejich translaci jsou proteiny REV-ERBa a ROR α přesunuty do jádra, REV-ERBa zde působí jako represor (Preitner et al., 2002), ROR α jako aktivátor transkripce genu *Bmal1*. Tyto transkripční faktory kompetují o navázání na RORE sekvenci v promotoru (Akashi a Takumi, 2005; Sato et al., 2004). Této kompetice se účastní i protein nově objeveného genu *Chrono*, který působí jako represor (Annayev et al., 2014; Anafi et al., 2014; Goriki et al., 2014).

Molekulární mechanismus generování cirkadiálních oscilací probíhá v každé jaderné buňce. Signál indukovaný smyčkami v buněčných pacemakerech je šířen díky CCG. Tyto geny nesou sekvenci kódující E-box nebo RORE ve svém promotoru. Tím je zajišťována jejich pravidelná transkripce po nasednutí heterodimeru BMAL1:CLOCK (Jin et al., 1999; Welsh et al., 1995; Miyamoto a Sancar, 1999).

Perioda těchto oscilací trvá přibližně 24 hodin a je udržována a pravidelně seřizována díky posttranslačním modifikacím, mezi které patří zejména histonové acetylace, fosforylace a s tím spojená ubiquitinace.

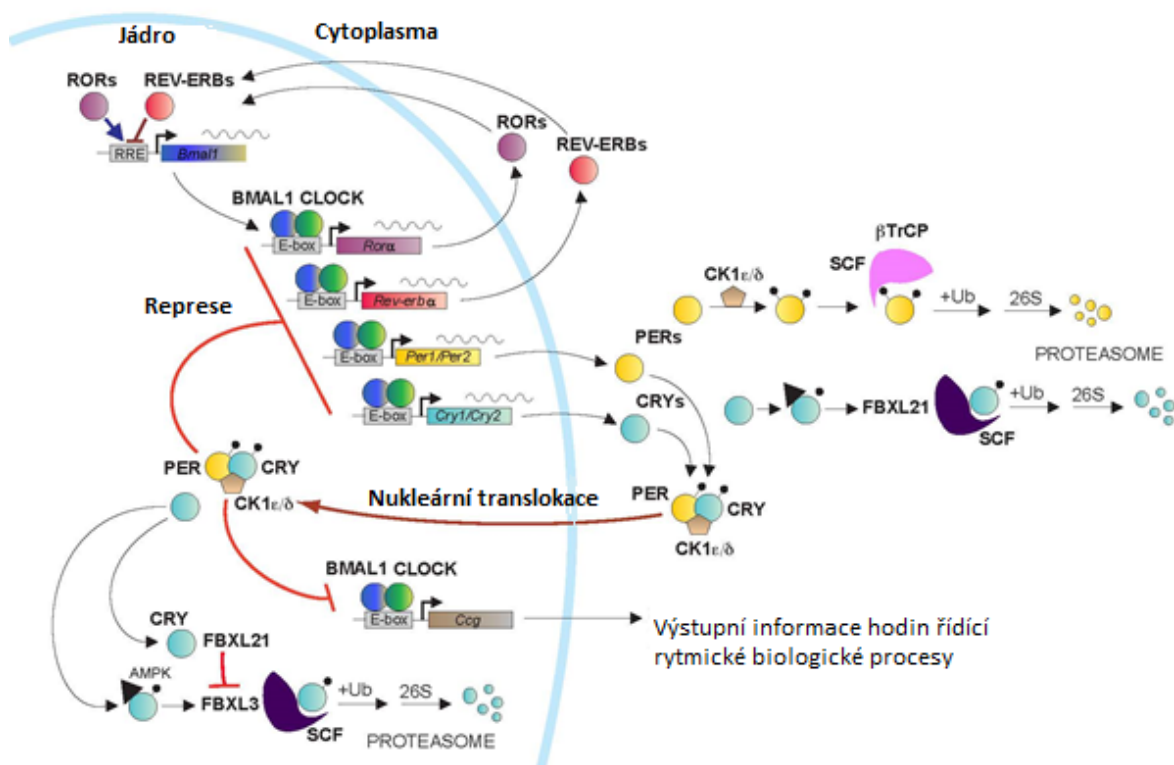
Rytmičné histonové acetylace způsobují chromatinové remodelace a napomáhají tak k intenzivnější transkripční aktivitě. Dochází k nim na histonech H3 a H4 v promotorech hodinových genů *Per1/2* a *Cry*, pomocí histonacetyláz (Etchegaray et al., 2003).

Protein CLOCK vykazuje svou vlastní histon-acetyl transferázovou aktivitu. Díky acetylaci histonů se uvolní pevná vazba v DNA, která se tak stává přístupnější pro vazbu transkripčního faktoru BMAL1:CLOCK do promotorové oblasti (Doi et al., 2006).

CK1 ϵ/δ fosforyluje PER na CK1 vazebné doméně, čímž je umožněna jeho translokace do jádra, a na doméně, kam se po fosforylaci váže ubiquitin ligáza β -TrCP (β -transducin repeat containing protein), která zprostředkovává proteazomální degradaci PER v cytoplazmě. To vede ke snížení inhibiční aktivity PER:CRY v jádře (Shirogane et al., 2005; Reischl et al., 2007; Ohsaki et al., 2008). Aktivita CK1 ϵ/δ zajišťuje pravidelnou oscilaci molekulárních hodin a je zodpovědná za jejich zrychlení či zpoždování (Meng et al., 2008). Mutace v genu pro CK1 ϵ je zodpovědná za zkrácení cirkadiální periody (Lowrey et al., 2000).

Protein CRY je v jádře i v cytoplasmě fosforylován AMP-aktivovanou protein kinázou (AMPK) (Lamia et al., 2009). Fosforylovaný protein CRY je určen k ubiquitinaci F-box like E3 ligázou (FBXL3) a následné degradaci. Ubiquitinace může být potlačena homologní F-box like E21 ligázou (FBXL21), která protein CRY v jádře stabilizuje. V cytoplasmě se ale chová FBXL21 odlišně a jejím působením je CRY označen k ubiquitinaci a degradaci v proteozomu (Siepková et al., 2007; Hirano et al., 2013; Busino et al., 2007).

Délka těchto endogenních oscilačních cyklů se může u jednotlivců lišit, proto se v lidské populaci vyskytují ranní a večerní chronotypy, jak bude popsáno v kapitole 3.4.



Obrázek 2: Schéma znázorňuje interakce pozitivních a negativních zpětnovazebných transkripčně – translačních smyček u savců. Proteiny BMAL1 a CLOCK tvoří heterodimer, který v jádře působí jako transkripční faktor zahajující transkripci genů Per a Cry, jejichž proteiny tvoří komplex společně s CK1 ε/δ, který se translokuje do jádra. Jeho úlohou je inhibice heterodimeru BMAL1:CLOCK, čímž je potlačena exprese genů Per a Cry. Heterodimer BMAL1:CLOCK zahajuje transkripci také u genů Rora a Rev-erba. Jejich do jádra translokované proteiny mají úlohu aktivátoru a represoru. Komplex BMAL1:CLOCK aktivuje a PER:CRY potlačuje transkripce tzv. hodinami řízených genů (CCG), které ovlivňují rytmické biologické procesy v buňkách celého organismu (převzato a upraveno z Ko a Takahashi, 2006).

3.3. Struktura a dráhy suprachiasmatických jader

Suprachiasmatická jádra jsou bilaterální párový orgán, který je uložen v místě křížení zrakových nervů ve ventrálním hypothalamu. SCN jsou tvořena dvěma částmi: ventrolaterální = „core“ (vlSCN) a dorsomediální = „shell“ (dmSCN) (Ibata et al. 1999). U lidí obsahují SCN kolem padesáti tisíc neuronů zodpovědných za generování autonomního endogenního signálu (Morris et al., 2012).

Vzájemná synchronizace obou částí SCN je udržována díky neurotransmiteru vazointestiálnímu peptidu (VIP), který je produkován ve vlSCN a je periodicky vyléván do celého SCN (Welsh et al., 1995). Dále je v části vlSCN produkován gastrin-releasing peptid a v části dmSCN se tvoří arginin vazopresin (van den Pol a Tsujimoto, 1985; van den Pol a Gorcs, 1986). Ve všech neuronech SCN je syntetizován inhibiční neurotransmitter kyselina γ -aminomáselná (GABA) (Abrahamson, 2001; Moore a Speh, 1993).

Do SCN jsou vedeny jednak informace z okolních oblastí mozku, a jednak dráhy ze sítnice oka zodpovědné za synchronizaci SCN s vnějším prostředím. Do dmSCN vedou inputy z hypothalamu, limbického systému a z paraventriculárních thalamických jader (Moga a Moore, 1997).

Fotosenzitivní gangliové buňky retiny obsahující fotopigment melanopsin vnímají intenzitu difúzního osvětlení (Gooley et al. 2001). Transdukovaná světelná informace je vedena přímou monosynaptickou glutamatergní dráhou, RHT, z oka do vlSCN (Moore a Lenn, 1972; Shirakawa a Moore, 1994).

Druhou dráhou vedoucí světelnou informaci je nepřímá dráha, která projikuje z oka do intergenikulárních lístků v thalamu. Ty vyšlou transdukovaný světelný signál pomocí neurotransmiteru neuropeptid Y přes genikulohypothalamický trakt do SCN (Moga a Moore, 1997; Harrington et al., 1985).

Třetí dráha, která projikuje do vlSCN, informuje o nesvětelných synchronizačních podnětech, které jsou transdukovány ve středním mozku. Do vlSCN se tato informace dostává serotonergní dráhou z rapheálních jader (Moore et al., 1978; Azmitia a Segal, 1978).

Projekce do SCN je zpracovaná ve vlSCN a předána do dmSCN. Z dmSCN vystupují eferentní dráhy do dalších struktur, jakými jsou například: periaquaduktální šed', subparaventriculární zóna, mediální preoptická area, dorzomediální hypothalamická jádra, paraventriculární hypothalamická a thalamická jádra a další. Signál je také humorálně veden až k periferním oscilátorům, které jsou tímto způsobem pravidelně informovány a zároveň

synchronizovány signálem generovaným v SCN (Moga a Moore, 1997; Gooley a Saper, 2005).

3.4. Lidské chronotypy a polymorfismy hodinových genů

Člověk má svou aktivní fázi ve dne a klidovou v noci. Přesto je načasování hodin vysoce individuálně variabilní a mezi jednotlivci jsou různé časové preference doby probouzení a uléhání ke spánku. Tyto rozdíly charakterizují cirkadiánní fenotyp neboli chronotyp jedince. Vlastní chronotyp koreluje s délkou vnitřní individuální periody *tau*, která je ovlivněna několika faktory (Brown et al., 2008). Mezi ně se řadí věk či pohlaví (Lehnkering a Siegmund, 2007), významným faktorem jsou však polymorfismy hodinových genů. Právě jejich rozdíly mohou stát za vznikem odlišných chronotypů (Katzenberg et al., 1998).

3.4.1. Chronotypy a jejich měření

Základní dělení chronotypů je na ranní, nevyhraněný a večerní. Od počátků studia rozdílných časových preferencí, které charakterizují jednotlivé chronotypy, je zavedeno měření tzv. cirkadiánních markerů – měnící se tělesné teploty a příjmu potravy u ranních a večerních typů (Östberg, 1973). Dalším markerem, kterého se pro studium chronotypů využívá, je měření rytmů v hladinách hormonů melatoninu a kortizolu, kdy hladina kortizolu je vysoká v subjektivním dni, melatoninu v subjektivní noci. Pro měření chronotypů lze využít i aktigrafu nebo řádné vedení subjektivního spánkového deníku.

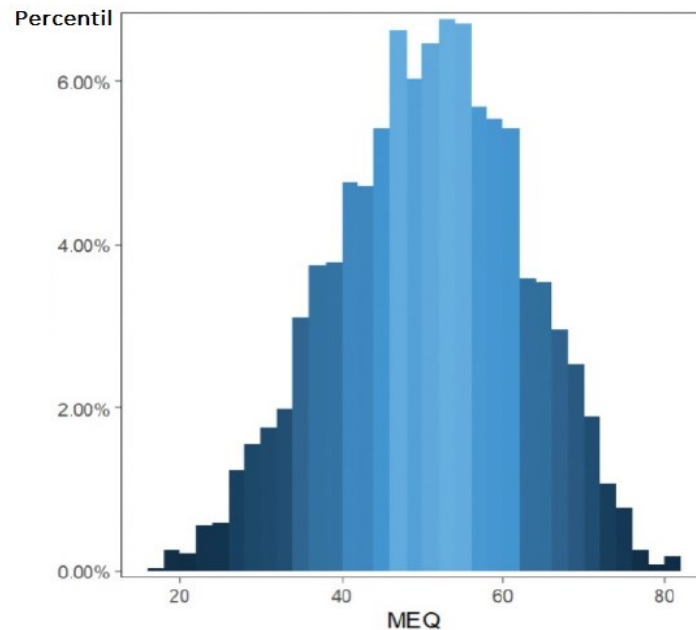
Významným přínosem pro studium chronotypů bylo sestavení standardizovaných dotazníků založených na subjektivním hodnocení spánkových a denních návyků, a to jak během pracovních, tak volných dní. Starším a častěji používanějším je Hornův a Ostbergův MEQ. Subjekt zde hodnotí své spánkové návyky a subjektivní odhad času ke svému nejlepšímu fyzickému i psychickému výkonu, dotazník tedy zahrnuje i otázky na preferovanou dobu různých aktivit v ideálních podmínkách (Horne a Östberg, 1976). Jiným typem dotazníku je Roennebergův MCTQ. Dotazník analyzuje pouze reálné počínání subjektu v průběhu volného a pracovního dne (Roenneberg et al., 2003).

3.4.2. Rozložení a charakteristika chronotypů

Na základě výsledného skóre ve výše zmíněných dotaznících se chronotypy kategorizují do pěti skupin: extrémně ranní typ, mírně ranní typ, nevyhraněný typ, mírně

večerní typ a extrémně večerní typ. Ranní chronotyp je označován jako „skřivan“, večerní jako „sova“.

Zastoupení jednotlivých chronotypů v populaci odpovídá Gaussově křivce (obr. 3). Z křivky je patrné, že v populaci je nejrozšířenější nevyhraněný typ.



Obrázek 3: Gaussova křivka popisující distribuci jednotlivých chronotypů u české populace. Na ose x jsou hodnoty MEQ skóre, osa y vyjadřuje percentil účastníků studie (převzato a upraveno Fárková et al., 2020).

Rozdíl mezi jednotlivými chronotypy je v délce jejich endogenní periody a v synchronizaci vnitřní individuální periody s vnějšími stimuly. Tyto aspekty podmiňují rozdílné chování chronotypů během dne (neboli tzv. diurnální preferenci = preference vhodné doby pro různé aktivity dle přirozeného vnitřního nastavení). Nejvýraznější behaviorální rozdíly jsou pozorovány mezi extrémními chronotypy, jejichž zastoupení v populaci není tolik výrazné, nicméně tito lidé se často dostávají do střetu s časovým nastavením společnosti.

U lidí s ranními preferencemi je start subjektivního dne v brzkých ranních hodinách, a s tím se pojí i brzké uléhání ke spánku. Naopak je tomu u lidí s večerním chronotypem, kteří bývají vzhůru do pozdních večerních hodin a preferují probouzení až v pozdějších dopoledních hodinách. V pracovních dnech jsou tak často osoby s večerními preferencemi spánkově deprivované a dospávají tuto deprivaci ve volných dnech. Jedinci s ranním chronotypem tento rozdíl pocítují spíše obráceně; jejich doba spánku bývá posunuta ve volných dnech, kdy se přizpůsobují společenským aktivitám, ale ráno se probouzí dle jejich standardního režimu, neboť dostávají hodinami řízený signál vedoucí k probuzení (Roenneberg et al., 2003).

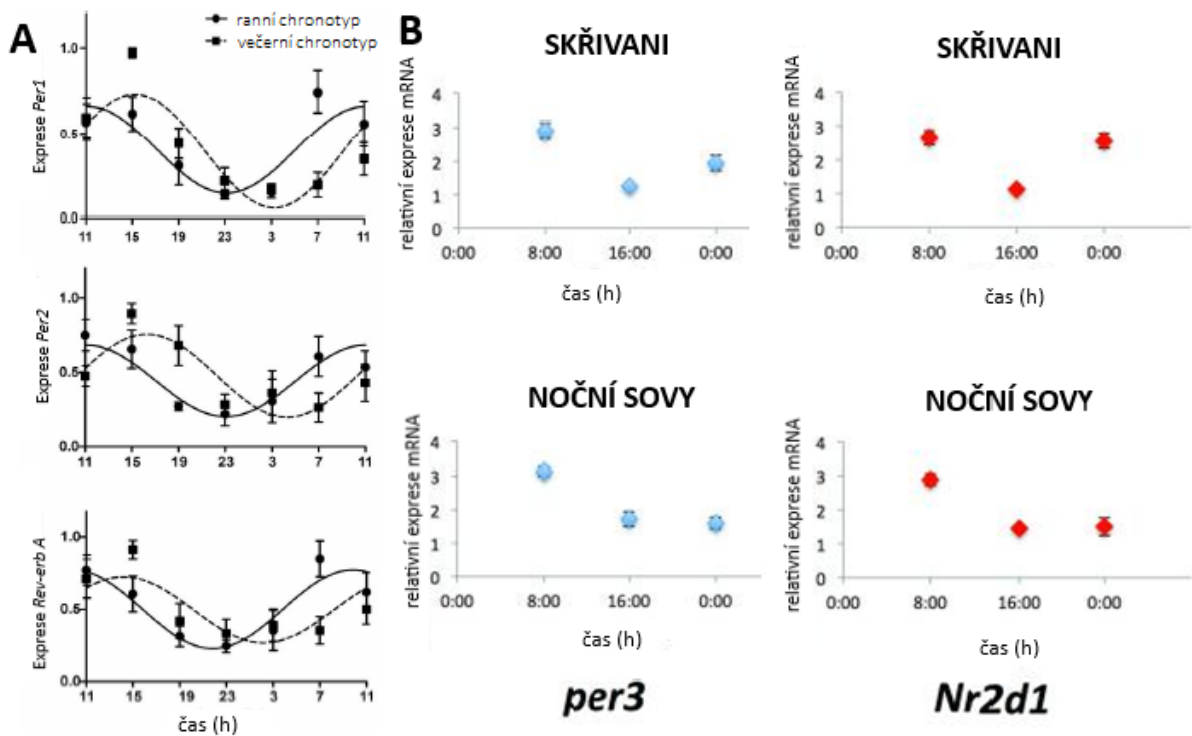
Problémem takového režimu často bývá tzv. sociální jet lag, který vyjadřuje rozdílnou dobou mezi ulehání ke spánku v pracovních a volných dnech (Wittmann et al., 2006). Nepravidelný spánkový režim a s tím spojený častý sociální jet lag napomáhá rozvoji řadě civilizačních chorob, jakými jsou například diabetes, ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění atd. (Wong et al., 2015).

3.4.3. Exprese hodinových genů během 24 hodin a rozdíl u chronotypů

Zpětnovazebné transkripčně translační molekulární smyčky hodinových genů mají standardně následující načasování: V ranních hodinách indukuje heterodimer BMAL1:CLOCK transkripci genů *Per1/2/3* a *Cry1/2*, jejichž transkripty se přesouvají do cytoplazmy, kde během dne dochází k translaci proteinů PER a CRY a v pozdější části dne i k jejich akumulaci. Večer vytváří naakumulované proteiny komplex společně s CK1, který se translokuje do jádra. Během noci působí tento komplex jako represor na heterodimer BMAL1:CLOCK, přerušuje jejich nasedání na promotor genů *Per* a *Cry* a způsobí tak vlastní potlačení transkripce a tedy i produkce proteinů PER a CRY. S blížícím se ránem postupně dochází k degradaci působícího komplexu a ráno tak může opět dojít k zahájení transkripce *Per* a *Cry* (Smith a Sassone-Corsi, 2020; průběh smyčky popisuje obr. 2).

U extrémních chronotypů lze pozorovat rozdíl v časování těchto oscilací. U ranních typů dochází k fázovému předběhnutí, u večerních k fázovému zpoždění. Ve studii Nováková et al. (2013) sestavili autoři profil exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* během 24 hodin u obou chronotypů. Z grafů na obr. 4A je patrné, že u ranního chronotypu nastává akrofáze rytmu exprese hodinových genů dříve než u večerního typu, což vypovídá o jeho fázovém předběhnutí.

Ferrante et al. (2015) měřili u chronotypů hladinu exprese dalších hodinových genů *Per3* a *Nr2d1* (kódující REV-ERB β) v časech: 8:00; 16:00 a 0:00. Signifikantní rozdíl se ukázal zejména ve večerní hladině obou transkriptů. U ranních typů zaznamenali mezi 16:00 a 0:00 vzrůst exprese mRNA u obou genů, jak je demonstrováno na obr. 4B. Naopak noční typy měly hladinu mRNA v tomto čase prakticky nezměněnou (obr. 4B).



Obrázek 4A: Profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* během 24 hodin u ranního a večerního chronotypu (převzato a upraveno z Nováková et al. 2013). **4B:** Záznamy exprese hodinových genů *Per3* (modře) a *Nr2d1* (kódující *REV-ERBβ*) (červeně) v časech 8:00, 16:00 a 0:00 (nahore ranní chronotyp „skřivani“, dole večerní chronotyp „noční sovy“) (převzato a upraveno Ferrante et al. 2015). Grafy znázorňují fázové předběhnutí u ranního chronotypu a fázové zpoždění u večerního.

3.4.4. Polymorfismy hodinových genů u extrémních chronotypů

Genetickým polymorfismem se rozumí, že gen se vyskytuje ve dvou nebo více variantách (= alelách). Přítomnost těchto genetických variant podmiňuje genotypovou variabilitu populace. Polymorfismy jsou přítomny buď jako tzv. jedno-nukleotidové polymorfismy (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism), nebo jako různě dlouhé tandemové repetice = tzv. polymorfismus v počtu tandemových repetic (VNTR, z angl. „Variable Number of Tandem Repeat polymorphism“). Každý polymorfismus má svůj identifikátor, je to tzv. „rs“ číslo. Již několik studií se zabývalo spojitostí vzniku extrémních chronotypů s polymorfismem v hodinových genech. Výzkumné týmy se domnívají, že právě genové polymorfismy stojí za různorodostí individuálního rytmu a determinují tak výskyt extrémních chronotypů v populaci (Katzenberg et al., 1998; Carpen et al., 2005; Archer et al., 2003; Pedrazzoli et al., 2010).

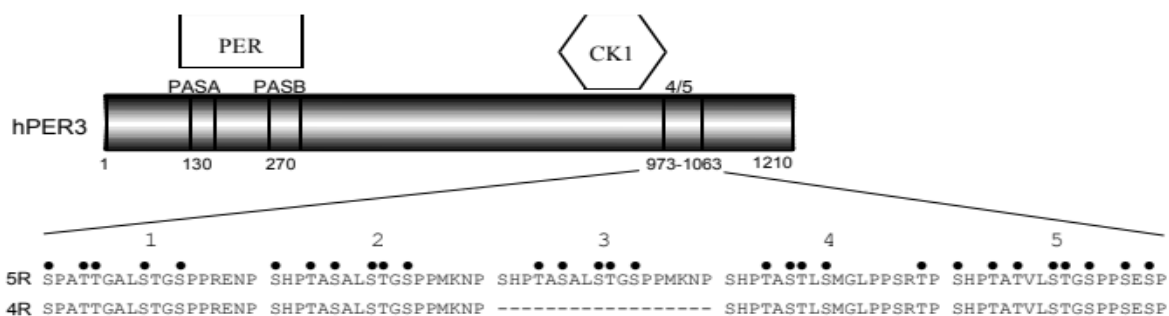
SNP se rozptýleně vyskytují po celém genomu, frekventovaněji se však nachází v nekódujících oblastech DNA. Nejčastěji k nim dochází substitucemi (dále mohou vznikat

delecemi, či insercemi) nějakého nukleotidu za jiný. V kódujících oblastech se substitucemi vzniklé SNP dělí na dva typy: nesynonymní, které mohou, a synonymní, které nemusí vést k záměně aminokyseliny při translaci mRNA a ovlivnit tak strukturu a funkci proteinu. Nesynonymní SNP se dále dělí na „missense“ a „nonsense“ (převzato z internetového zdroje: „single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable“ 8.7.2021). Synonymní nebo také tzv. „tichý“ polymorfismus, který je spojován s odlišnostmi v diurnálních preferencích mezi lidmi, se nachází například v genu *Per1* T2434C (Carpen et al., 2006). Mezi SNP v nekódujících oblastech, u kterých se předpokládá jejich vliv na individuální diurnální preference, a které byly vybrány do této diplomové práce, patří například T3111C v genu *Clock* (Katzenberg et al., 1998) a C111G v genu *Per2* (Carpen et al., 2005). Dále byl vybrán SNP A-1420G v genu *Bmal1*, který se vyskytuje v promotorové oblasti (Pedrazzoli et al., 2010).

Polymorfismů v počtu tandemových repetit (nebo také repetitivních sekvencí nukleotidů) je několik typů. Mají různou délku a nukleotidové zastoupení (převzato z internetového zdroje „microsatellite / VNTR | Learn Science at Scitable“, 8.7.2021). S diurnálními preferencemi je spojován VNTR polymorfismus v hodinovém genu *Per3* (Ebisawa et al., 2001), který je rovněž předmětem této práce.

3.4.4.1. Polymorfismus v genu *Per3*

V genu *Per3* se vyskytuje VNTR polymorfismus (rs57875989), tvořen buď čtyřmi nebo pěti tandemovými repeticemi (obr. 5). Tento opakující se motiv je v PER3 proteinech místem, kde pravidelně dochází k fosforylaci CK1ε. Míra této fosforylace ovlivňuje stabilitu proteinů a jejich translokaci do jádra (Archer et al., 2003). Vědci Archer et al. (2003) dále uvedli, že alela s pěti opakováními („5R“, z angl. 5-repeat) přísluší spíše rannímu chronotypu, a naopak alela se čtyřmi opakováními („4R“, z angl. 4-repeat) je spojována s večerním typem.



Obrázek 5: Schéma lidského proteinu PER3. Domény PAS (A/B) zprostředkovávají vazbu s dalšími molekulami PER. „5x opakující se“ („5R“ z angl. 5-repeat) a „4x opakující se“ („4R“ z angl. 4-repeat) znázorňují region

s výskytem repetitivních aminokyselinových sekvencí. Černými tečkami jsou označeny fosforylační místa pro CK1 (fosforyluje protein na serinových a treoninových zbytcích) (převzato z Archer et al., 2003).

Ciarleglio et al., (2008) analyzovali frekvenci alel nejběžnějších polymorfismů hodinových genů mezi různými etniky. Došli k závěru, že alela „4R“ je mezi nimi zastoupena více: a to kolem 50–70 %, alela „5R“ 34-41 %.

Výzkumný tým Viola et al. (2007) zkoumal spojitost tohoto polymorfismu s kvalitou a strukturou spánku. Do studie zařadili pouze homozygoty a našli signifikantní rozdíly mezi homozygoty u tzv. „pomalovlnného“ spánku, spánkové latence a dalších markerů homeostatické složky spánkové regulace. Povedlo se jim tedy potvrdit, že polymorfismus u genu *Per3* je možné korelovat s odlišnostmi mezi výše zmíněnými genotypy (a tedy i chronotypy).

V další práci tito autoři cílili na jiné markery, které by zdůraznily rozdíly mezi genotypy (Viola et al., 2008). Ve spánku dochází ke změnám v autonomní regulaci srdce, kdy je aktivita sympatiku, regulovaná skrze *nervus vagus*, nejnižší během NREM spánku, naopak během REM je nejvyšší. Autoři sledovali efekt spánkové deprivace na aktivitu sympatiku ovlivňující srdeční frekvenci a rozdíly mezi genotypy „44“ a „55“. Zjistili, že u osob s genotypem „55“ se během „zotavujícího“ spánku po spánkové deprivaci snížila amplituda modulace sympatovagální rovnováhy, což znamená, že se u těchto osob snížila aktivita sympatiku, zodpovědného za autonomní regulaci srdce, během spánkových cyklů. Dochází při nich ke změnám v aktivitě sympatiku během NREM a REM. Poměr této aktivity sympatiku během spánku se označuje pojmem sympatovagální rovnováha.

3.4.4.2. Jedno-nukleotidové polymorfismy (SNP)

Polymorfismus v genu Clock

V roce 1998 přednesl výzkumný tým Katzenberg et al. hypotézu, že nukleotidový polymorfismus v genu *Clock* může korelovat s ranní či večerní časovou preferencí. Na pozici 3111 se vykytuje thymin (T), který může být substituován cytosinem (C) (T3111C; rs1801260), nachází se v 3'-UTR (nepřekládané oblasti, z angl. untranslated region). Vědci naznačili asociaci večerního typu s alelou *3111C* (Katzenberg et al., 1998), nicméně studiím z roku 2002 se replikace popsané studie nezdařila (Robilliard et al., 2002; Iwase et al., 2002). Nezdařilo se to ani studii s brazilskou populací z roku 2007 (Pedrazzoli et al., 2007). Avšak Mishima et al. (2005) asociaci alely *3111C* s večerním typem prokázali v japonské populaci.

Ciarleglio et al. (2008) analyzovali frekvenci distribuce obou alel mezi různými etniky a prokázali, že alela *3111T* se mezi nimi vyskytuje frekventovaněji, a to ze 74 až 90%.

Polymorfismus v genu Per2

SNP spojovaný s diurnálními preferencemi v genu *Per2* se nachází na pozici 111. Na této pozici může být C nahrazen guaninem (G) (C111G; rs2304672). Tento polymorfismus se nachází v 5'-UTR (Carpen et al., 2005). Ve studii Carpen et al. (2005) identifikovali další čtyři SNP, které však byly tzv. „missense“ mutace (tj. mutace, jejímž důsledkem je změna struktury polypeptidového vlákna určitého proteinu). Pouze u SNP C111G byla prokázána jeho asociace s diurnálními preferencemi, konkrétně alely *111G* s ranním chronotypem. Hida et al. (2014) však žádnou asociaci SNP C111G s diurnálními preferencemi neprokázali.

Polymorfismus v genu Bmal1

V genu *Bmal1* je diurnální preference ovlivňující SNP lokalizován v promotorové oblasti na pozici 1420. Vyskytuje se zde buď A nebo G (A-1420G; rs4757138) (Pedrazzoli et al., 2010).

3.4.4.3. Vzájemná provázanost jednotlivých polymorfismů

Ačkoliv existuje několik domněnek o tom, který polymorfismus v konkrétním genu zodpovídá za konkrétní chronotyp, a několik studií se pokusilo prokázat asociaci specifických genotypů s extrémními chronotypy, přesto se zdá, že chronotypy determinuje především jakýsi vzorec několika polymorfismů.

V poměrně nedávné studii Pedrazzoli et al. (2010) se pokusili autoři o sestavení několika haplotypů mezi výše popsány polymorfismy v genech *Clock*, *Per2*, *Per3* a *Bmal1* a analyzovali frekvenci jejich výskytu mezi extrémními chronotypy. V jejich souboru se vyskytovalo celkem 31 kombinací čtyř genotypů ze všech 81 matematicky možných. Srovnali četnost těchto kombinací jak u extrémně ranních chronotypů, tak extrémně večerních chronotypů.

S ranním chronotypem se statisticky signifikantně pojila pouze kombinace „TT/CC/45/GG“ (*Clock/Per2/Per3/Bmal1*), zatímco s večerním chronotypem kombinace „TT/CC/45/AG“ (*Clock/Per2/Per3/Bmal1*). Je zajímavé, že se tyto kombinace mezi extrémními chronotypy lišily pouze v genotypech GG vs. AG u SNP genu *Bmal1*. Autoři se tedy domnívají, že tento SNP genu *Bmal1* (A-1420G) může hrát ve formování chronotypu

významnější roli než polymorfismy jiných hodinových genů. Tyto výsledky tedy naznačují, že je důležité polymorfismy genů zkoumat jako provázané haplotypy a pokusit se stanovit, které kombinace genotypů podmiňují daný chronotyp.

4. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je asociace extrémního cirkadiálního fenotypu s polymorfismy hodinových genů a jejich provázanými haplotypy, a vyvození hypotézy, které alely hodinových genů mohou v české populaci přispívat ke vzniku ranního či večerního chronotypu.

Fenotyp dobrovolných účastníků je stanoven standardizovaným dotazníkem MEQ na adrese *chronotyp.cz* a genotypizace jejich polymorfismů je stanovena ze vzorku DNA získaných ze slin.

5. POUŽITÉ METODY A VYBAVENÍ

5.1. Validovaný dotazník, respondenti a odběr vzorků slin

Soubor dat pro tuto diplomovou práci jsme získali díky dotazníku na webové adrese *chronotyp.cz*¹. Dotazník zahrnuje stanovení MEQ skóre (Horne a Östberg, 1976; Fárková et al., 2020). Použili jsme data nashromážděná za období říjen 2019 - říjen 2020. Do další části této studie jsme hledali respondenty, kteří splňovali následující podmínky: výborný zdravotní stav, věková kategorie 20-40 a hodnota MEQ skóre odpovídající extrémním večerním, ranním a extrémům blízkým chronotypům.

MEQ skóre rozděluje participanty do pěti skupin: extrémně ranní typ (70-86 bodů), mírně ranní typ (59-69 bodů), nevyhraněný typ (42-58 bodů), mírně večerní typ (31-41 bodů) a extrémně večerní typ (16-30 bodů). Studie byla schválena Etickou komisí Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (čísla: 202/16; 2017/12).

Validovaný dotazník vyplnilo 1134 osob, z toho bylo 118 extrémně ranních, 204 mírně ranních, 594 nevyhraněných, 176 mírně večerních a 42 extrémně večerních. S účastí ve studii souhlasilo 64 respondentů: 21 s večerním (z toho 15 extrémních a 6 blízko extrémům)

¹ O jeho validovaný překlad se zasloužila Ing. Mgr. Eva Fárková, PhDr. ve spolupráci s PhDr. Denisou Mankovou, Ph.D.; PhDr. Janou Kopřivovou, Ph.D.; MUDr. Jitkou Buškovou, Ph.D.; Mgr. Kateřinou Červenou a Mgr. Dominikou Pačesovou

a 43 s ranním chronotypem (z toho 26 extrémních a 17 blízko extrémům). Všichni zúčastnění splňovali výše uvedené podmínky.

Účastníci byli seznámeni s informacemi o studii a podepsali informovaný souhlas (příloha 1). Vzorek slin se odebíral do speciálních a řádně označených zkumavek firmy Isohelix s objemem 10 ml. Každá osoba poskytla 1-1,5 ml slin k 1 ml stabilizačního pufru uchovávající sliny při pokojové teplotě. Sliny tak nebylo nutné skladovat v lednici či mrazáku.

5.2. Izolace DNA

Roztok slin obsahoval buňky bukalní sliznice, ze kterých jsme izolovali DNA. Existuje několik izolačních metod, vždy zahrnující fázi lytickou, promývací a eluační. V této práci jsme použili izolační kit Isohelix GeneFix™ Saliva DNA Mini Kit: GSS-50/GSS-5.

Laboratorní postup:

Postup práce jsme zachovali podle přiloženého protokolu k izolačnímu kitu. K promíchanému roztoku slin a pufru jsme napipetovali 20 µl proteinkinázy K a inkubovali ve vodní lázni při 60 °C šedesát minut. Po inkubaci jsme do zkumavek přidali 2 ml ethanolu, promíchali a do označených filtračních zkumavek (tzv. „kolonek“) napipetovali 700 µl roztoku. Filtrační zkumavky jsme centrifugovali 13 400 rpm / 1 minutu a následně odstranili profiltrovanou část z tzv. „sběrných“ zkumavek. Tento krok jsme několikrát zopakovali.

Dalším krokem bylo promývání. Do kolonek jsme napipetovali 750 µl promývacího pufru (WB z angl. Wash buffer). Následovala centrifugace (opět 13 400 rpm / 1 minutu), po které jsme odstranili obsah ze „sběrných“ zkumavek. Tento krok jsme ještě jednou zopakovali. Pro odstranění všech zbytků ethanolu jsme „kolonky“ umístili do čistých sběrných zkumavek a stočili je 3 minuty při 13 400 rpm.

„Kolonky“ jsme umístili do 1,5 ml zkumavek a přidali 100 µl/vzorek eluačního pufru (EB z angl. Elution buffer) předehřátého na 70°C. Zkumavky jsme nechali 3 minuty odstát a následně je stočili 1 minutu (při 13 400 rpm) pro eluaci DNA. Izolovanou DNA jsme skladovali při +4°C. Před následným použitím jsme změřili její koncentraci na spektrofotometru.

5.3. Výběr polymorfismů

Výběr zkoumaných hodinových genů byl inspirován studií Pedrazzoli et al. (2010), kteří kromě již studovaných polymorfismů v genech *Clock*, *Per3* a *Per2* zařadili i dalšího klíčového hráče molekulární smyčky – gen *Bmall*.

V těchto hodinových genech bylo identifikováno několik polymorfismů. Náš výběr byl zaměřen u genu *Per3* na polymorfismus rs57875989, což je VNTR se čtyřmi či pěti opakováními a v literatuře je poukázáno na jeho korelaci s diurnální preferencí (Archer et al., 2003). U genu *Per2* byl zvolen polymorfismus rs2304672. Carpen et al. (2005) popisuje, že z analyzovaných SNP v genu *Per2* je pouze tento polymorfismus spojen s odlišnými diurnálními preferencemi (jak je uvedeno v kapitole 3.4.4.2.). Majoritní alelou je u něj C a minoritní G (C > G). U genu *Bmall* jsme se zaměřili na polymorfismus rs4757138 v promotorové oblasti (A > G) (Pedrazzoli et al., 2010), a u genu *Clock* na rs1801260 (T > C) (Katzenberg et al., 1998).

5.4. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) je molekulární metoda umožňující exponenciální amplifikaci specifických úseků nukleových kyselin enzymem DNA polymerázou. Celý proces je zahájen denaturací, kdy dochází k rozpletení dvouřetězcové DNA. Získaná jednořetězcová vlákna pak slouží jako templát. Je důležité zvolit správnou denaturační teplotu, aby nedošlo k degradaci použitých reagensů. Proto se volí teplota kolem 90–98 °C po dobu 10–60 sekund.

V následující fázi dojde k výraznému snížení teploty, na tzv. anelační teplotu v rozmezí 55–70 °C. Toto ochlazení zajišťuje nasedání primerů (jež jsou krátké úseky oligonukleotidů) na 5' konce komplementárních vláken (označovaných jako Forward a Reverse) (sekvence primerů vypsáné v tabulce 1). Anelační teplota (tab. 1) musí být cca o 5 °C nižší, než je jejich teplota tání.

V tuto chvíli nastává polymerační reakce, kdy dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA. DNA dependentní DNA polymeráza nasedá na primery a připojuje k jednořetězcovým vláknům volné nukleotidy na základě komplementarity dusíkatých bazí. DNA polymeráza musí být termostabilní, aby nedocházelo k její degradaci. Nejběžněji je používána Taq polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* vyskytující se v termálních pramenech.

Gen	sekvence primeru	anelační teplota
<i>Clock</i>		
F	TCCAGCAGTTTCATGAGATGC	56,5°C
R	GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC (převzato z Katzenberg et al. 1998)	
<i>Bmall</i>		
F	GGCAGAGACAAAGGAGCAAT	56,5°C
R	CAGCGTCTTCTTTTCG (převzato z Pedrazzoli et al. 2010)	
<i>Per2</i>		
F	GGCAAAACCCTGTCTCTACCAA	62,5°C
R	AGCTCCTTCCCACTGTCGTCA (převzato z Carpen et al. 2005)	
<i>Per3</i>		
F	CAAAATTTTATGACACTACCAGAATGGCTGAC	62,5°C
R	AACCTTGTA CTCCACATCAGTGCCTGG (převzato z Ebisawa et al. 2001)	

Tabulka 1: Sekvence primerů forward (F) a reverse (R) všech studovaných genů. Vpravo uvedena jejich anelační teplota, podle které se upravuje teplotní profil v protokolu.

Laboratorní postup:

Do 0,2 ml označených mikrozkušavek jsme připravili reakční směs o celkovém objemu 15 µl. Zvortexované reagenty jsme napipetovali v tomto pořadí: 10,5 µl dH₂O (dle koncentrace DNA); 1,5 µl Taq pufr Fermentas s KCl; 0,9 µl MgCl₂ (role kofaktoru); 0,2 µl volných deoxyribonukleotidů (dNTP); 0,3 µl Forward primer; 0,3 µl Reverse primer; 1-2 µl templátové DNA (dle její koncentrace) a na závěr 0,3 µl Taq polymeráza Fermentas 5U (stále skladovaná na ledu).

Všechny zkumavky jsme poté umístili do thermocycleru (Professional Thermocycler (společnost Biometra, An Analytic Jena Company), ve kterém proběhla reakce s teplotním profilem: 96 °C dvě minuty (denaturační část); 35 cyklů amplifikační fáze, která má tři kroky: a) 94 °C třicet sekund; b) v případě genů *Clock/Bmall* 56,5 °C, v případě *Per2/Per3* 62,5 °C třicet sekund; c) 72 °C třicet sekund. Následuje finální extenze při 72 °C tři minuty, závěrem probíhá ochlazování na 4 °C. Zdárnou amplifikaci jsme ověřili využitím elektroforézy.

5.5. Elektroforéza

Principem této metody je separování fragmentů DNA podle velikosti v agarózovém gelu v rámci nabitého elektrického pole. DNA je schopna prostupovat gelem skrze póry a putuje od záporného pólu ke kladnému.

Laboratorní postup:

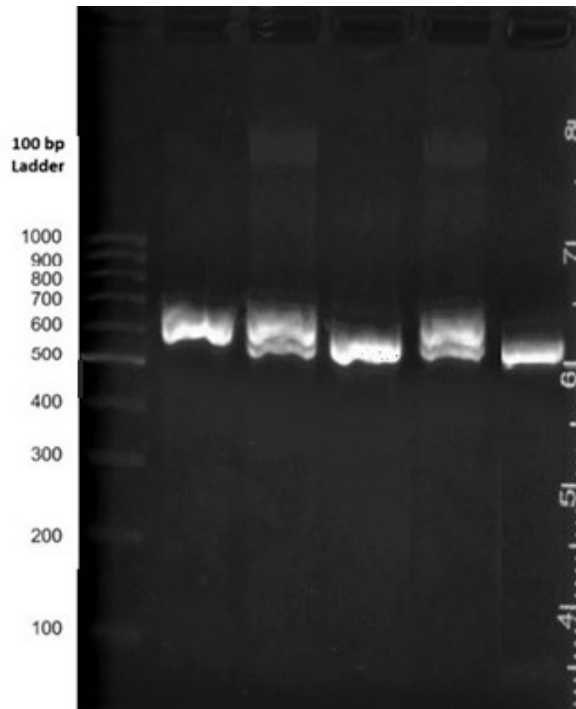
Smícháním 450 ml destilované vody s 50 ml 5x koncentrovaného roztoku TBE (obsahuje tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, kyselinu boritou a kyselinu etylendiamintetraoctovou) nám vznikl 0,5x koncentrovaný roztok TBE pufru, který má úlohu základního média přípravy gelu. V 50 ml TBE pufru jsme rozpustili 1 g agarózy a 1,25 μ l barviva GelRed Nucleid Acid Stain, které má funkci detekčního činidla DNA – dochází k jeho interkalaci mezi páry bazí. Směs jsme povařili 2,5 minuty v mikrovlnné troubě. Vzniklou homogenní směs jsme nalili do elektroforézové formy a umístili hřebínek k vytvoření jamek. Gel tuhl 30-45 minut.

Ze ztuhlého gelu jsme vytáhli hřebínek, umístili formu do elektroforézové vany a gel převrstvili elektrolytem. Na parafilmu jsme smíchali nanášecí pufr 6X TriTrack DNA Loading Dye o objemu 2,5 μ l s 0,75 μ l velikostního markeru GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Celý obsah jsme resuspendovali a napipetovali do první jamky.

Do zbývajících jamek jsme napipetovali roztok nanášecího pufru s 5 μ l vzniklého amplifikátu. Elektroforéza běžela při 140 V po dobu 45 min. Výslednou reakci jsme vyhodnotili a vyfotili pod UV lampou pomocí snímacího systému Gel Doc, jež umožňuje zobrazení výsledku v programu ImageLab. Po amplifikaci genu *Per3*, bylo možné na gelu stanovit jeho délkový polymorfismus. Elektroforéza byla též využita pro vyhodnocení výsledků produktů restrikčního štěpení (viz dále).

5.6. Určení délky sekvence genu *Per3*

K vyhodnocení VNTR polymorfismu jsme použili amplifikační PCR a následně gelovou elektroforézu (1 hod, 110 V), která umožnila separovat fragmenty o různé délce. Výsledek byl digitalizován snímacím systémem Gel Doc za použití programu ImageLab. Fragmenty s pěti opakováními je dlouhý 635 bp, fragment se čtyřmi opakováními 581 bp (obr. 6).



Obrázek 6: Záznam elektroforézy se vzorky č. 1 (635 bp: genotyp „55“), č. 2 (635 + 581 bp – heterozygot), č. 3 (581 bp: genotyp „44“), č. 5 (635 + 581 bp), č. 7 (581 bp).

5.7. Restrikční štěpení a určení sekvence genu *Clock*

SNP v genu *Clock* jsme detekovali využitím metody restrikční štěpení. Inspirací byly studie: Desan et al. (2000) a Bailer et al. (2005). Restrikční štěpení je cílené štěpení vlákna na konkrétní nukleotidové pozici. Využívá se k tomu restrikční enzym. Ten se váže na specifickou sekvenci párů bází v DNA, v jejíž blízkosti se nachází tzv. restrikční místo, kde enzym štěpí molekulu DNA.

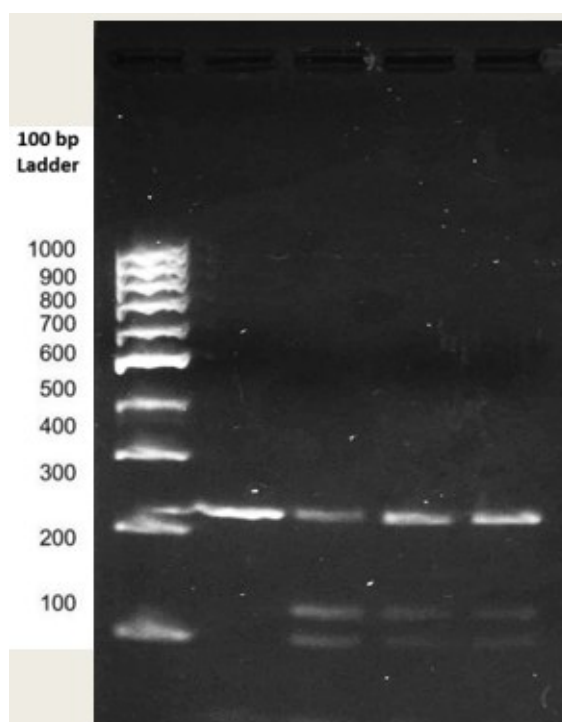
Použili jsme restrikční enzym Bsp1286I (získán z *Bacillus sphaericus*), který v 221 bp dlouhém amplikonu genu *Clock* rozpoznává restrikční místo²: 5'... G D G C H C ... 3' / 3'... C A H C G D G ... 5', kde díky své hydrolytické aktivitě štěpí fosfodiesterovou vazbu mezi nukleotidy. Využití této metody nám umožňuje určit, zda se na pozici 3111 vyskytuje nukleotid T či C. Je-li na této pozici přítomen nukleotid C, probíhá restrikční štěpení a v reakci vznikají vlákna o délkách 125 a 96 bp, je-li přítomen nukleotid T, štěpení neprobíhá.

² označeno trojúhelníčky

Laboratorní postup:

Do označených mikrokumavek o objemu 0,2 ml jsme napipetovali reagentie do celkového objemu 10 μ l v tomto pořadí: 3,8 μ l dH₂O, 1 μ l CutSmart pufru (New England BioLabs), 5 μ l produktu PCR (byl amplifikován fragment o délce 221 bp) a 0,2 μ l enzymu Bsp1286I (New England BioLabs – který byl speciálně vytvořen tak, aby štěpení proběhlo již za 5–15 minut).

Použitím tohoto enzymu bylo teplotní schéma následující: po dobu patnácti minut probíhalo restriční štěpení při 37 °C, po něm následovala dvacet minut inaktivace enzymu při 65 °C a celá reakce se ochladila na 4 °C. Elektroforézou se fragmenty rozdělily dle jejich velikosti a použitím vizualizační techniky jsme odečetli délku vláken (obr. 7).



Obrázek 7: Záznam restričního štěpení vzorků č. 5 (fragment 221 bp – jedná se o genotyp TT) č. 7, 10, 16 (fragменты 221 + 126 + 96 bp – jedná se o genotyp TC).

5.8. Sekvenační metody pro určení sekvencí u genů *Per2* a *Bmal1*

Principem této metody je zjištění sekvence bazí v konkrétním úseku DNA. Tuto metodu jsme využili pro stanovení polymorfismů genů *Per2* a *Bmal1*. Sekvenační (Sangerova) metoda využívá asymetrické PCR, kdy do reakce vstupuje pouze jeden primer. Směs navíc obsahuje dideoxyribonukleotidy (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP),

kteří obsahuje sekvenační kit. ddNTP se náhodně začleňují do řetězce (vždy na odpovídající pozici – ddGTP se vždy začlení na pozici G apod.).

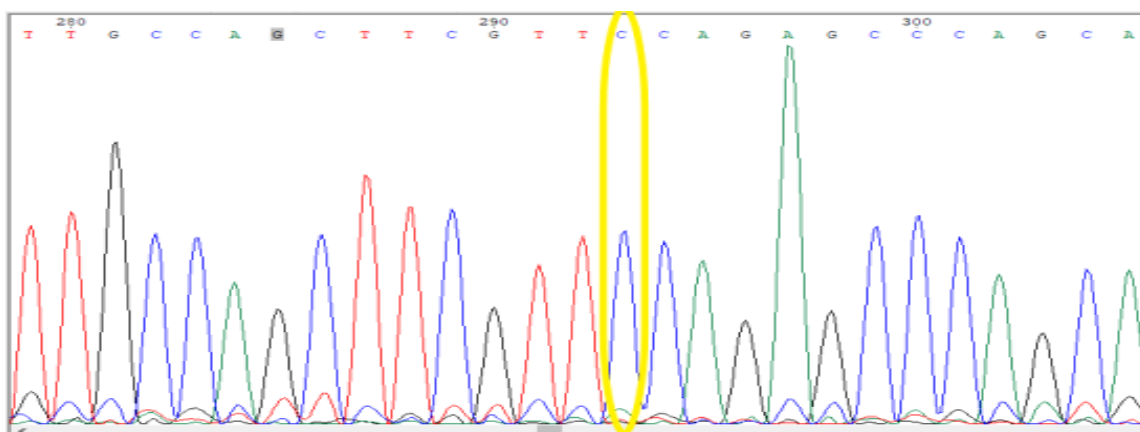
Laboratorní postup

V laboratoři jsme prováděli pouze přípravu na sekvenaci. Samotná sekvenační analýza byla provedena na sekvenátoru MiSeq Illumina v Biocevu v laboratoři sekvenace DNA.

Po amplifikační PCR jsme provedli asymetrickou PCR. Reakční směs jsme napipetovali do řádně značených 0,2 ml mikrozkušavek do celkového objemu 10 μ l v tomto pořadí: 3,5 μ l H₂O, 2 μ l sekvenačního pufru (5x), 1 μ l primeru (Forward nebo Reverse), 2,5 μ l amplifikátu PCR (u *Per2* o délce 528 bp; u *Bmall* o délce 406 bp), 1 μ l sekvenačního kit BigDye Terminator v3.1. Reakce proběhla za následujícího teplotního profilu: tři minuty 96 °C, následovalo 35 cyklů: a) deset sekund 96 °C, b) pět sekund 50 °C, c) tři minuty 60 °C.

Po proběhnutí reakce jsme k sekvenační směsi přidali 28 μ l 96 % ethanolu, inkubovali 15 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace (13 000 rpm / 20 minut, poté jsme odebrali supernatant. K peletě jsme přidali 50 μ l 70 % ethanolu a vzorek centrifugovali 10 minut při 13 000 rpm a opět odebrali supernatant. Vzorek jsme nechali inkubovat v termobloku při 40 °C po dobu 10 minut, či do úplného vysušení pelety. Takto připravené zkumavky jsme uložili do -20 °C a předali k servisnímu zpracování.

Obdržené výsledky jsme vyhodnotili v programu Chromas. Odečet sekvence jsme pro kontrolu provedli z vláken Forward i Reverse. U genu *Bmall* jsme hledali polymorfismus A-1420G a u genu *Per2* C111G (obr. 8).



Obrazek 8: Vyhodnocení v programu Chromas – gen *Per2*. Žlutý ovál označuje nukleotidovou pozici, na které hledáme buď C, nebo G. V tomto případě (vzorek č. 27; Forward) se jedná o genotyp CC

5.9. Statistické metody

Statistické zpracování jsme provedli v programu GraphPad. Na úrovni jednotlivých polymorfismů jsme testovali, zda existuje vztah mezi daným genotypem a chronotypem. V další analýze jsme se zaměřili na „efekt jedné z alel“, což znamená, že jsme analýzu stavěli na předpokladu, že jedna z alel je dominantní a druhá recesivní. Vytvořili jsme dva vzorce (vzorec 1, vzorec 2), díky kterým jsme mohli testovat, zda některá z alel odpovídá rannímu nebo večernímu chronotypu.

Vzorec 1: Předpokládáme, že je dominantní alela „A“, proto jsme sloučili genotyp AA + AB.

<i>Chronotyp</i>	<i>(AA + AB)</i>	<i>BB</i>
<i>Ranní</i>		
<i>Večerní</i>		

Vzorec 2: Předpokládáme, že je dominantní alela „B“, proto jsme sloučili genotyp AB + BB.

<i>Chronotyp</i>	<i>AA</i>	<i>(AB + BB)</i>
<i>Ranní</i>		
<i>Večerní</i>		

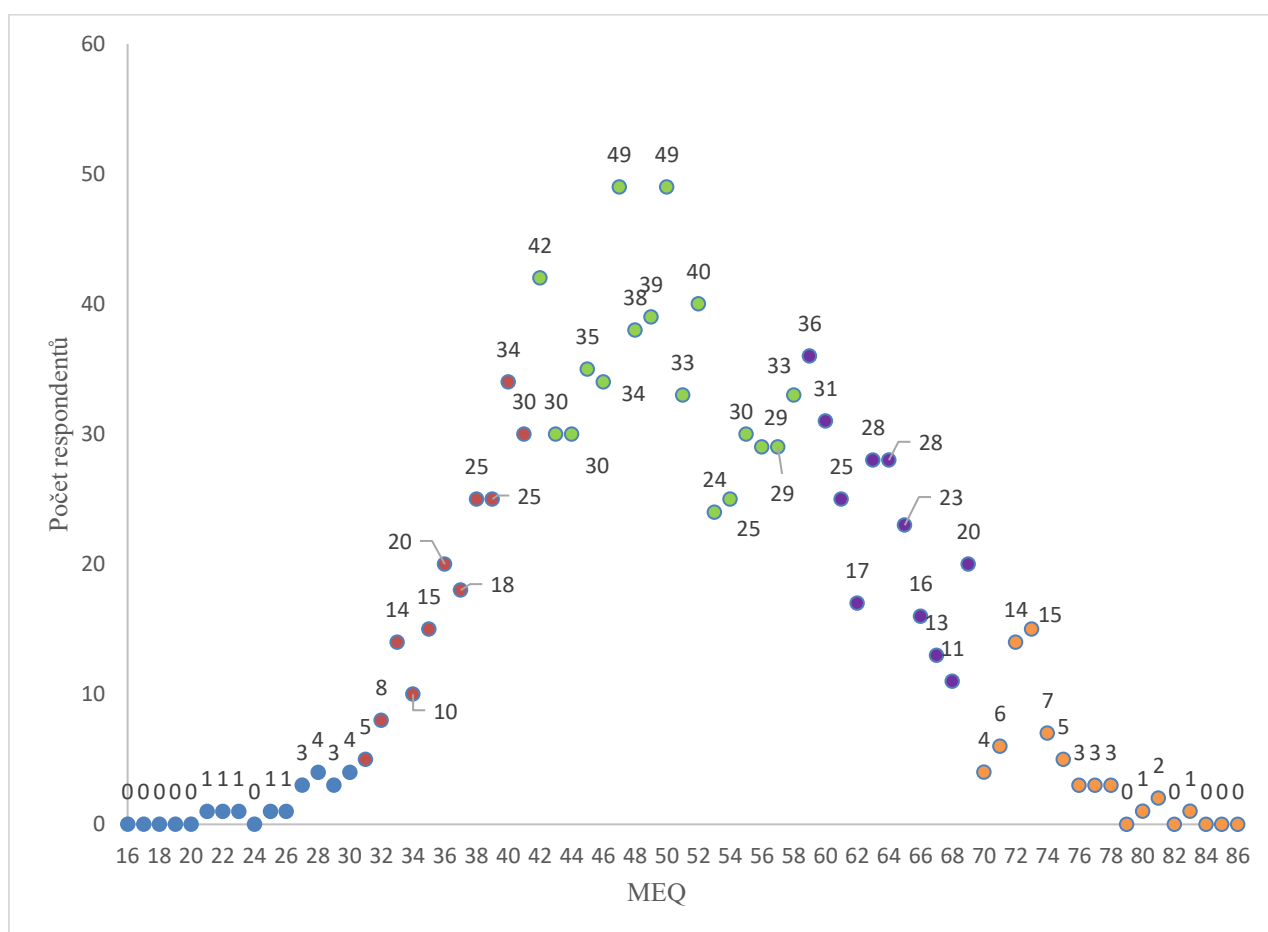
Pro analýzu všech kombinací jsme použili test Chí kvadrát, který analyzuje, zda mezi dvěma kategoriálními proměnnými existuje prokazatelný vztah. Vychází z dat uspořádaných do kontingenční tabulky, kde jeden znak je v našem případě fenotyp, tedy chronotyp, a druhý znak je genotyp. Využili jsme testu nezávislosti, který se používá k posouzení, zda existuje závislosti mezi posuzovanými znaky. Výpočet vychází z předpokladu, že platí nulová hypotéza, která říká, že mezi dvěma sledovanými znaky neexistuje žádná závislost. Na základě chí-kvadrát rozložení se vypočítá pravděpodobnost (p) chyby prvního druhu, která, je-li menší než 0,05, indikuje statistickou významnost testovaného předpokladu, a nulová hypotéza se tak zamítá. Udává, že pravděpodobnost, že by pozorované závislosti vznikly pouze náhodou, je menší než 5 %.

Po analýze jednotlivých polymorfismů jsme se zaměřili na provázanost mezi polymorfismy na úrovni dvojic. Nejprve jsme analyzovali všechny možné kombinace polymorfismů a jejich korelaci s ranním či večerním chronotypem. A stejně jako u jednotlivých polymorfismů jsme i u studovaných haplotypů zapojili do našich analýz „efekt dominantní alely“.

6. VÝSLEDKY

6.1. Stanovení chronotypů a distribuce participantů

Komplexní dotazník na adrese *chronotyp.cz* zahrnuje validovaný a do českého jazyka přeložený dotazník MEQ sestaveným Hornem a Östbergem (Fárková et al., 2020). Oslovili jsme vhodné respondenty, kteří spadali do věkové kategorie 20-40 let (příloha 2). Rozložení četnosti participantů dle jejich MEQ skóre odpovídá křivce na obrázku 9. Validovaný dotazník vyplnilo 1134 osob, z toho bylo 42 extrémně večerních, 176 mírně večerních, 594 nevyhraněných, 204 mírně ranních a 118 extrémně ranních.

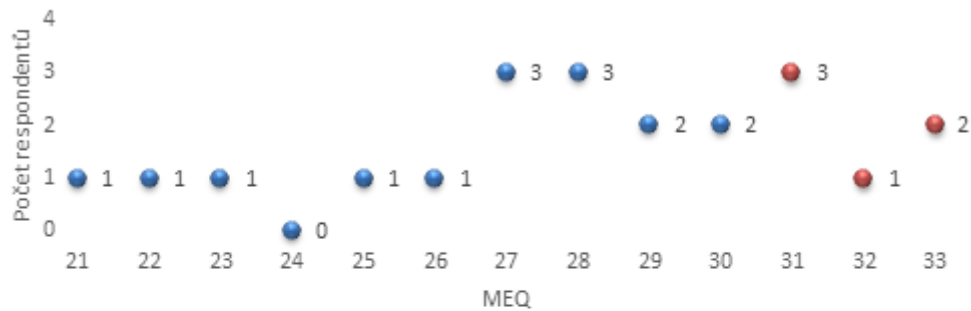


Obrázek 9: Křivka rozložení chronotypu respondentů, kteří vyplnili dotazník na adrese *www.chronotyp.cz* ($n = 1134$). Modře je značena skupina extrémně večerních chronotypů (MEQ 16-30), červeně mírně večerní chronotypy (MEQ 31-41), zeleně nevyhraněný typ (MEQ 42-58), fialově mírně ranní typy (MEQ 59-69), oranžově extrémně ranní typy (MEQ 70-86).

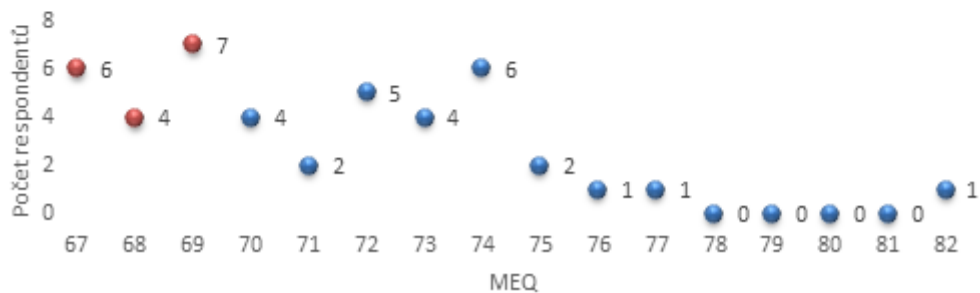
O vzorek slin byli požádáni respondenti s MEQ 16-33 a 67-86, abychom získali vzorky od extrémních a extrémům blízkých chronotypů. S účastí souhlasilo 21 osob

s večerním chronotypem (z toho 15 extrémních a 6 blízko extrémům, obr. 10A) a 43 osob s ranním chronotypem (z toho 26 extrémních a 17 blízko extrémům, obr. 10B).

A



B



Obrázek 10: Počet a MEQ skóre zúčastněných respondentů – večerního chronotypu (A) a ranního chronotypu (B). Modrá část je skupina extrémních typů, červeně jsou označeny osoby s MEQ blízko extrémům. Ve studii nebyl nikdo s MEQ pod 20 a nad 83.

6.2. Vyhodnocení zastoupení jednotlivých polymorfismů ve skupinách ranních a večerních typů.

V první části práce jsme analyzovali jednotlivé polymorfismy hodinových genů a asociovali je s chronotypy našich účastníků.

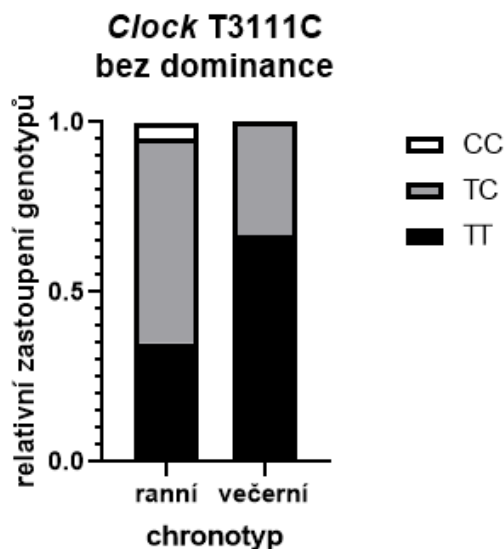
6.2.1. SNP T3111C genu *Clock*

Vybraný polymorfismus v genu *Clock* na pozici 3111 jsme detekovali pomocí restriční štěpení, díky kterému jsme mohli určit, zda se jedná o genotyp TT/CC/TC (tabulka 2). Z našich dat vyplývá, že nejméně je zastoupen genotyp CC, který byl nalezen pouze u dvou jedinců s ranním chronotypem. Z poměrného zastoupení forem TT a TC je zřejmé, že zatímco forma TC převažuje nad TT u ranního chronotypu, TT převažuje nad TC u večerního chronotypu.

<i>Clock</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>celkem</i>
<i>ranní</i>	15	26	2	43
<i>večerní</i>	14	7	0	21
<i>celkem</i>	29	33	2	64

Tabulka 2: V tabulce je uveden počet subjektů s genotypy TT/TC/CC a jejich rozdělení na ranní či večerní chronotyp.

Jelikož jsou skupiny v absolutních číslech nevyvážené, zvolili jsme pro grafické vyobrazení frakční analýzu (obr. 11), která vyjadřuje relativní zastoupení jednotlivých genotypů v obou skupinách.



Obrázek 11: Grafické znázornění vyjadřující poměr genotypů u ranního a u večerního chronotypu. U ranního typu je TT zastoupeno z 34 %, TC z 60,4 % a CC z 4,6 %. U večerního je TT z 67 % a TC z 33 %.

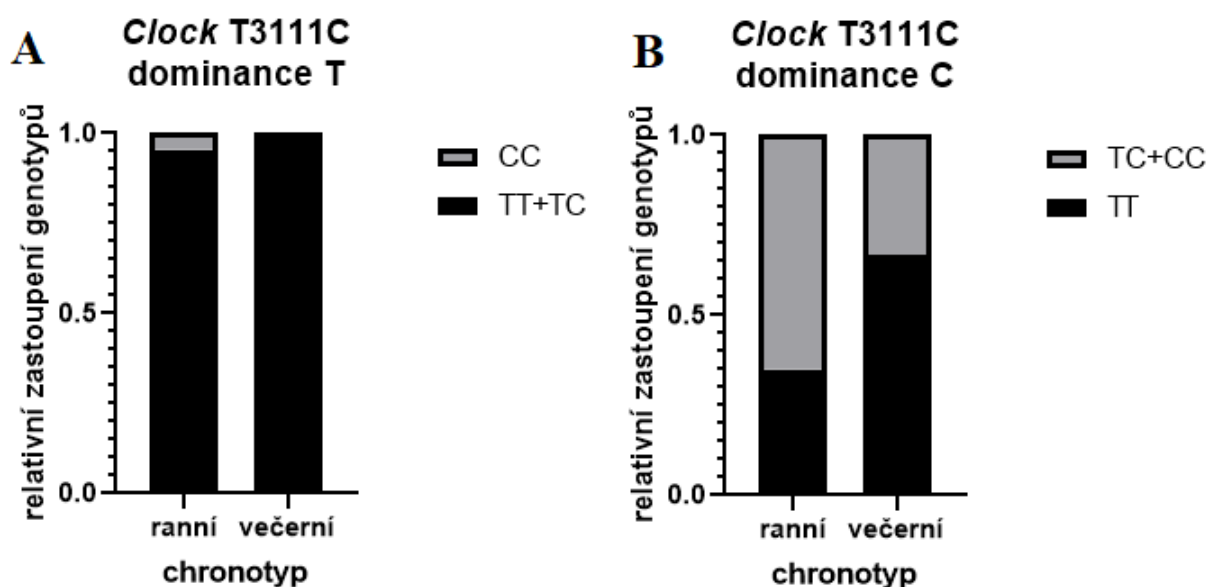
Pomocí statistické metody Chí kvadrát jsme testovali, zda existuje vztah mezi daným genotypem a chronotypem. Pokud by tento vztah byl označen za statisticky signifikantní, můžeme konstatovat asociaci konkrétního genotypu s konkrétním chronotypem. Analýza dat však neodhalila žádný signifikantní vztah mezi jednotlivými genotypy a chronotypem.

V tabulce 2 je uveden počet všech odhalených genotypů, ale z biologického hlediska dává smysl testovat genotypy jako „efekt jedné alely“. Budeme-li tedy u heterozygotů uvažovat dominanci jedné z alel, můžeme genotypy sloučit jako (TT+TC) vs. CC (dominance alely T – tabulka 3A) nebo (CC+TC) vs. TT (dominance alely C – tabulka 3B).

A)	<i>Clock</i>	<i>TT+TC</i>	<i>CC</i>	<i>celkem</i>	B)	<i>Clock</i>	<i>TT</i>	<i>TC+CC</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	41	2	43		<i>ranní</i>	15	28	43
	<i>večerní</i>	21	0	21		<i>večerní</i>	14	7	21
	<i>celkem</i>	62	2	64		<i>celkem</i>	29	35	64

Tabulka 3: **A)** Počet subjektů s dominancí alely T: *TT + TC* vs. *CC*. Z důvodu malého počtu *CC* nemůžeme očekávat signifikantní výsledek, jelikož hledáme relevantní rozdíly. **B)** Počet subjektů s dominancí alely C: *TT* vs. *TC + CC*. Tučně je vyznačena statisticky signifikantní asociace varianty „*TC + CC*“ s ranním chronotypem ($p = 0,0165$), prokázána testem Chí kvadrát.

Analýza našich dat metodou Chí kvadrátu prokázala signifikantní asociaci varianty „*TC + CC*“ s ranním chronotypem ($p = 0,0165$) (tabulka 3B), z čehož vyplývá, že alela C u genu *Clock* asociuje s ranním chronotypem. Grafické zobrazení relativního zastoupení genotypů mezi chronotypy je na obr. 12, a to jak pro dominantní alelu T (obr. 12A), tak pro dominantní alelu C (obr. 12B).



Obrázek 12: Grafické zobrazení vyjadřující poměr genotypů u ranního a u večerního chronotypu. **A)** Dominance alely T: (*TT + TC*) vs. *CC*. U ranního typu: (*TT + TC*) z 95 % a *CC* z 5 %. U večerního typu je (*TC + TT*) ze 100 %. **B)** Dominance alely C: *TT* vs. (*TC + CC*). U ranního typu: *TT* z 35 % a (*TC + CC*) z 65 %. U večerního typu je *TT* z 67 % a (*TC + CC*) z 33 %. Z tohoto rozvrstvení je patrná asociace „*TC + CC*“ s ranním chronotypem.

Jelikož jsme ve studii měli respondenty, kteří nespádají do kategorie extrémních chronotypů, ale jejich MEQ je blízko extrémům (31-33 + 67-69), rozdělili jsme tyto kategorie a statisticky vyhodnotili asociaci jednotlivých genotypů s chronotypem. Toto rozdělení kategorií nebylo u žádného z polymorfismů hodinových genů signifikantní, ani když jsme provedli obdobné sloučení genotypů (dle předpokládané dominantní alely), jako je uvedeno výše (tabulka 3, obr. 12). Příklad rozdělení respondentů uvádí tabulka 4.

<i>Clock</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>
<i>extra ranní</i>	9	16	1
<i>blízko ranním</i>	6	10	1
<i>blízko večerním</i>	4	2	0
<i>extra večerní</i>	10	5	0

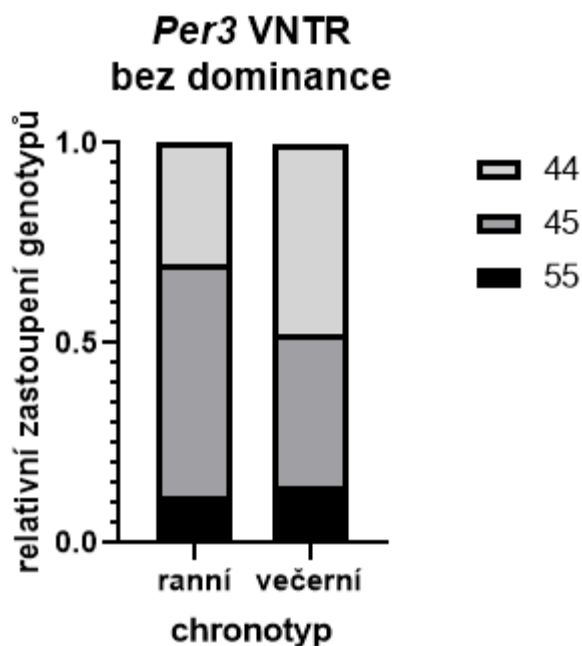
Tabulka 4: Rozdělení respondentů na 4 kategorie: extra ranní (MEQ 70-86), blízko extrémně ranním (MEQ 67-69), blízko extrémně večerním (MEQ 31-33), extrémně večerní (30-16).

6.2.2. VNTR polymorfismus genu *Per3*

V genu *Per3* se vyskytuje VNTR se čtyřmi či pěti opakováními, které lze detekovat provedením PCR a následnou elektroforézou, jež umožňuje separaci různě dlouhých fragmentů. Na základě toho postupu jsme detekovali genotypy respondentů: „44“ (VNTR polymorfismus se čtyřmi repeticemi), „55“ (VNTR polymorfismus s pěti repeticemi) a „45“ (tabulka 5), neodhalili jsme však žádný signifikantní vztah mezi jednotlivými genotypy a chronotypy. Relativní zastoupení genotypů mezi chronotypy je graficky znázorněno na obr. 13.

<i>Per3</i>	<i>44</i>	<i>45</i>	<i>55</i>	<i>celkem</i>
<i>ranní</i>	13	25	5	43
<i>večerní</i>	10	8	3	21
<i>celkem</i>	23	33	8	64

Tabulka 5: V tabulce je uveden počet subjektů s genotypy 44/55/45 a jejich rozdělení na ranní či večerní chronotyp.

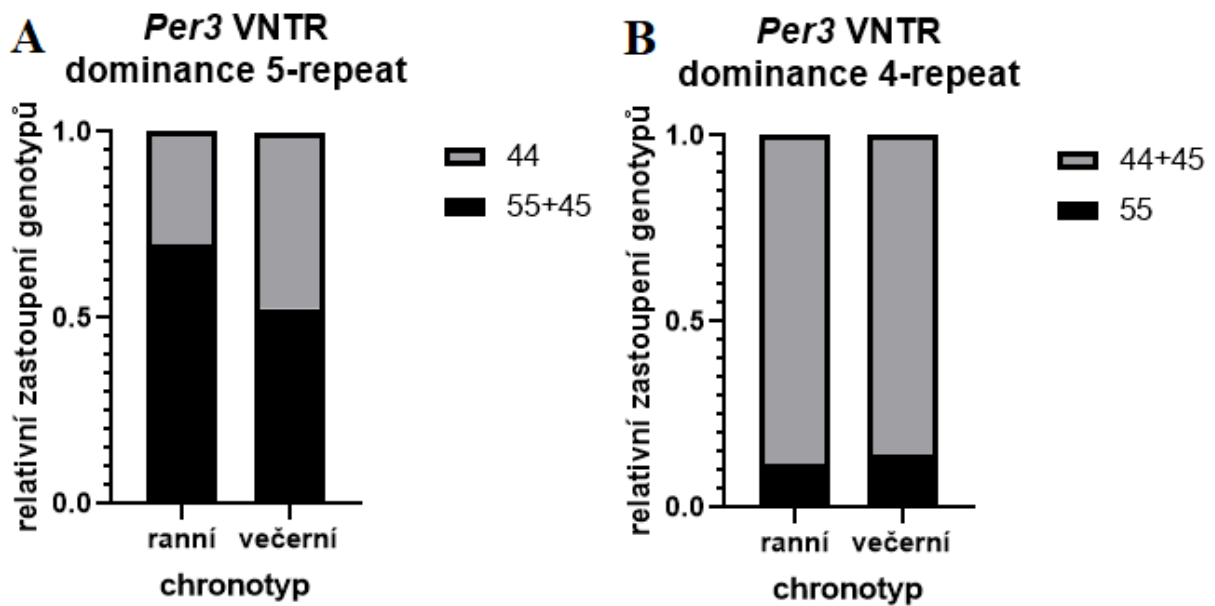


Obrázek 13: Grafické vyjádření relativního zastoupení genotypů u ranního a večerního chronotypu. U ranního typu je „44“ zastoupeno ze 30 %, „45“ z 58 % a „55“ z 12 %. U večerního typu je „44“ zastoupeno z 48 %, „45“ z 38 % a „55“ z 14 %.

Pro další analýzu jsme sloučili genotypy jako „44 vs. 45 + 55“ (dominance alely „5R“ – tabulka 6A) a „44 + 45 vs. 55“ (dominance alely „4R“ – tabulka 6B). Vyobrazení relativního zastoupení sloučených genotypů mezi chronotypy vyjadřuje obrázek 14A a 14B.

A)	<i>Per3</i>	55+45	44	celkem	B)	<i>Per3</i>	55	45+44	celkem
	<i>ranní</i>	30	13	43		<i>ranní</i>	5	38	43
	<i>večerní</i>	11	10	21		<i>večerní</i>	3	18	21
	<i>celkem</i>	41	23	64		<i>celkem</i>	8	56	64

Tabulka 6: **A)** Počet subjektů s dominancí alely „5R“: 55 + 45 vs. 44. Testem Chí kvadrát nebyl žádný signifikantní výsledek prokázán. **B)** Počet subjektů s dominancí alely „4R“: 55 vs. 45 + 44. Testem Chí kvadrát nebyl žádný signifikantní výsledek prokázán.



Obrázek 14: Grafické zobrazení vyjadřující poměr genotypů u ranního a u večerního chronotypu. **A)** Dominance alely „5R (5-repeat)“: „55 + 45 vs. 44“. U ranního typu: (55+45) z 70 % a „44“ z 30 %. U večerního typu je genotyp (55 + 45) z 52 % a „44“ z 48 %. **B)** Dominance alely „4R (4-repeat)“: „55 vs. 45 + 44“. U ranního typu: „55“ z 12 % a (45 + 44) z 88 %. U večerního typu je „55“ z 14 % a (45 + 44) z 86 %.

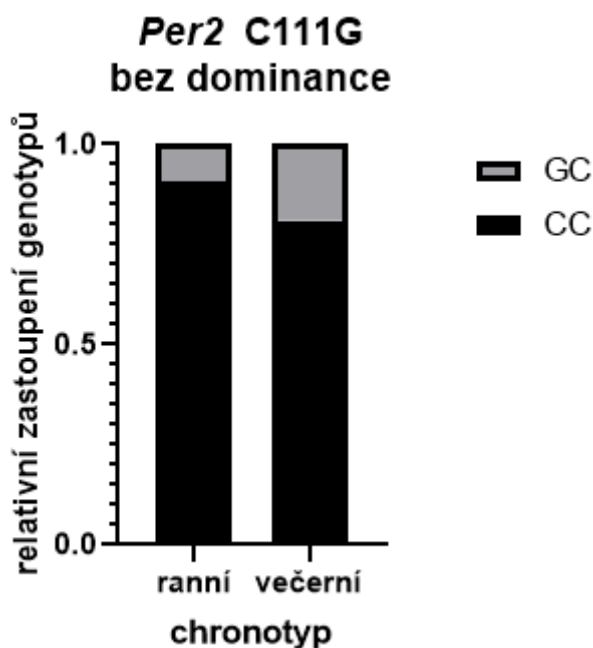
Obrázek 14A naznačuje mírný trend v asociaci alely „5R“ s ranním typem, Chí kvadrát testem jsme však žádnou významnou vazbu mezi oběma faktory neprokázali ($p = 0,1735$).

6.2.3. SNP C111G genu *Per2*

Očekávali jsme, že u genu *Per2* odhalíme pomocí sekvenace tři typy genotypů: CC, CG a GG. Žádného jedince s hledaným polymorfismem „GG“ jsme nedetkovali. Analýza testem Chí kvadrát neodhalila žádnou signifikantní asociaci mezi genotypy a chronotypy (tabulka 7). Grafické vyobrazení je uvedeno na obr. 15.

<i>Per2</i>	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>celkem</i>
<i>ranní</i>	39	4	43
<i>večerní</i>	17	4	21
<i>celkem</i>	56	8	64

Tabulka 7: V tabulce je uveden počet subjektů s genotypy *CC* a *CG* a jejich rozdělení na ranní či večerní chronotyp. Žádná signifikantní asociace nebyla prokázána.



Obrázek 15: Grafické vyjádření relativního zastoupení genotypů u ranního a večerního chronotypu. U ranního typu je *CC* zastoupeno z 91 % a *CG* z 9 %. U večerního je *CC* zastoupeno z 81 % a *CG* z 19 %.

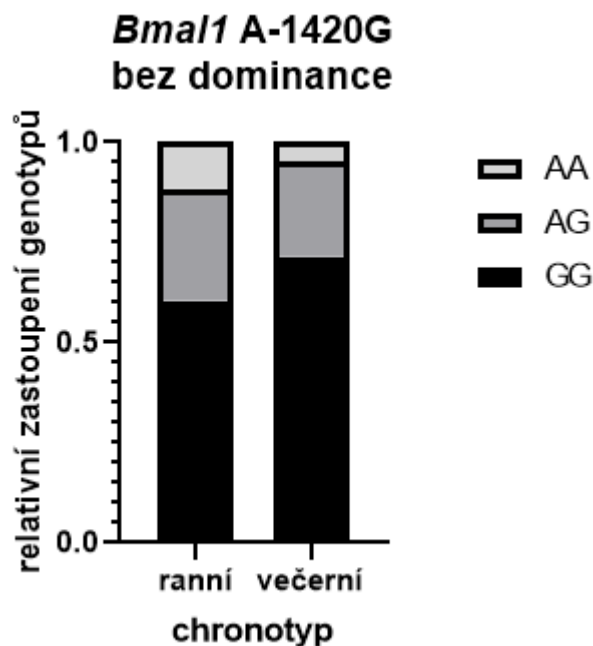
Pro další analýzu jsme žádné genotypy neslučovali, jelikož zde není zastoupení všech očekávaných genotypů.

6.2.4. SNP A-1420G genu *Bmal1*

Pro detekování SNP A-1420G genu *Bmal1* jsme zvolili opět sekvenační metodu, která odhalila genotypy GG/AG/AA (tabulka 8). Relativní zastoupení genotypů mezi extrémními chronotypy je graficky znázorněno na obr. 16.

<i>Bmal1</i>	<i>GG</i>	<i>AG</i>	<i>AA</i>	<i>celkem</i>
<i>ranní</i>	26	12	5	43
<i>večerní</i>	15	4	2	21
<i>celkem</i>	41	16	7	64

Tabulka 8: V tabulce je uveden počet subjektů s genotypy *GG/AG/AA* a jejich rozdělení na ranní či večerní chronotyp.



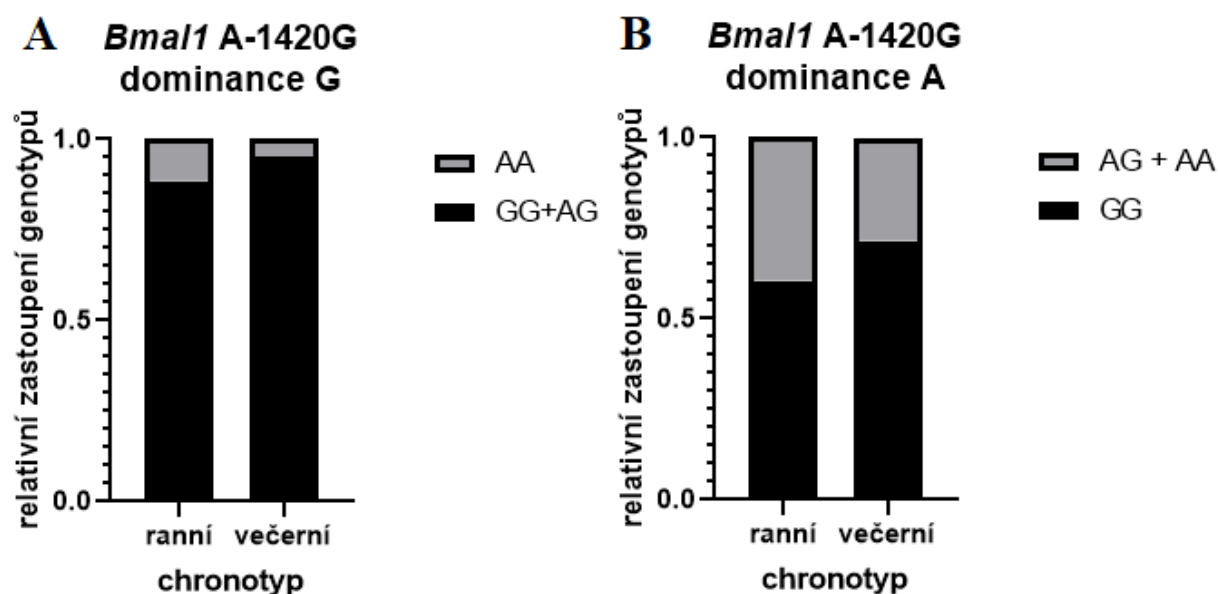
Obrázek 16: Grafické vyjádření relativního zastoupení genotypů u ranního a večerního chronotypu. U ranního typu je genotyp *GG* zastoupen z 60 %, genotyp *AG* z 28 % a *AA* z 12 %.

Podobně jako u předchozích genů, statistická analýza nepotvrdila žádnou asociaci mezi jednotlivými genotypy a chronotypem.

Dále jsme sloučili genotypy a testovali metodou Chí kvadrát asociaci dominantní alely s chronotypy (dominance alely *G*: tabulka 9A, obr. 17A; dominance alely *A*: tabulka 9B, obr. 17B).

A)	<i>Bmal1</i>	GG+AG	AA	celkem	B)	<i>Bmal1</i>	GG	AG+AA	celkem
	ranní	38	5	43		ranní	26	17	43
	večerní	20	1	21		večerní	15	6	21
	celkem	58	6	64		celkem	41	23	64

Tabulka 9: **A)** Počet subjektů s dominancí alely G: GG + AG vs. AA. Chi kvadrát test neprokázal žádný signifikantní výsledek. **B)** Počet subjektů s dominancí alely A: GG vs. AG + AA. Opět nic signifikantního neprokázáno.



Obrázek 17: Grafické vyjádření vyjadřující poměr genotypů u ranního a u večerního chronotypu. **A)** Dominance alely G: „GG + AG vs. AA“. U ranního typu: (GG + AG) z 88 % a „AA“ ze 12 %. U večerního typu je genotyp (GG + AG) z 95 % a „AA“ z 5 %. **B)** Dominance alely A: „GG vs. AG + AA“. U ranního typu: „GG“ z 60 % a (AG + AA) ze 40 %. U večerního typu je „GG“ ze 71 % a (AG + AA) z 29 %.

V žádné z variant předpokládané dominance jedné z alel (tabulka 9A a 9B) jsme žádnou signifikantní asociaci u SNP A-1420G genu *Bmal1* neprokázali.

6.3. Analýza vztahu mezi provázanými polymorfismy na úrovni dvojic s ranním či večerním chronotypem

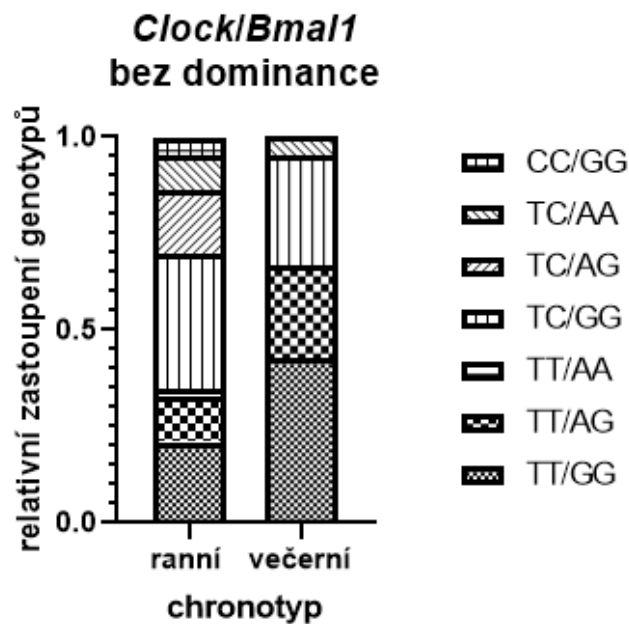
Signifikantní asociaci mezi jednotlivými polymorfismy a chronotypem jsme potvrdili pouze u SNP T3111C v genu *Clock*. V následné analýze jsme testovali provázanost mezi polymorfismy na úrovni dvojic a snažili se potvrdit asociaci chronotypu s některou ze zjištěných genotypových kombinací.

6.3.1. Kombinace *Clock* – *Bmal1*

Tabulka 10 zahrnuje kombinace všech analyzovaných genotypů bez dominance některé alely. Provedli jsme statistickou analýzu využitím Chí kvadrát testu, výsledek však nebyl signifikantní a ukazuje, že žádná kombinace genotypů genů *Clock/Bmal1* neasociuje s ranním či večerním chronotypem. Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací genotypů je na obr. 18.

<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/GG</i>	<i>TT/AG</i>	<i>TT/AA</i>	<i>TC/GG</i>	<i>TC/GA</i>	<i>TC/AA</i>	<i>CC/GG</i>
<i>Ranní</i>	9	5	1	15	7	4	2
<i>večerní</i>	9	5	0	6	0	1	0

Tabulka 10: Tabulka vyjadřuje možné kombinace genotypů genů *Clock/Bmal1* u ranních a večerních chronotypů, které jsme našli. Neodhalili jsme žádné respondenty s kombinací *CC/AG* a *CC/AA*.



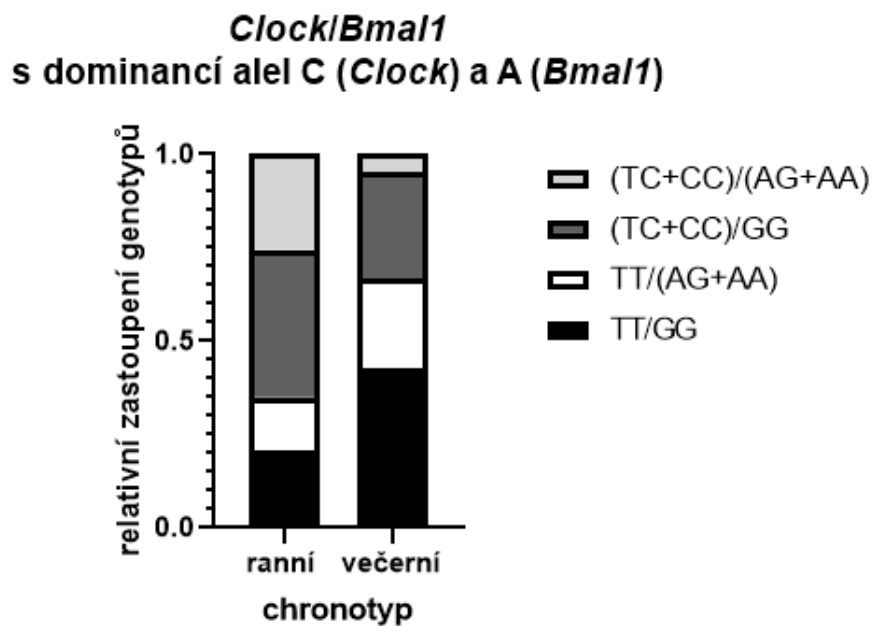
Obrázek 18: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Clock/Bmal1*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: *CC/GG* z 5 %, *TC/AA* z 9 %, *TC/AG* z 16 %, *TC/GG* z 35 %, *TT/AA* z 2 %, *TT/AG* z 12 % a *TT/GG* z 21 %. U večerního: *TC/AA* z 5 %, *TC/GG* z 28 %, *TT/AG* z 24 % a *TT/GG* z 43 %.

Z výsledků, které jsou popsány v předchozí kapitole, vyplývá, že u SNP T3111C v genu *Clock* existuje signifikantní asociace dominantní alely C (GG vs. TC + CC) s ranním chronotypem. V další analýze kombinovaných dvojic jsme proto pracovali s touto dominancí. U genu *Bmal1* se sice žádný signifikantní výsledek neprokázal, nicméně při pohledu na relativní rozložení alel z grafů 12 a 13 se zdá vhodnější pracovat s dominancí alely A

(GG vs. AG + AA). Proto jsme pracovali s kombinacemi, které zahrnovaly u genu *Clock* dominanci alely C a u genu *Bmal1* dominanci alely A (tabulka 11 a obr. 19). Test Chí kvadrát neprokázal signifikantní asociaci v rozložení genotypů mezi chronotypy. Vypočítaná pravděpodobnost (p) je v tomto případě rovna 0,0737 a můžeme tedy konstatovat, že se blíží k pravděpodobnosti 0,05, což je prahová hodnota pro indikaci statistické významnosti testovaného předpokladu. Grafické vyjádření je na obr. 19.

<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/GG</i>	<i>TT/(AG+AA)</i>	<i>(TC+CC)/GG</i>	<i>(TC+CC)/(AG+AA)</i>
<i>ranní</i>	9	6	17	11
<i>večerní</i>	9	5	6	1

Tabulka 11: V tabulce jsou uvedené kombinace s uvažovanou dominancí alel u obou genů, tzn. skupina respondentů s genotypem *TT* u genu *Clock* a genotypem *GG* u genu *Bmal1*, dále skupina respondentů s genotypem *TT* a zároveň genotypem *AA* nebo *AG* (uvažujeme efekt dominance alely *A*) a další.

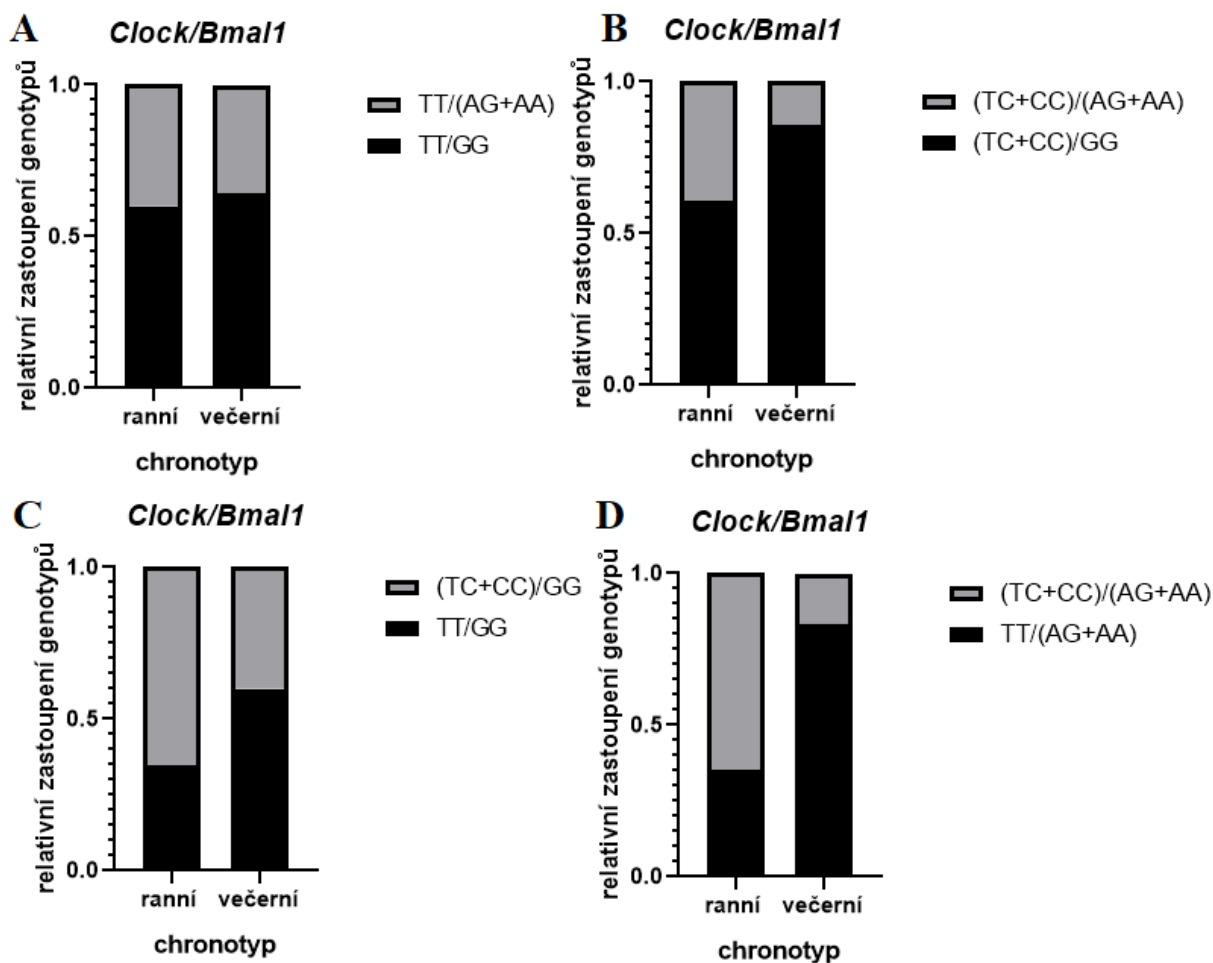


Obrázek 19: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů s dominancí alely C u genu *Clock* a alely A u genu *Bmal1* mezi chronotypy. U ranního typu jsou genotypy: $(TC + CC) / (AG + AA)$ z 26 %, $(TC + CC) / GG$ z 39 %, $TT / (AG + AA)$ z 14 %, TT/GG z 21 %. U večerního: $(TC + CC) / (AG + AA)$ z 5 %, $(TC + CC) / GG$ z 28 %, $TT / (AG + AA)$ z 24 %, TT/GG z 43 %.

Ačkoliv jsme v komplexní analýze neprokázali žádný signifikantní vztah, pokusili jsme se o analýzu dle efektu jednotlivých alel – tj. sestavili jsme 4 varianty, které vždy porovnávali dvě skupiny, u kterých byl shodný genotyp u jednoho z hodinových genů (tabulka 12A/B/C/D). Grafické vyjádření relativního zastoupení genotypů u extrémních chronotypů je vyobrazeno na obr. 20A/B/C/D.

A	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/GG</i>	<i>TT/(AG+AA)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	9	6	15
	<i>večerní</i>	9	5	14
	<i>celkem</i>	18	11	29
B	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>(TC+CC)/GG</i>	<i>(TC+CC)/(AG+AA)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	17	11	28
	<i>večerní</i>	6	1	7
	<i>celkem</i>	23	12	35
C	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/GG</i>	<i>(TC+CC)/GG</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	9	17	26
	<i>večerní</i>	9	6	15
	<i>celkem</i>	18	23	41
D	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/(AG+AA)</i>	<i>(TC+CC)/(AG+AA)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	6	11	17
	<i>večerní</i>	5	1	6
	<i>celkem</i>	11	12	23

Tabulka 12: V tabulce je uveden počet subjektů u analyzovaných genotypů, kde jsme porovnávali kombinace genotypů SNP u genů *Clock* vs. *Bmal1*: **A**) „*TT/GG* vs. *TT / (AG + AA)*“ **B**) „*(TC + CC) / GG* vs. *(TC + CC) / (AG + AA)*“ **C**) „*TT/GG* vs. *(TC + CC) / GG*“ **D**) „*TT / (AG + AA)* vs. *(TC + CC) / (AG + AA)*“. Chí kvadrát testem prokázáno signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy. Korelace ranního typu s variantou „*(TC+CC)/(AG+AA)*“ je vyznačena tučně.



Obrázek 20: Grafické znázornění relativního zastoupení genotypů genů *Clock/Bmal1*. Sestavili jsme 4 kombinace, kde jsou vždy porovnávány dvě varianty, u kterých je vždy shodný genotyp u jednoho z hodinových genů: **A** „TT / (AG + AA) vs. TT/GG“ **B** „(TC + CC) / (AG + AA) vs. (TC + CC) / GG“ **C** „(TC + CC) / GG vs. TT/GG“ **D** „TT/(AG+AA)“ vs. „(TC+CC) / (AG+AA)“.

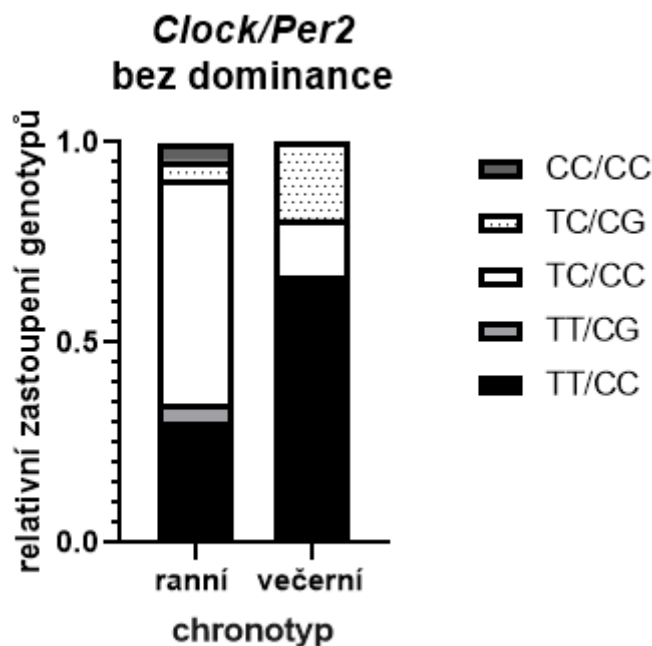
Z grafů na obr. 20A a 20C by se mohlo zdát, že kombinace genotypu TT genu *Clock* a genotypu GG genu *Bmal1*, mohou příslušet večernímu chronotypu, signifikantně se pomocí Chí kvadrát testu prokázala asociace s chronotypem pouze u kombinace poslední (tabulka 12D, obr. 20D). Analyzovali jsme zde kombinaci „(TC + CC) / (AG + AA)“ vs. „(TC + CC) / GG“. Provedením Chí kvadrát testu jsme prokázali signifikantní asociaci a ukázali, že kombinace „(TC + CC) / (AG + AA)“ asociuje s ranním typem ($p = 0,0428$), což pravděpodobně souvisí s předchozím zjištěním, že alela C v genu *Clock* odpovídá spíše rannímu chronotypu.

6.3.2. Kombinace *Clock* – *Per2*

Ve dvojici genů *Clock/Per2* jsme opět sestavili možné kombinace. Jak již bylo uvedeno v kapitole 6.2.3, nebyl nalezen žádný subjekt s genotypem GG genu *Per2*. V tabulce 13 jsou uvedeny všechny testované kombinace. Chí kvadrát test prokázal signifikantní rozložení genotypů mezi chronotypy ($p = 0,0042$). Na základě rozložení hodnot odpovídá varianta „TC/CC“ (*Clock/Per2*) rannímu typu. Relativní zastoupení všech kombinací genotypů mezi chronotypy je graficky znázorněno na obr. 21.

<i>Clock/Per2</i>	TT/CC	TT/CG	TC/CC	TC/CG	CC/CC
ranní	13	2	24	2	2
večerní	14	0	3	4	0

Tabulka 13: Tabulka vyjadřuje všechny možné kombinace genotypů genů *Clock/Per2* u ranních a večerních chronotypů, které jsme našli. Z analýzy vyplývá, že varianta „TC/CC“ signifikantně převažuje u ranního typu ($p = 0,0042$) – vyznačeno tučně.



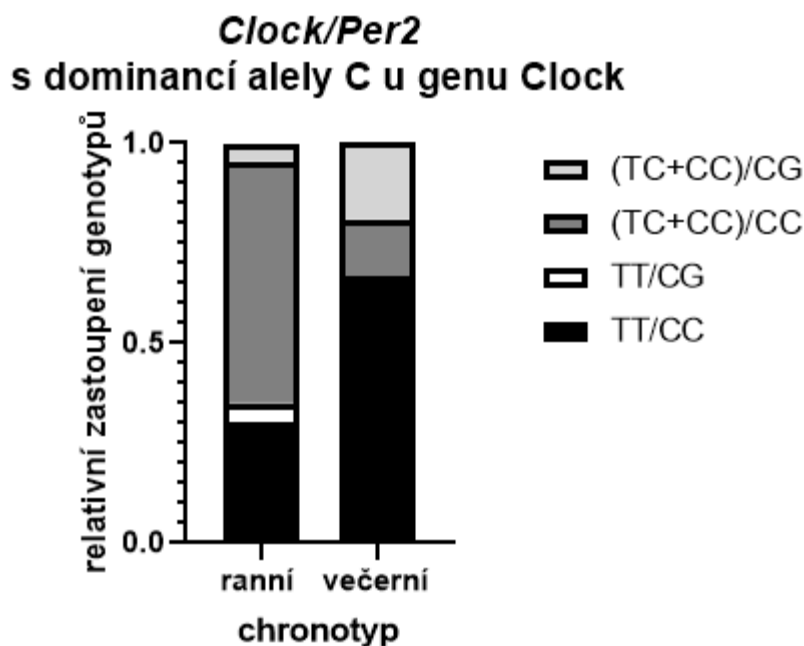
Obrázek 21: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Clock/Per2*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: CC/GG z 5 %, TC/AA z 9 %, TC/AG z 16 %, TC/GG z 35 %, TT/AA z 2 %, TT/AG z 12 % a TT/GG z 21 %. U večerního: TC/AA z 5 %, TC/GG z 28 %, TT/AG z 24 % a TT/GG z 43 %.

Dále jsme testovali kombinace, kde jsme uvažovali dominanci pouze u genu *Clock*: TT vs. TC + CC. U genu *Per2* jsme pracovali s genotypy „CC a CG“. Test Chí kvadrát zde

označil rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy ($p = 0,0017$). Na základě toho předpokládáme, že varianta „(TC+CC)/CC“ odpovídá rannímu typu, a že se opět projevuje asociace dominantní alely C u genu *Clock* s ranním chronotypem (tabulka 14 a obr. 22).

<i>Clock/Per2</i>	<i>TT/CC</i>	<i>TT/CG</i>	(TC+CC)/CC	<i>(TC+CC)/CG</i>
ranní	13	2	26	2
večerní	14	0	3	4

Tabulka 14: V tabulce je uvedený počet ranních a večerních subjektů s danou variantou genotypu. Tučně je vyznačena signifikantní asociace varianty „(TC+CC)/CC“ genů *Clock/Per2* s ranním chronotypem.



Obrázek 22: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů s dominancí alely C u genu *Clock* mezi chronotypy. U ranního chronotypu jsou genotypy zastoupeny: (TC + CC) / CG z 5 %, (TC + CC) / CC z 60 %, TT/CG z 5 %, TT/CC z 30 %. U večerního: (TC + CC) / CG z 19 %, (TC + CC) / CC z 14 %, TT/CC z 67 %.

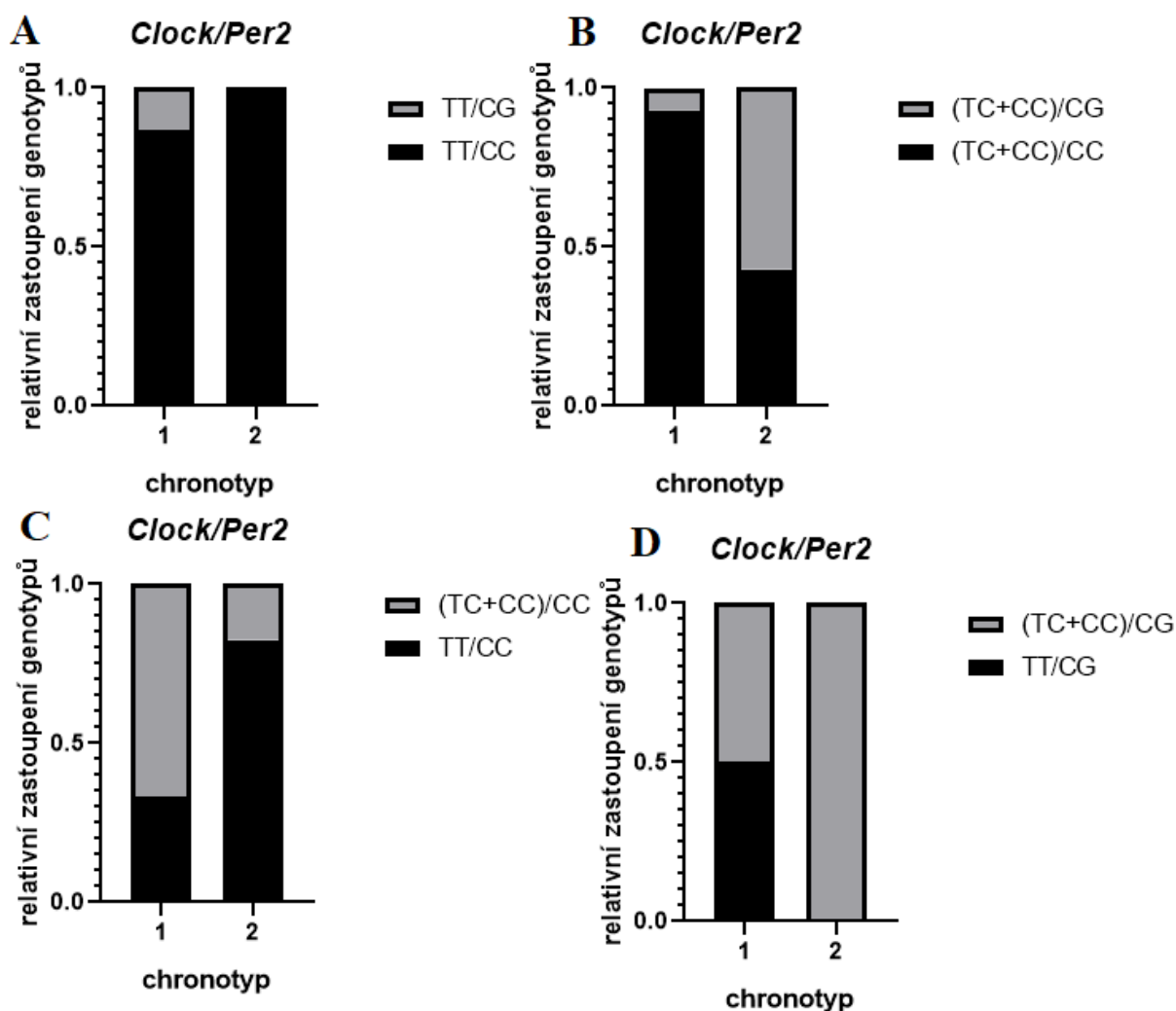
Stejně jako u předchozí dvojice genů, jsme sestavili jsme 4 kombinace po dvou variantách genotypů (*Clock/Per2*), kde byl vždy u obou variant jeden genotyp jednoho z genů shodný (tabulka 15).

A	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>TT/CG</i>	<i>TT/CC</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	2	13	15
	<i>večerní</i>	0	14	14
	<i>celkem</i>	2	27	29
B	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>(TC+CC)/CG</i>	<i>(TC+CC)/CC</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	2	26	28
	<i>večerní</i>	4	3	7
	<i>celkem</i>	6	29	35
C	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>(TC+CC)/CC</i>	<i>TT/CC</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	26	13	39
	<i>večerní</i>	3	14	17
	<i>celkem</i>	29	27	56
D	<i>Clock/Bmal1</i>	<i>(TC+CC)/CG</i>	<i>TT/CG</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	2	2	4
	<i>večerní</i>	4	0	4
	<i>celkem</i>	6	2	8

Tabulka 15: V tabulce je uveden počet subjektů u analyzovaných genotypů, kde jsme porovnávali kombinace genotypů SNP u genů *Clock* vs. *Per2*: **A**) „*TT/CG* vs. *TT/CC*“ **B**) „*(TC + CC) / CG* vs. *(TC + CC) / CC*“ *Chi* kvadrát testem prokázán signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy. Korelace ranního typu s variantou „*(TC+CC) / CC*“ je vyznačena tučně ($p = 0,0017$). **C**) „*(TC + CC) / CC* vs. *TT/CC*“ *Chi* kvadrát testem prokázán signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy. Korelace ranního typu s variantou „*(TC+CC) / CC*“ je vyznačena tučně ($p = 0,0007$). **D**) „*(TC + CC) / CG* vs. *TT/CG*“.

Všechny varianty (tabulka 15 A/B/C/D) jsme otestovali metodou *Chi* kvadrát, který signifikantně označil rozložení genotypů mezi chronotypy ve dvou případech: tabulka 15B ($p = 0,0017$) a 15C ($p = 0,0007$). U obou z nich lze říct, že varianta „*(TC + CC) / CC*“ asociuje s ranním typem. Mezi našimi subjekty jsme však determinovali pouze 8 respondentů (z toho 4 ranní a 4 večerní) s genotypem CG, jak je uvedeno v tabulce 7 (kapitola 6.2.3) a žádného s genotypem GG.

Grafické vyjádření relativního rozložení genotypů mezi chronotypy je znázorněno na obr. 23A/B/C/D.



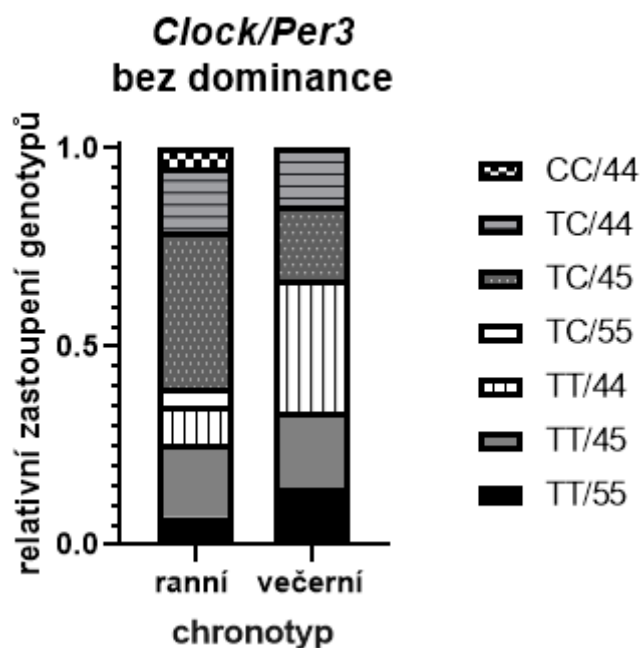
Obrázek 23: Grafické znázornění relativního zastoupení genotypů genů *Clock/Per2*. Sestavili jsme 4 kombinace, kde jsou vždy porovnávány dvě varianty, u kterých je vždy shodný genotyp u jednoho z hodinových genů: **A)** „*TT/CG* vs. *TT/CC*“ **B)** „*(TC + CC) / CG* vs. *(TC + CC) / CC*“ **C)** „*(TC + CC) / CC* vs. *TT/CC*“ **D)** „*(TC + CC) / CG*“ vs. „*TT/CG*“.

6.3.3. Kombinace *Clock – Per3*

Kombinace genotypů genů *Clock/Per3* bez předpokládané dominance některé z alel jsou uvedeny tabulce 16. Relativní zastoupení kombinací genotypů mezi chronotypy je graficky vyjádřeno na obr. 24. Test Chí kvadrát neprokázal žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy.

<i>Clock/Per3</i>	<i>TT/55</i>	<i>TT/45</i>	<i>TT/44</i>	<i>TC/55</i>	<i>TC/45</i>	<i>TC/44</i>	<i>CC/44</i>
<i>ranní</i>	3	8	4	2	17	7	2
<i>večerní</i>	3	4	7	0	4	3	0

Tabulka 16: V tabulce je uvedený počet respondentů s danou kombinací genotypů genů *Clock/Per3*. Žádná signifikantní korelace nebyla prokázána.



Obrázek 24: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Clock/Per3*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: *CC/44* z 5 %, *TC/44* z 16 %, *TC/45* z 39,5 %, *TC/55* z 5 %, *TT/44* z 9 %, *TT/45* z 18,5 % a *TT/55* z 7 %. U večerního: *TC/44* z 14 %, *TC/45* z 19 %, *TT/44* z 34 %, *TT/45* z 19 % a *TT/55* z 14 %.

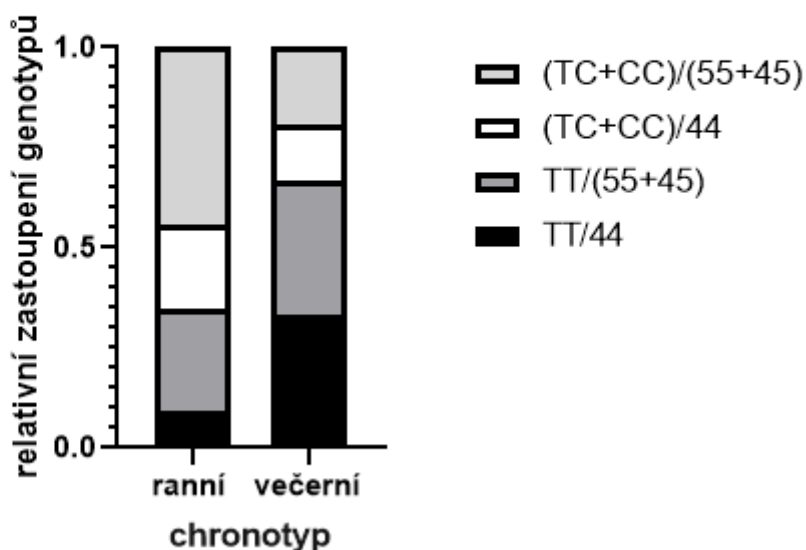
Podobně jako v předchozích případech jsme se do analýzy zahrnuly vliv dominantních alel u obou genů. V případě genu *Clock* jsme v analýzách pracovali s dominantní alelou C: „TT vs. (TC + CC)“. U genu *Per3* sice nebyla prokázána žádná signifikantní asociace, ale z obrázku 14 (kapitola 6.2.2) je patrné, že je vhodné analyzovat data, kde bude dominantní alela „5R“: „(55 + 45) vs. 44“.

V tabulce 17 je uvedený počet respondentů všech kombinací genotypů se zahrnutými dominantcemi. Chi kvadrát testem jsme prokázali signifikantní rozdíl v rozložení těchto kombinací genotypů mezi chronotypy ($p = 0,0491$). Na základě rozložení genotypů mezi chronotypy, můžeme konstatovat, že kombinace „(TC + CC) / (55 + 45)“ odpovídá rannímu typu. Grafické rozdělení genotypů mezi chronotypy je uvedeno na obr. 25.

<i>Clock/Per3</i>	<i>TT/44</i>	<i>TT/(55+45)</i>	<i>(TC+CC)/44</i>	<i>(TC+CC)/(55+45)</i>
ranní	4	11	9	19
večerní	7	7	3	4

Tabulka 17: V tabulce je uvedený počet ranních a večerních subjektů s danou variantou genotypu. Tučně je vyznačena signifikantní asociace varianty „(TC+CC) / (55 + 45)“ genů *Clock/Per3* s ranním chronotypem.

Clock/Per3 **s dominantí alely C (*Clock*) a alely 5-repeat (*Per3*)**

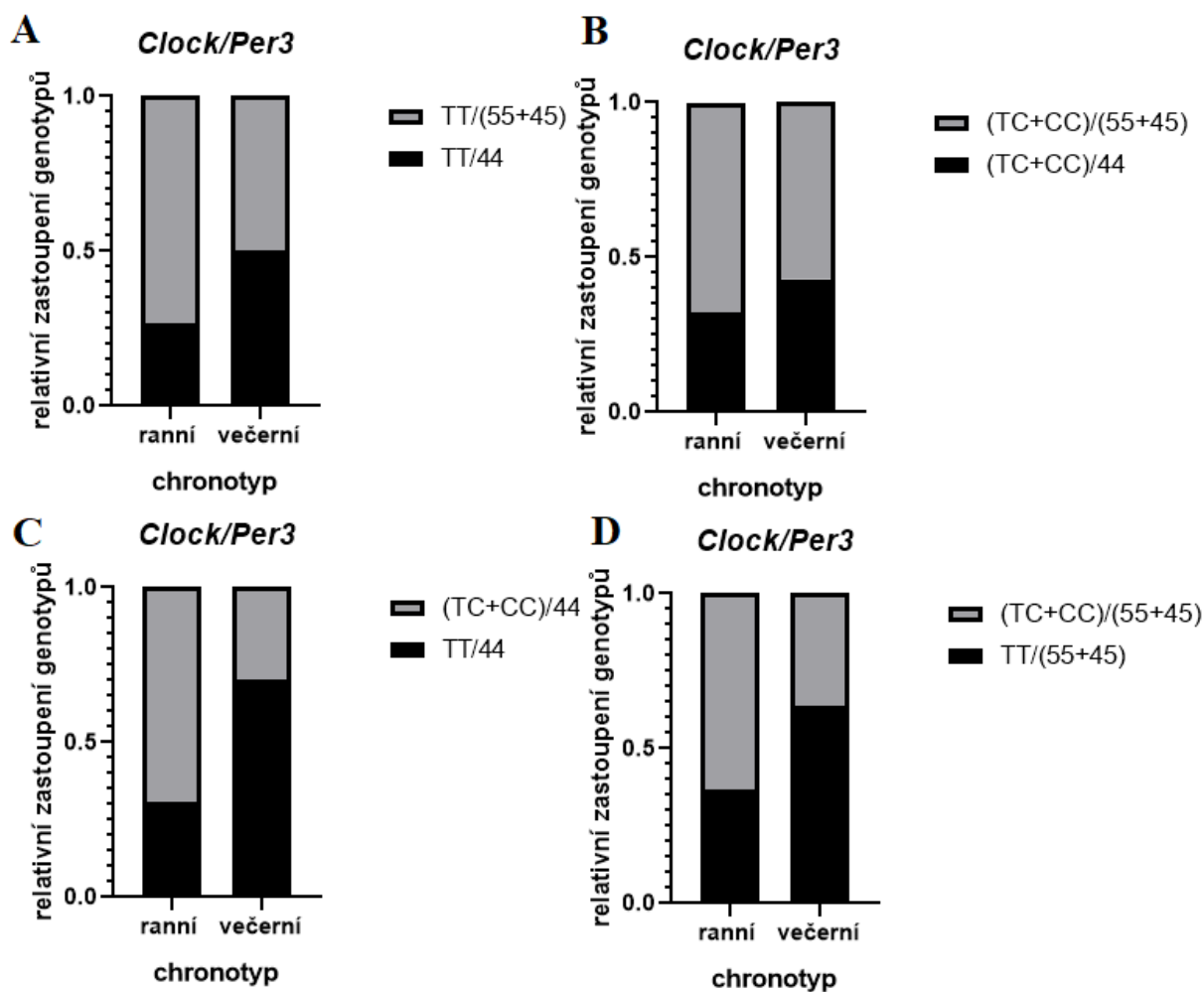


Obrázek 25: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů s dominantí alely C u genu *Clock* a alely „5R“ u genu *Per3* mezi chronotypy. U ranního chronotypu jsou zastoupeny genotypy: (TC + CC) / (55 + 45) ze 44 %, (TC + CC) / 44 ze 21 %, TT / (55 + 45) ze 26 %, TT/44 ze 9 %. U večerního: (TC + CC) / (55 + 45) ze 19 %, (TC + CC) / 44 ze 14 %, TT / (55 + 45) ze 33 % a TT/44 ze 33 %.

Opět jsme sestavili jsme 4 kombinace po dvou variantách genotypů (*Clock/Per3*), kde byl vždy u obou variant jeden genotyp jednoho z genů shodný (tabulka 18, obr. 26). Testem Chí kvadrát jsme však neprokázali žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy.

A	<i>Clock/Per3</i>	<i>TT/44</i>	<i>TT/(55+45)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	4	11	15
	<i>večerní</i>	7	7	14
	<i>celkem</i>	11	18	29
B	<i>Clock/Per3</i>	<i>(TC+CC)/44</i>	<i>(TC+CC)/(55+45)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	9	19	28
	<i>večerní</i>	3	4	7
	<i>celkem</i>	12	23	35
C	<i>Clock/Per3</i>	<i>TT/44</i>	<i>(TC+CC)/44</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	4	9	13
	<i>večerní</i>	7	3	10
	<i>celkem</i>	11	12	23
D	<i>Clock/Per3</i>	<i>TT/(55+45)</i>	<i>(TC+CC)/(55+45)</i>	<i>celkem</i>
	<i>ranní</i>	11	19	30
	<i>večerní</i>	7	4	11
	<i>celkem</i>	18	23	41

Tabulka 5: V tabulce je uveden počet subjektů u analyzovaných genotypů, kde jsme porovnávali kombinace genotypů SNP u genů *Clock* vs. *Per3*: **A**) „*TT/44* vs. *TT / (55 + 45)*“ **B**) „*(TC + CC) / 44* vs. *(TC + CC) / (55 + 45)*“ **C**) „*TT/44* vs. *(TC + CC) / 44*“ **D**) „*TT / (55 + 45)* vs. *(TC + CC) / (55 + 45)*“. Žádný signifikantní vztah nebyl prokázán.



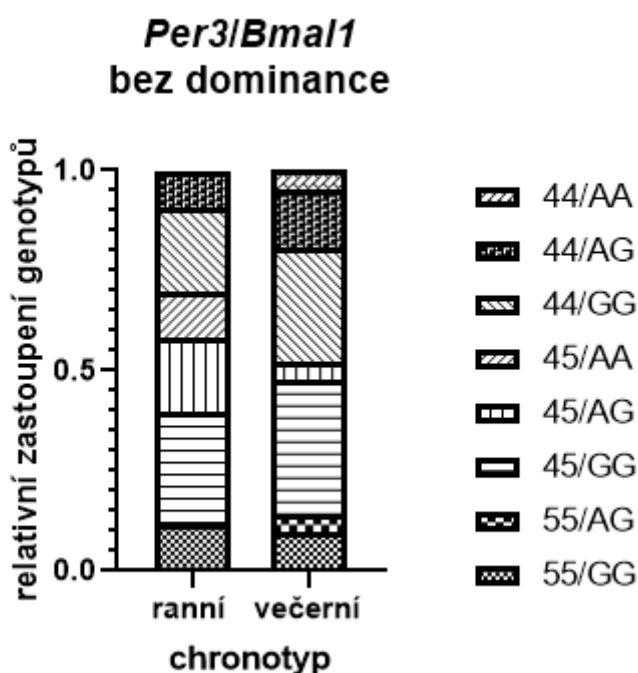
Obrázek 26: Grafické znázornění relativního zastoupení genotypů genů *Clock/Per3*. Sestavili jsme 4 kombinace, kde jsou vždy porovnávány dvě varianty, u kterých je vždy shodný genotyp u jednoho z hodinových genů: **A**) „*TT* / (55 + 45) vs. *TT* / 44“ **B**) „(*TC* + *CC*) / (55 + 45) vs. (*TC* + *CC*) / 44“ **C**) „(*TC* + *CC*) / 44 vs. *TT* / 44“ **D**) „(*TC* + *CC*) / (55 + 45)“ vs. „*TT* / (55 + 45)“.

6.3.4. Kombinace *Per3* – *Bmall*

U dvojice *Per3/Bmall* jsme u jednotlivých kombinací genotypů (bez uvažované dominance) žádnou signifikantní asociaci neprokázali (tabulka 19), grafické vyjádření rozdělení genotypů mezi chronotypy je na obr. 27.

<i>Per3/Bmal1</i>	55/GG	55/AG	45/GG	45/AG	45/AA	44/GG	44/AG	44/AA
ranní	5	0	12	8	5	9	4	0
večerní	2	1	7	1	0	6	3	1

Tabulka 19: V tabulce je uvedený počet respondentů s danou kombinací genotypů genů *Per3/Bmal1*. Žádná signifikantní korelace nebyla prokázána.



Obrázek 27: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Per3/Bmal1*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: 44/AG z 9 %, 44/GG z 21 %, 45/AA z 11,5 %, 45/AG z 19 %, 45/GG z 28 % a 55/GG z 11,5 %. U večerního: 44/AA z 5 %, 44/AG z 14 %, 44/GG z 28,5 %, 45/AG z 5 %, 45/GG z 33 %, 55/AG z 5 % a 55/GG z 9,5 %.

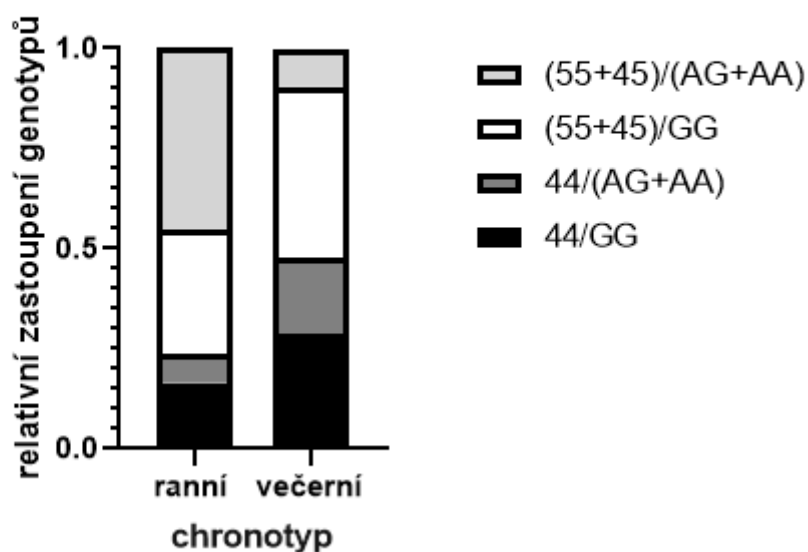
I u této kombinace jsme se do analýzy zahrnuli vliv dominantních alel u obou genů. V případě genu *Per3* jsme v analýzách pracovali s dominantní alelou „5R“: „(55 + 45) vs. 44“ a v případě genu *Bmal1* jsme pracovali s dominantní alelou A: „GG vs. (AG + AA)“.

V tabulce 20 je uvedený počet respondentů všech kombinací genotypů se zahrnutými dominantcemi. Chí kvadrát testem jsme prokázali signifikantní rozdíl v rozložení těchto kombinací genotypů mezi chronotypy ($p = 0,0255$). Na základě rozložení genotypů mezi chronotypy, můžeme konstatovat, že kombinace „(55 + 45) / (AG + AA)“ asociuje s ranním typem. Grafické rozdělení genotypů (s dominantními alelami) mezi chronotypy je uvedeno na obr. 28.

<i>Per3/Bmal1</i>	44/GG	44/(AG+AA)	(55+45)/GG	(55+45)/(AG+AA)
ranní	9	4	17	25
večerní	6	4	9	2

Tabulka 20: V tabulce je uvedený počet ranních a večerních subjektů s danou variantou genotypu. Korelace ranního typu s variantou „(55+45) / (AG+AA)“ je vyznačena tučně.

Per3/Bmal1 s dominancí alely 5 (*Per3*) a alely A (*Bmal1*)



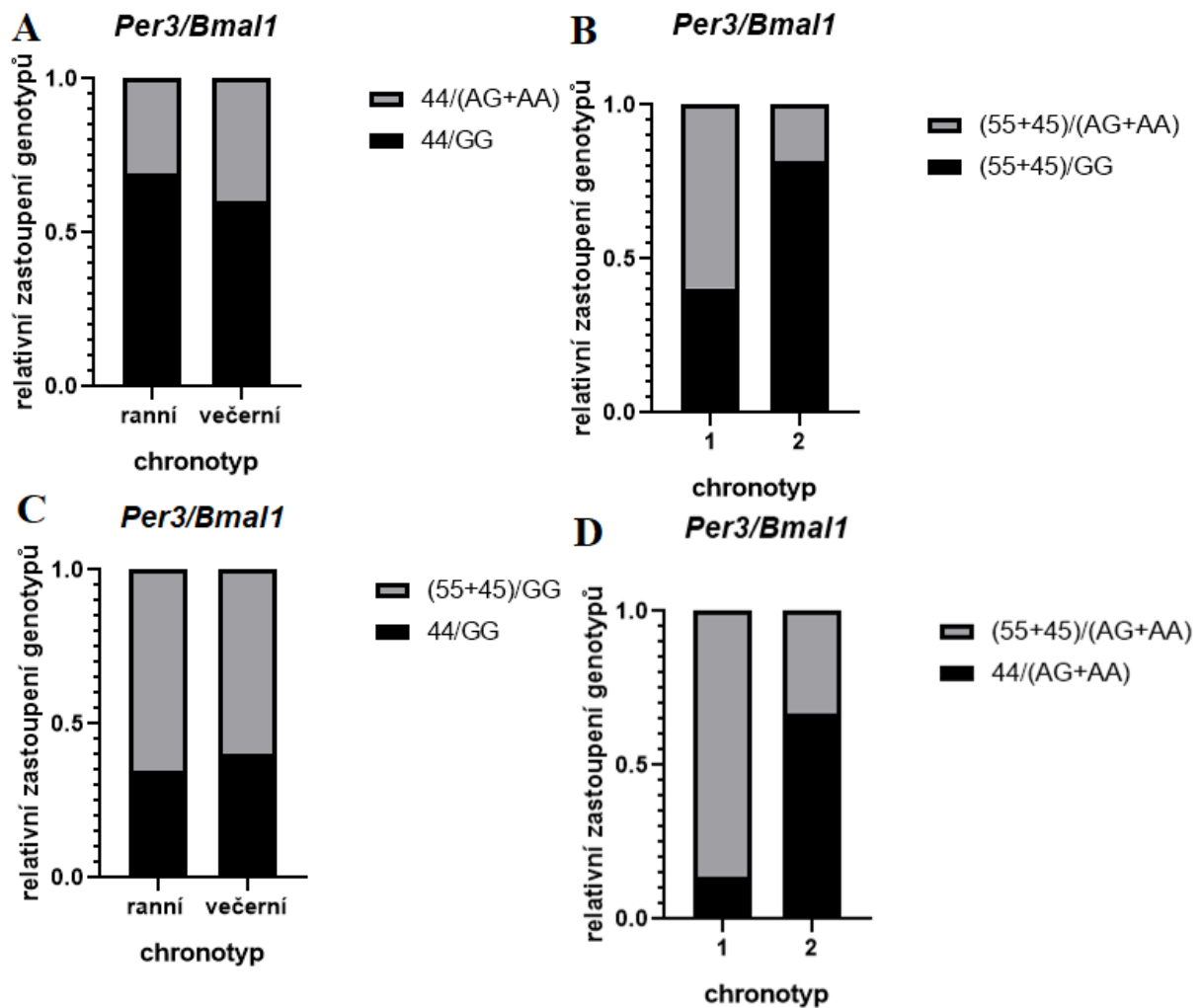
Obrázek 28: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů s dominancí alely „5R“ u genu *Per3* a alely A u genu *Bmal1* mezi chronotypy. U ranního chronotypu jsou zastoupeny genotypy: (55 + 45) / (AG + AA) z 46 %, (55 + 45) / GG z 31 %, 44 / (AG + AA) ze 7 %, 44/GG z 16 %. U večerního: (55 + 45) / (AG + AA) z 9,5 %, (55 + 45) / GG z 43 %, 44 / (AG + AA) z 19 %, 44/GG z 28,5 %.

Dále jsme zase sestavili 4 kombinace po dvou variantách genotypů genů *Per3/Bmal1*, kde byl vždy u obou variant jeden genotyp jednoho z genů shodný (tabulka 21).

A	<i>Per3/Bmall</i>	44/GG	44/(AG+AA)	celkem
	<i>ranní</i>	9	4	13
	<i>večerní</i>	6	4	10
	<i>celkem</i>	15	8	23
B	<i>Per3/Bmall</i>	(55+45)/GG	(55+45)/(AG+AA)	celkem
	<i>ranní</i>	17	25	42
	<i>večerní</i>	9	2	11
	<i>celkem</i>	26	27	53
C	<i>Per3/Bmall</i>	44/GG	(55+45)/GG	celkem
	<i>ranní</i>	9	17	26
	<i>večerní</i>	6	9	15
	<i>celkem</i>	15	26	41
D	<i>Per3/Bmall</i>	44/(AG+AA)	(55+45)/(AG+AA)	celkem
	<i>ranní</i>	4	25	29
	<i>večerní</i>	4	2	6
	<i>celkem</i>	8	27	35

Tabulka 21: V tabulce je uveden počet subjektů u analyzovaných genotypů, kde jsme porovnávali kombinace genotypů SNP u genů *Per3* vs. *Bmall*: **A**) „44/GG vs. 44 / (AG + AA)“ **B**) „(55 + 45) / GG vs. (55 + 45) / (AG + AA)“ **Chi kvadrát testem prokázán signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy. Korelace ranního typu s variantou „(55 + 45) / (AG + AA)“ je vyznačena tučně (p = 0,0146).** **C**) „44/GG vs. (55 + 45) / GG“ **D**) „44 / (AG + AA) vs. (55 + 45) / (AG + AA)“. **Chi kvadrát testem prokázán signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy. Korelace ranního typu s variantou „(55 + 45) / (AG + AA)“ je vyznačena tučně (p = 0,0050).**

Všechny varianty (tabulka 21 A/B/C/D) jsme otestovali metodou Chí kvadrát, který signifikantně označil rozložení genotypů mezi chronotypy ve dvou případech: tabulka 21B ($p = 0,0146$) a 21D ($p = 0,0050$). U obou z nich lze říct, že varianta „(55 + 45) / (AG + AA)“ asociuje s ranním typem. U jednotlivých polymorfismů genů *Bmall* a *Per3* nebyla prokázána žádná signifikantní asociace s chronotypy, při přítomnosti obou alel však ano. Můžeme tedy konstatovat, že asociace alely „5R“ u VNTR polymorfismu genu *Per3* s ranním chronotypem, je podmíněna přítomností alely A u SNP A-1420G v genu *Bmall*. Grafické vyjádření relativního rozložení genotypů mezi chronotypy je znázorněno na obr. 29 A/B/C/D.



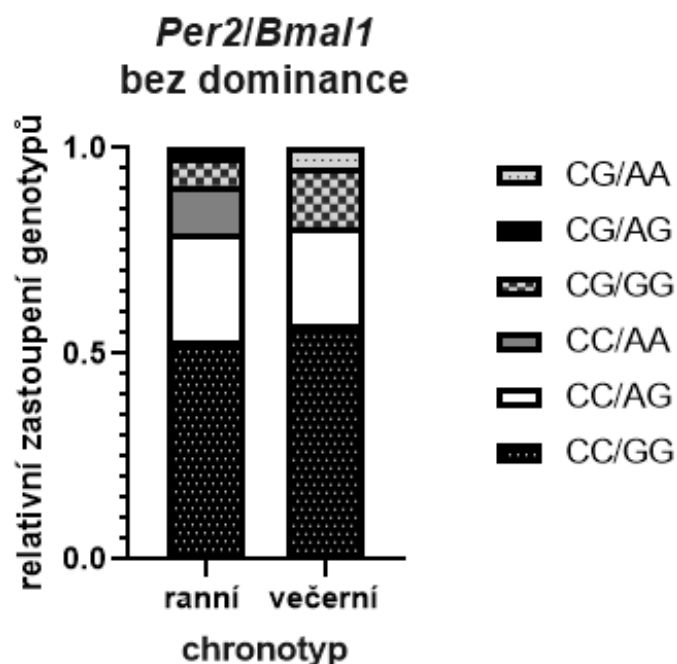
Obrázek 29: Grafické znázornění relativního zastoupení genotypů genů *Per3/Bmal1*. Sestavili jsme 4 kombinace, kde jsou vždy porovnávány dvě varianty, u kterých je vždy shodný genotyp u jednoho z hodinových genů: **A** „44 / (AG + AA) vs. 44/GG“ **B** „(55 + 45) / (AG + AA) vs. (55 + 45) / GG“ **C** „(55 + 45) / GG vs. 44/GG“ **D** „(55 + 45) / (AG + AA) vs. 44 / (AG + AA)“.

6.3.5. Kombinace *Per2 – Bmal1*

Per2/Bmal1 je dvojice genů, pro kterou jsme neprokázali žádný signifikantní výsledek. Nejprve jsme opět Chí kvadrát testem zjišťovali, zda nalezneme signifikantní rozdíl v rozložení kombinací genotypů, bez dominance, mezi extrémními chronotypy (tabulka 22). Grafické vyjádření je na obr. 30.

<i>Per2/Bmal1</i>	<i>CC/GG</i>	<i>CC/AG</i>	<i>CC/AA</i>	<i>CG/GG</i>	<i>CG/AG</i>	<i>CG/AA</i>
<i>ranní</i>	23	11	5	3	1	0
<i>večerní</i>	12	5	0	3	0	1

Tabulka 22: V tabulce je uvedený počet respondentů s danou kombinací genotypů genů *Per2/Bmal1*. Žádná signifikantní korelace nebyla prokázána.

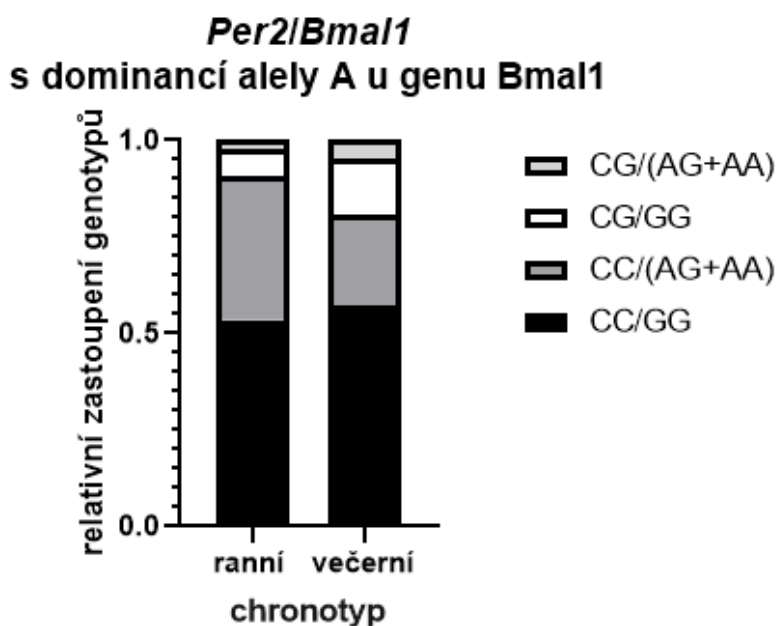


Obrázek 30: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Per2/Bmal1*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: *CG/AG* z 2 %, *CG/GG* ze 7 %, *CC/AA* z 12 %, *CC/AG* z 25,5 % a *CC/GG* z 53,5 %. U večerního: *CG/AA* z 5 %, *CG/GG* z 14 %, *CC/AG* z 24 % a *CC/GG* z 57 %.

Do následné analýzy jsme zahrnuli vliv dominantní alely A u genu *Bmal1*: „GG vs. (AG + AA)“. V případě genu *Per2* jsme v analýzách pracovali s genotypy „CC a CG“. V tabulce 23 je uvedený počet respondentů všech kombinací genotypů se zahrnutou dominancí. Chi kvadrát neprokázal žádný signifikantní rozdíl v rozložení těchto kombinací genotypů mezi chronotypy. Grafické vyjádření rozložení kombinací genotypů genů *Per2/Bmal1* je na obr. 31.

<i>Per2/Bmal1</i>	<i>CC/GG</i>	<i>CC/(AG+AA)</i>	<i>CG/GG</i>	<i>CG/(AG+AA)</i>
ranní	23	16	3	1
večerní	12	5	3	1

Tabulka 23: V tabulce je uvedený počet ranních a večerních subjektů s danou variantou genotypu. Žádná signifikantní asociace nebyla prokázána.



Obrázek 31: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů (*Per2/Bmal1*) s dominancí alely A u genu *Bmal1* mezi chronotypy. U ranního chronotypu jsou zastoupeny genotypy: *CG / (AG + AA)* z 2 %, *CG/GG* ze 7 %, *CC / (AG + AA)* z 37 %, *CC/GG* z 54 %. U večerního: *CG / (AG + AA)* z 5 %, *CG/GG* z 14 %, *CC / (AG + AA)* z 24 %, *CC/GG* z 57 %.

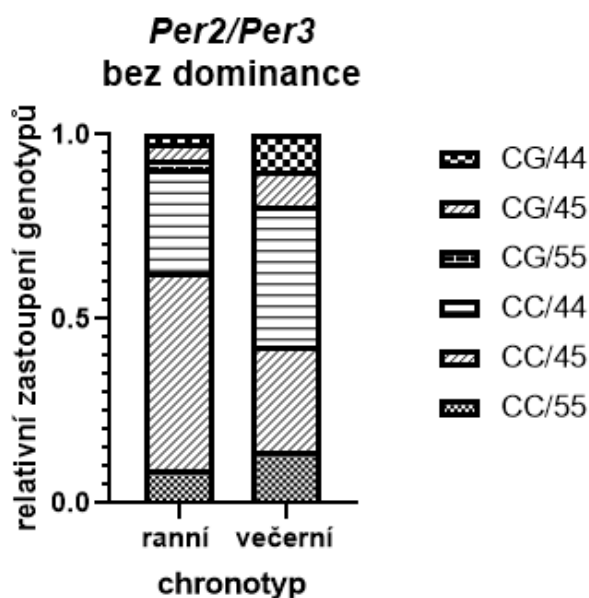
Opět jsme sestavili 4 kombinace po dvou variantách genotypů (*Per2/Bmal1*), kde byl vždy u obou variant jeden genotyp u jednoho z genů shodný. Testem Chí kvadrát jsme však neprokázali žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy.

6.3.6. Kombinace *Per2* – *Per3*

Poslední testovanou dvojicí byly geny *Per2/Per3*. Ani u této dvojice jsme neprokázali žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů, bez dominantní alely, mezi chronotypy (tabulka 24). Grafické vyobrazení je na obr. 32.

<i>Per2/Per3</i>	<i>CC/55</i>	<i>CC/45</i>	<i>CC/44</i>	<i>CG/55</i>	<i>CG/45</i>	<i>CG/44</i>
<i>ranní</i>	4	23	12	1	2	1
<i>večerní</i>	3	6	8	0	2	2

Tabulka 6: V tabulce je uvedený počet respondentů s danou kombinací genotypů genů *Per2/Per3*. Žádná signifikantní korelace nebyla prokázána.

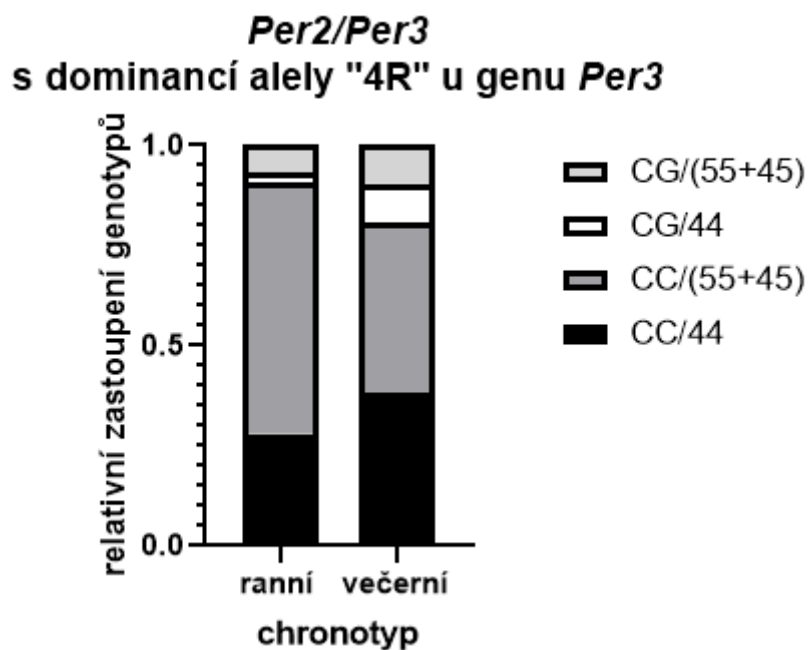


Obrázek 32: Grafické znázornění relativního zastoupení všech detekovaných kombinací genotypů (*Per2/Per3*) u ranního a večerního chronotypu. U ranního jsou genotypy zastoupeny: *CG/44* z 2 %, *CG/45* z 5 %, *CG/55* z 2 %, *CC/44* z 28 %, *CC/45* z 54 % a *CC/55* z 9 %. U večerního: *CG/44* z 9,5 %, *CG/45* z 9,5 %, *CC/44* z 38 %, *CC/45* z 29 % a *CC/55* z 14 %.

Do následné analýzy jsme zahrnuli vliv dominantní alely „5R“ genu *Per3*: „(55 + 45) vs. 44“. V případě genu *Per2* jsme v analýzách pracovali s genotypy „CC a CG“. V tabulce 25 je uvedený počet respondentů všech kombinací genotypů se zahrnutou dominancí. Chí kvadrát testem jsme neprokázali žádný signifikantní rozdíl v rozložení těchto kombinací genotypů mezi chronotypy. Grafické rozložení kombinací genotypů genů *Per2/Per3* je na obr. 33.

<i>Per2/Per3</i>	<i>CC/44</i>	<i>CC/(55+45)</i>	<i>CG/44</i>	<i>CG/(55+45)</i>
<i>ranní</i>	12	27	1	3
<i>večerní</i>	8	9	2	2

Tabulka 25: V tabulce je uvedený počet ranních a večerních subjektů s danou variantou genotypu. Žádná signifikantní asociace nebyla prokázána.



Obrázek 33: Grafické vyjádření relativního zastoupení kombinací všech genotypů (*Per2/Per3*) s dominancí alely „5R“ u genu *Per3* mezi chronotypy. U ranního chronotypu jsou zastoupeny genotypy: *CG / (55 + 45)* ze 7 %, *CG/44* z 2 %, *CC / (55 + 45)* z 63 %, *CC/44* z 28 %. U večerního: *CG / (55 + 45)* z 9,5 %, *CG/44* z 9,5 %, *CC / (55 + 45)* z 43 %, *CC/44* z 38 %.

Opět jsme sestavili 4 kombinace po dvou variantách genotypů (*Per2/Per3*), kde byl vždy u obou variant jeden genotyp u jednoho z genů shodný. Testem Chí kvadrát jsme však neprokázali žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy.

7. DISKUSE

Cílem této práce bylo genotypizovat polymorfismy u jedinců s extrémním a extrémům blízkým chronotypem z DNA získané ze vzorků slin. Z důvodů statistické výpovědní hodnoty by zajisté bylo vhodné získat více respondentů, a to zejména extrémně večerního chronotypu. Nicméně i přes relativně nízký počet respondentů jsme sestavili analýzy, díky kterým jsme mohli definovat asociace mezi chronotypy a určitou variantou genotypů u všech polymorfismů.

Použitím dotazníku MEQ (Horne a Östberg, 1976) byla získána data na sestavení křivky popisující rozložení MEQ skóre všech probandů. Z grafu 1 je patrné, že nejvýraznější skupinou je nevyhraněný typ, podobně jako ve všech předchozích studiích monitorujících českou (Fárková et al., 2020) i další populace (Lehnkering a Siegmund 2007; Roenneberg et al., 2003). V naší studii jsme však odhalili vyšší počet subjektů ve skupině extrémně ranních než ve skupině extrémně večerních. Tento fakt se neshoduje se studií Lehnkering a Siegmund (2007), kde dotazník odhalil větší počet participantů s extrémně večerním chronotypem v německé populaci. Je otázkou, zda naše studie zaujala více lidí s ranními preferencemi (například i z důvodu vyššího zájmu o spánkovou hygienu, pravidelný režim a kvalitní spánek, který zúčastnění jedinci často zmiňovali), nebo zda v české populaci převažují ranní chronotypy. V recentní studii české populace (Fárková et al., 2020) není z grafu vyobrazující distribuci MEQ skóre úplně jednoznačné, která ze skupin na opačných koncích křivky má vyšší počet extrémů, jelikož zde není řádně označen přechod mezi extrémně ranními/večerními a mírně ranními/večerními chronotypy a jejich počet není uveden ani v jiné části studie. Nicméně je zde uvedeno, že se studie zúčastnilo celkem 508 večerních respondentů a 831 ranních (z celkového $n = 3446$). V této diplomové práci bylo celkem 218 večerních a 322 ranních participantů (z celkového $n = 1134$). Poměrem obou vyhraněných typů se tedy obě studie podobají.

Vzorky slin pro analýzy polymorfismů jsme získali celkem od 64 oslovených subjektů. Nejdříve jsme hodnotili asociaci jednotlivých polymorfismů s vyhraněným chronotypem. Při detekci SNP (T3111C) v genu *Clock* jsme v našem souboru dat odhalili pouze dva participanty s genotypem CC, což jsou přibližně 3 % všech účastníků. S obdobně nízkým poměrem se setkal i výzkumný tým Katzenberg et al. (1998). V jejich studii objevili pouze 28 osob s genotypem CC ze 410 účastníků. Naše i předchozí práce shodně ukázaly, že v populaci je obecně nejvíce zastoupena alela T (Ciarleglio et al., 2008).

Pro následné analýzy našich dat jsme formulovali předpoklad, že jedna z alel bude dominantní a druhá recesivní, a proto jsme heterozygoty přiřadili nejprve k jednomu, poté k druhému homozygotnímu genotypu. Na základě toho jsme hledali asociaci dominantní alely s extrémními chronotypy. Při uvažované dominanci alely C (TT vs. (TC + CC)) u genu *Clock* jsme prokázali asociaci alely 3111C s ranním typem (tab. 4, graf 6). Náš závěr se ale neshoduje s evropskou studií Katzenberg et al. (1998), kde autoři naznačili asociaci alely 3111C s večerním chronotypem. Sbíraná data v jejich studii však byla založena nejen na extrémních, ale i na nevyhraněném a mírně ranních/večerních chronotypech. Na základě distribučního grafu, který studie předkládá, lze usuzovat na menší počet subjektů s MEQ 16-30, který odpovídá extrémně večernímu chronotypu, než je v naší studii. Výsledné korelační analýzy tak mohou být jiné. Ve studiích Chang et al. (2011) a Pedrazzoli et al. (2007) dokonce došli autoři k závěru, že SNP v genu *Clock* není asociovaný s odlišnými diurnálními preferencemi. Díky rozporuplným datům tedy korelace tohoto polymorfismu s vyhraněným chronotypem zůstává nejasná. Autoři práce Katzenberg et al. (1998) však uvádějí, že tento polymorfismus v 3'-UTR oblasti ovlivňuje stabilitu mRNA a může tak mít značný efekt na výslednou koncentraci proteinu CLOCK v cytoplazmě. To může ovlivňovat cirkadiánní periodu a napomáhat k formování extrémního chronotypu. Je však také možné, že tento SNP v genu *Clock* je spíše markerem pro rozsáhlejší polymorfické změny v genu *Clock* nebo jeho regulačních elementech (Katzenberg et al. 1998).

V souvislosti s VNTR polymorfismem genu *Per3* byla ve studii Archer et al. (2003) popsána spojitost genotypu „55“ s extrémně ranním chronotypem a genotypu „44“ s chronotypem extrémně večerním. My jsme však v naší analýze žádnou signifikantní korelaci neprokázali, neboť genotypu „55“ bylo výrazně méně v obou skupinách. Z obr. 14A (kapitola 6.2.2) lze pozorovat mírný trend asociace genotypů „45+55“ s ranním chronotypem, nicméně testem Chí kvadrát nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl v rozložení genotypů mezi chronotypy.

Studie Carpen et al. (2005) ukázala, že alela 111G u SNP v genu *Per2* asociuje s ranním chronotypem. Tento nález jsme nedokázali potvrdit, jelikož mezi našimi participanty jsme neodhalili nikoho s genotypem GG. To je však v souladu s jinými studiemi, které ukazují, že u tohoto SNP se genotyp „GG“ vyskytuje v populaci velmi zřídka (Lee et al., 2011; Hida et al., 2014). Autoři studie Carpen et al. (2005) sestavili model, ze kterého je patrné, že substituce nukleotidů C a G na pozici 111 vede ke změně struktury RNA. Transkripty kódované alelou G mohou být efektivněji translatované, což povede k rychlejší

akumulaci PER2 proteinů a tím tedy ke zkrácení periody, jak je typické pro ranní chronotypy. Bohužel žádný signifikantní rozdíl v míře translace nebyl autory prokázán.

Polymorfismus v genu *Bmall* (A-1420G) byl vybrán na základě studie Pedrazzoli et al. (2010), ačkoliv na úrovni jednotlivých polymorfismů, stejně jako naše, ani tato studie neprokázala provázanost SNP v genu *Bmall* s žádným z chronotypů.

Přestože jsme se pokusili u jednotlivých polymorfismů prokázat jasnou korelaci alel s konkrétním chronotypem, signifikantně jsme prokázali pouze asociaci ranního chronotypu a alely *3111C* u genu *Clock*. V následné analýze jsme proto testovali, podobně jako v jiných studiích, polymorfismy jako provázané haplotypy (Pedrazzoli et al. 2010).

Pokusili jsme se tedy sestavit možné kombinace mezi všemi detekovanými polymorfismy hodinových genů a zkoumali jsme provázanost těchto variant genotypů s extrémními chronotypy. Nejprve jsme u všech kombinací dvojic polymorfismů analyzovali genotypy za předpokladu, že ani jedna z alel není dominantní. Mezi všemi dvojicemi polymorfismů byla prokázána jediná asociace, a to u kombinace SNP genů *Clock/Per2*, varianty genotypu „TC/CC“ s ranním chronotypem.

V druhém kroku jsme do analýzy zahrnuli předpoklad, že jedna z alel bude dominantní, druhá recesivní. Vzhledem k předchozím výsledkům a signifikantní asociaci alely C s ranním typem, jsme u genu *Clock* pracovali s dominantní alelou C: (TC + CC) vs. TT. U genu *Bmall* jsme pracovali s dominantní alelou A: (AG + AA) vs. GG, u genu *Per3* s dominantní alelou „5R“: (55 + 45) vs. 44.

Ve dvojici *Clock/Bmall* jsme při kombinaci variant s dominantními alelami nenašli žádnou signifikanci (tabulka 8). Proto jsme vytvořili 4 kombinace, kde byly vždy dvě varianty, ve kterých byl vždy u jednoho genu stejný genotyp (tabulka 9 A/B/C/D). Pomocí Chí kvadrát testu jsme ve dvojici *Clock/Bmall* zjistili signifikantní výsledek v kombinaci: „(TC + CC) / (AG + AA)“ vs. „TT / (AG + AA)“, kde kombinace „(TC + CC) / (AG + AA)“ odpovídala rannímu typu. Výsledek byl do určité míry podmíněn předchozím zjištěním: asociací ranního chronotypu s alelou C genu *Clock*.

Vzhledem k tomu, že jsme nedetekovali žádného respondenta s genotypem GG genu *Per2*, jsme při analýze u dvojice *Clock/Per2*, pracovali jen s dominancí alely C u genu *Clock*. Z testování vyplynulo několik signifikantních výsledků, které byly spojené s efektem alely C u genu *Clock* a její asociací s ranním typem. Z výsledků tedy vyplývá, že kombinace genotypů „(TC + CC) / CC“ (*Clock/Per2*) signifikantně odpovídá rannímu typu. Jedná-li se o kombinaci „(TC + CC) / CG“, žádná signifikance není prokázána. Bylo by nejspíše vhodné nalézt více osob s genotypem CG a GG, což by pomohlo ověřit získané výsledky.

V protikladu k našemu závěru je výstup italské studie Choub et al. (2011), která analyzovala SNP genů *Clock* a *Per2*. Autoři se pokusili i o analýzu této dvojice a jejich asociaci s chronotypy. Žádné signifikantní vazby však neprokázali ani u jednotlivých SNP, ani u dvojice *Clock/Per2*, proto se domnívají, že SPN genů *Clock* a *Per2* nekorelují s žádnou diurnální preferencí. Studie však nezohledňovala rozdělení chronotypů do pěti kategorií jako v našem případě, rozdělila je pouze na ranní, nevyhraněný a večerní.

V další dvojici *Clock/Per3* jsme prokázali signifikantní výsledek pouze v asociaci varianty „(TC + CC) / (55 + 45)“ s ranním chronotypem (tabulka 17). Musíme konstatovat, že tato korelace je zřejmě také podmíněná asociací alely C genu *Clock* s ranním chronotypem. Dále jsme předpokládali, že alela „5R“ genu *Per3* tuto asociaci s ranním typem zřejmě umocňuje, jelikož tým Archer et al. (2003) asociaci alely „5R“ s ranním typem prokázal. V dalších úrovních naší analýzy (tabulka 18 A/B/C/D) jsme však tuto asociaci nepotvrdili.

Poslední z dvojic, u které jsme prokázali signifikantní asociace, je *Per3/Bmall1*. U této dvojice jsme prokázali signifikantní asociaci varianty „(55 + 45) / (AG + AA)“ s ranním typem. Což jsme ověřili i další analýzou kombinací: „44 / (AG + AA)“ vs. „(55 + 45) / (AG + AA)“ a „(55 + 45) / (AG + AA)“ vs. „(55 + 45) / GG“, v obou případech jsme prokázali asociaci variace „(55 + 45) / (AG + AA)“ s ranním typem. Vědci Archer et al. (2003) prokázali asociaci alely „5R“ u VNTR polymorfismu genu *Per3* s ranním typem. V naší práci jsme dospěli k závěru, že přítomnost alely „5R“ v genu *Per3* je podmíněná přítomností alely A v genu *Bmall1*.

U dvojice *Bmall1/Per2* a jsme neprokázali žádný signifikantní vztah. Stejně tak u dvojice *Per2/Per3*, ačkoliv z grafu 33 je patrné, že variace „(55 + 45) / CC“ má trend k rannímu chronotypu, nicméně tento výsledek Chí kvadrát test nepotvrdil.

Naše analýzy prokázaly asociaci několika genotypů s chronotypem, avšak ve všech případech s ranním chronotypem. Nemůžeme však automaticky konstatovat, že druhá varianta asociuje s večerním chronotypem. V rozložení genotypů u osob večerním chronotypem nebyla prokázána žádná signifikantní asociace s konkrétním genotypem. Je možné, že příčinou je nestejný počet osob s večerním a ranním chronotypem nebo velmi nízký počet osob s večerním chronotypem, kteří byli ochotni účastnit se této studie.

Hlavním rozdílem mezi chronotypy je odlišná délka periody cirkadiálního cyklu. U ranního chronotypu je perioda zkrácená, tj. dochází ke zrychlení zpětnovazebných interakcí hodinových genů, u večerního typu je perioda prodloužená, tj. dochází ke zpomalování molekulární hodinové smyčky (Roenneberg et al., 2003). Hledání polymorfismů asociovaných s chronotypem je v podstatě hledání molekulární příčiny odlišné rychlosti

vzájemných interakcí mezi hodinovými geny a jejich proteiny. Hypotézu o vlivu polymorfismů na molekulární mechanismu formulují autoři práce Archer et al. (2003), kteří ukazují, že u VNTR polymorfismu genu *Per3*, je v „5R“ alele 5 tandemových repetit, a tedy zvýšení počtu fosforylačních míst pro CK1ε. Vyšší míra fosforylace, a tím tedy i vyšší ubiquitinace ligázou β-TrCP, vede ke zkrácení cirkadiánní periody a tedy zrychlením molekulární smyčky, jak je pro ranní chronotypy typické (Shirogane et al., 2005). Vědci prokázali asociaci alely „5R“ s ranním typem, kterou naše výsledky nerozporují, ačkoliv se domníváme, že tato asociace souvisí i s provázáním s dalšími polymorfismy. Otázkou zůstává, jestli gen *Per3* hraje v molekulární smyčce člověka roli univerzálního represoru podobně jako *Per2* nebo *Per1*, nebo jestli je jeho funkce tkáňově specifická (Sabino et al., 2016). Ačkoliv existuje několik studií, které se zabývají asociací polymorfismů (nejen VNTR) v genu *Per3* s chronotypy, mechanismus, kterým jsou diurnální preference přesně regulovány, zůstává nejasný (Parsons et al., 2014).

Naše práce ukázala několik signifikantních asociací mezi kombinacemi polymorfismů, zejména T3111C genu *Clock* s ranním chronotypem. Je otázka, do jaké míry jsou naše závěry podmíněné tím, že samotná alela C u SNP T3111C genu *Clock* asociuje s ranním typem, a do jaké míry jsou tyto kombinace signifikantní i z důvodu provázanosti mezi polymorfismy. Například ve VNTR polymorfismu genu *Per3* nebyla prokázána signifikantní asociace mezi alelou „5R“ s ranním typem, ani v SNP genu *Bmall* nebyla prokázána signifikantní asociace alely A s ranním typem. Když jsme však analyzovali kombinace polymorfismů genů *Per3/Bmall*, prokázali jsme, že s ranním chronotypem asociuje kombinace dominantní alely „5R“ a dominantní alely A. Toto je příklad, který naznačuje, že pro studium determinace chronotypů jsou kombinace specifických polymorfismů významnějšími markery než jednotlivé SNP. V tomto se naše práce shoduje se závěry jiných studií (Pedrazzoli et al., 2010). Autoři této práce navrhli hypotézu, že nesynonymní polymorfismy, vedoucí ke změnám v proteinové struktuře, mohou změnit rychlost dimerizace proteinů, a tím způsobit drobné změny v cirkadiánní regulaci, které se projeví jako odlišnosti mezi cirkadiánními fenotypy. Změny v promotorové nebo regulační oblasti tak mohou ovlivnit tempo genové exprese, což může vést ke změnám fázového vztahu mezi komponenty molekulárních smyček. Detailnější mechanismus, kterým by specifické kombinace polymorfismů ovlivňovali chronotypy, však zatím zůstává nepopsán.

V hodinových genech lze studovat další SNP asociované s chronotypy, které nebyly testovány v naší studii, například v genech *Clock* (rs1268271), či *Bmall* (rs11824092 a rs1481892) (Dmitrzak-Węglarz et al., 2016). V genu *Per2* byl dokonce nalezen

nesynonymní polymorfismus (rs934945), kde na pozici 3853 dochází k substituci nukleotidu G za nukleotid A, což způsobí při translaci záměnu aminokyseliny glycinu za glutamin. Vědci prokázali asociaci alely G s ranním typem a navrhli hypotézu, že to může snížit aktivitu proteinu PER2, což by mohlo být spojené s ranním chronotypem (Lee et al., 2011). V genu *Per3* byly analyzovány polymorfismy: rs228697, kde byla prokázána asociace alely C s ranním a alely G s večerním typem (Hida et al., 2014), a rs10462020, u kterého genotyp GG odpovídá rannímu chronotypu (Parsons et al., 2014).

8. ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme analyzovali polymorfismy vybraných hodinových genů a jejich asociaci s extrémními chronotypy. U všech polymorfismů jsme pracovali se dvěma alelami, u nichž jsme předpokládali, že jedna z nich je dominantní a jedna recesivní. U jednotlivých polymorfismů jsme prokázali asociativní vztah pouze u SNP (T3111C) genu *Clock*. Z našich analýz jsme dospěli k závěru, že alela *3111C* genu *Clock* asociuje s ranním chronotypem.

Následně jsme se zaměřili na kombinace polymorfismů hodinových genů a jejich asociace s cirkadiálním fenotypem. Signifikantní asociaci s chronotypem jsme našli ve čtyřech kombinacích, tj. „*Clock/Per3*; *Clock/Per2*; *Clock/Bmal1* a *Bmal1/Per3*“. U kombinace *Bmal1/Per3* jsme zjistili, že dominantní alela „5R“ genu *Per3* v kombinaci s dominantní alelou A genu *Bmal1* asociuje s ranním typem. U všech kombinací zahrnujících gen *Clock* asociovaly dvojice zahrnující jeho dominantní alelu C s ranním typem, jak bylo prokázáno již u jednotlivých polymorfismů. V kombinaci s genem *Per2* byla asociace signifikantní pouze při jeho genotypu „CC“, nicméně ten se v našem souboru vyskytoval v 87,5 %. V kombinaci s genem *Bmal1* byla asociace alely C genu *Clock* spojena s dominantní alelou A a v kombinaci s genem *Per3* byla spojena s alelou „5R“.

Jak vyplývá z těchto výsledků, ale například i z práce Pedrazzoli et al. (2010), polymorfismy je vhodné analyzovat jako provázané haplotypy, které poskytují komplexnější pohled na možné příčiny vzniku různých dynamických vlastností molekulárního hodinového mechanismu, což je považováno za jeden z hlavních důvodů formování odlišných cirkadiálních fenotypů.

9. POUŽITÁ LITERATURA³

- Abrahamson, Eric E. 2001. "Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse : Retinal Innervation , Intrinsic Organization and Efferent Projections." *Brain Research* 916 (1–2): 172–91.
- Akashi, Makoto, and Toru Takumi. 2005. "The Orphan Nuclear Receptor ROR α Regulates Circadian Transcription of the Mammalian Core-Clock Bmal1." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (5): 441–48.
- Akashi, Makoto, Yoshiki Tsuchiya, Takao Yoshino, and Eisuke Nishida. 2002. "Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells." *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (6): 1693–1703.
- Anafi, Ron C., Yool Lee, Trey K. Sato, Anand Venkataraman, Chidambaram Ramanathan, Ibrahim H. Kavakli, Michael E. Hughes, et al. 2014. "Machine Learning Helps Identify CHRONO as a Circadian Clock Component." *PLoS Biology* 12 (4): e1001840.
- Annayev, Yunus, Sheera Adar, Yi Ying Chiou, Jason D. Lieb, Aziz Sancar, and Rui Ye. 2014. "Gene Model 129 (Gm129) Encodes a Novel Transcriptional Repressor That Modulates Circadian Gene Expression." *Journal of Biological Chemistry* 289 (8): 5013–24.
- Archer, Simon N, Donna L Robilliard, Debra J Skene, Marcel Smits, Adrian Williams, and Josephine Arendt. 2003. "A Length Polymorphism in the Circadian Clock Gene Per3 Is Linked to Delayed Sleep Phase Syndrome and Extreme Diurnal Preference." *Sleep* 26 (4): 413–15.
- Azmitia, C; Segal, M. 1978. "An Autoradiographic Analysis of the Differential Ascending Projections of the Dorsal and Median Raphe Nuclei in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 179 (3): 641–67.
- Bailer, U., G. Wiesegger, F. Leisch, K. Fuchs, I. Leitner, M. Letmaier, A. Konstantinidis, et al. 2005. "No Association of Clock Gene T3111C Polymorphism and Affective Disorders." *European Neuropsychopharmacology* 15 (1): 51–55.

³ * označuje sekundárně citované zdroje

- Brown, Steven A, Dieter Kunz, Amelie Dumas, Pål O Westermark, Katja Vanselow, Amely Tilmann-wahnschaffe, Hanspeter Herzel, and Achim Kramer. 2008. "Molecular Insights into Human Daily Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (5): 1602–7.
- Burgess, Helen J., and Charmane I. Eastman. 2008. "Human Tau in an Ultradian Light-Dark Cycle." *Journal of Biological Rhythms* 23 (4): 374–76.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I., Dretta, G., F., and Pagano, M. 2007. "SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins." *Science* 316 (5826): 900–905.
- Carpen, J. D., von Schantz, M., Smits, M., Skene, D. J., Archer, S. N. 2006. "A Silent Polymorphism in the PER1 Gene Associates with Extreme Diurnal Preference in Humans." *Journal of Human Genetics* 51 (12): 1122–25.
- Carpen, Jayshan D, Simon N Archer, and Debra J Skene. 2005. "A Single-Nucleotide Polymorphism in the 5' -Untranslated Region of the HPER2 Gene Is Associated with Diurnal Preference." *Journal of Sleep Research* 14 (3): 293–97.
- Chang, Anne-marie, Alison M Buch, Dayna S Bradstreet, David J Klements, and Jeanne F Duffy. 2011. "Human Diurnal Preference and Circadian Rhythmicity Are Not Associated with the CLOCK 3111C / T Gene Polymorphism" 26 (3): 276–79.
- Choub, Anna, Michelangelo Mancuso, Fabio Coppedè, Annalisa Logerfo, Daniele Orsucci, Lucia Petrozzi, Elisa Dicoscio, et al. 2011. "Clock T3111C and Per2 C111G SNPs Do Not Influence Circadian Rhythmicity in Healthy Italian Population." *Neurological Sciences* 32 (1): 89–93.
- Ciarleglio, Christopher M., Kelli K. Ryckman, Stein V. Servick, Akiko Hida, Sam Robbins, Nancy Wells, Jennifer Hicks, et al. 2008. "Genetic Differences in Human Circadian Clock Genes among Worldwide Populations." *Journal of Biological Rhythms* 23 (4): 330–40.

- Desan, Paul H., Dan A. Oren, Robert Malison, Lawrence H. Price, Jerrold Rosenbaum, Jordan Smoller, Dennis S. Charney, and Joel Gelernter. 2000. "Genetic Polymorphism at the CLOCK Gene Locus and Major Depression." *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics* 96 (3): 418–21.
- Dmitrzak-węglarz, Monika, Joanna Pawlak, Monika Wiłkość, Izabela Miechowicz, Małgorzata Maciukiewicz, Wanda Ciarkowska, Dorota Zaremba, and Joanna Hauser. 2016. "Chronotype and Sleep Quality as a Subphenotype in Association Studies of Clock Genes in Mood Disorders." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 76 (1): 32–42.
- Doi, Masao, Jun Hirayama, and Paolo Sassone-Corsi. 2006. "Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase." *Cell* 125 (3): 497–508.
- Ebisawa, Takashi, Makoto Uchiyama, Naofumi Kajimura, Kazuo Mishima, Yuichi Kamei, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, et al. 2001. "Association of Structural Polymorphisms in the Human Period3 Gene with Delayed Sleep Phase Syndrome." *EMBO Reports* 2 (4): 342–46.
- Etchegaray, Jean Pierre, Choogon Lee, Paul A. Wade, and Steven M. Reppert. 2003. "Rhythmic Histone Acetylation Underlies Transcription in the Mammalian Circadian Clock." *Nature* 421 (6919): 177–82.
- Fárková, Eva, Jan Novák, Denisa Manková, and Jana Kopřivová. 2020. "Comparison of Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) and Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) Czech Version." *Chronobiology International* 37 (11): 1591–98.
- Ferrante, Andrew, David Gellerman, Ahmet Ay, Kerri Pruitt Woods, Allan Michael Filipowicz, Kriti Jain, Neil Bearden, and Krista Kenyon Ingram. 2015. "Diurnal Preference Predicts Phase Differences in Expression of Human Peripheral Circadian Clock Genes." *Journal of Circadian Rhythms* 13 (1): 1–7.
- Gekakis, Nicholas, David Staknis, Hubert B Nguyen, Fred C Davis, Lisa D Wilsbacher, David P King, Joseph S Takahashi, and Charles J Weitz. 1998. "Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian." *Science* 280 (5369): 1564–69.
- Gooley, Joshua. J., J. Lu, T. C. Chou, T. E. Scammell, and C. B. Saper. 2001. "Melanopsin in Cells of Origin of the Retinohypothalamic Tract." *Nature Neuroscience* 4 (12): 1165.

- * Gooley, Joshua J, and Clifford B Saper. 2005. "Anatomy of the Mammalian Circadian System." In *Principles and Practice of Sleep Medicine*, Sixth Edit, 343-350.e4. Elsevier Inc.
- Goriki, Akihiro, Fumiyuki Hatanaka, Jihwan Myung, Jae Kyoung Kim, Takashi Yoritaka, Shintaro Tanoue, Takaya Abe, et al. 2014. "A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock." *PLoS Biology* 12 (4): e1001839.
- Green, Daniel J., and Rhanor Gillette. 1982. "Circadian Rhythm of Firing Rate Recorded from Single Cells in the Rat Suprachiasmatic Brain Slice." *Brain Research* 245 (1): 198–200.
- Harrington, M. E.; Nance, D. M.; Rusak, B. 1985. "Neuropeptide Y Immunoreactivity in the Hamster Geniculo-Suprachiasmatic Tract." *Brain Research Bulletin* 15 (5): 465-472.
- Hida, Akiko, Shingo Kitamura, Yasuko Katayose, Mie Kato, Hiroko Ono, Hiroshi Kadotani, Makoto Uchiyama, et al. 2014. "Screening of Clock Gene Polymorphisms Demonstrates Association of a PER3 Polymorphism with Morningness-Eveningness Preference and Circadian Rhythm Sleep Disorder." *Scientific Reports* 4 (1): 1–6.
- Hirano, Arisa, Kanae Yumimoto, Ryosuke Tsunematsu, Masaki Matsumoto, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Tomoki Nakagawa, Darin Lanjakornsiripan, Keiichi I. Nakayama, and Yoshitaka Fukada. 2013. "FBXL21 Regulates Oscillation of the Circadian Clock through Ubiquitination and Stabilization of Cryptochromes." *Cell* 152 (5): 1106–18.
- Horne, J. A.; Östberg, O. 1976. "A Self-Assessment Questionnaire to Determine Morningness-Eveningness in Human Circadian Rhythms." *International Journal of Chronobiology* 4 (2): 97–110.
- * Ibata, Yasuhiko, Hitoshi Okamura, Masaki Tanaka, Yoshitaka Tamada, Seiji Hayashi, Norio Iijima, Tomoyuki Matsuda, et al. 1999. "Functional Morphology of the Suprachiasmatic Nucleus." *Frontiers in Neuroendocrinology* 20 (3): 241–68.
- Iwase, Toshio, Naofumi Kajimura, Makoto Uchiyama, Takashi Ebisawa, Kimio Yoshimura, Yuichi Kamei, Kayo Shibui, et al. 2002. "Mutation Screening of the Human Clock Gene in Circadian Rhythm Sleep Disorders." *Psychiatry Research* 109 (2): 121–28.

- Jin, Xiaowei, Lauren P Shearman, David R Weaver, Mark J Zylka, Geert J De Vries, and Steven M Reppert. 1999. "A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock." *Cell* 96 (1): 57–68.
- Johnson, R F, R Y Moore, and L P Morin. 1988. "Loss of Entrainment and Anatomical Plasticity after Lesions of the Hamster Retinohypothalamic Tract." *Brain Research* 460 (2): 297–313.
- Katzenberg, Daniel, Terry Young, Laurel Finn, Ling Lin, David P King, Joseph S Takahashi, and Emmanuel Mignot. 1998. "A CLOCK Polymorphism Associated with Human Diurnal Preference." *Sleep*, 21(6), 569-576.
- Keller, Maren, Jeannine Mazuch, Ute Abraham, Gina D. Eom, Erik D. Herzog, Hans Dieter Volk, Achim Kramer, and Bert Maier. 2009. "A Circadian Clock in Macrophages Controls Inflammatory Immune Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50): 21407–12.
- Ko, Caroline H., and Joseph S. Takahashi. 2006. "Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock." *Human Molecular Genetics* 15 (SUPPL. 2): 271–77.
- Kondratova, Anna A., and Roman V. Kondratov. 2012. "The Circadian Clock and Pathology of the Ageing Brain." *Nature Reviews Neuroscience* 13 (5): 325–35.
- Kume, Kazuhiko, Mark J. Zylka, Sathyanarayanan Sriram, Lauren P. Shearman, David R. Weaver, Xiaowei Jin, Elizabeth S. Maywood, Michael H. Hastings, and Steven M. Reppert. 1999. "MCRY1 and MCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop." *Cell* 98 (2): 193–205.
- Lamia, Katja A., Uma M. Sachdeva, Luciano Di Tacchio, Elliot C. Williams, Jacqueline G. Alvarez, Daniel F. Egan, Debbie S. Vasquez, et al. 2009. "AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation." *Science* 326 (5951): 437–40.
- Lee, Heon Jeong, Leen Kim, Seung Gul Kang, Ho Kyoung Yoon, Jung Eun Choi, Young Min Park, Seog Ju Kim, and Daniel F. Kripke. 2011. "PER2 Variation Is Associated with Diurnal Preference in a Korean Young Population." *Behavior Genetics* 41 (2): 273–77.

- Lehnkering, Hanna, and Renate Siegmund. 2007. "Influence of Chronotype, Season, and Sex of Subject on Sleep Behavior of Young Adults." *Chronobiology International* 24 (5): 875–88.
- Lowrey, P. L.; Shimomura, K.; Antoch, M. P.; Yamazaki, S.; Zemenides, P. D.; Ralph, M. R.; Menaker, M.; T, and J. S. Takahashi. 2000. "Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation Tau." *Science* 288 (5465): 483–91.
- Meng, Qing Jun, Larisa Logunova, Elizabeth S. Maywood, Monica Gallego, Jake Lebiecki, Timothy M. Brown, Martin Sládek, et al. 2008. "Setting Clock Speed in Mammals: The CK1 ϵ Tau Mutation in Mice Accelerates Circadian Pacemakers by Selectively Destabilizing PERIOD Proteins." *Neuron* 58 (1): 78–88.
- Mishima, Kazuo, Takuma Tozawa, Kohtoku Satoh, Hidetomo Saitoh, and Yumiko Mishima. 2005. "The 3111T/C Polymorphism of HClock Is Associated with Evening Preference and Delayed Sleep Timing in a Japanese Population Sample." *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics* 133 B (1): 101–4.
- Miyamoto, Yasuhide, and Aziz Sancar. 1999. "Circadian Regulation of Cryptochrome Genes in the Mouse." *Molecular Brain Research* 71 (2): 238–43.
- Moga, Margaret M., and Robert Y. Moore. 1997. "Organization of Neural Inputs to the Suprachiasmatic Nucleus in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 389 (3): 508–34.
- Moore, Robert Y., and Victor B. Eichler. 1972. "Loss of a Circadian Adrenal Corticosterone Rhythm Following Suprachiasmatic Lesions in the Rat." *Brain Research Bulletin* 72 (900): 54–56.
- Moore, Robert Y., and Nicholas J. Lenn. 1972. "A Retinohypothalamic Projection in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 146 (1): 1–14.
- Moore, Robert Y., and Joan C. Speh. 1993. "GABA Is the Principal Neurotransmitter of the Circadian System." *Neuroscience Letters* 150 (1): 112–16.
- Moore, Robert Y, Angelos E Halaris, and Barbara E Jones. 1978. "Serotonin Neurons of the

- Midbrain Raphe : Ascending Projections.” *Journal of Comparative Neurology* 180 (3): 417–38.
- * Morris, J.; Aeschbach, D.; Scheer, F. 2012. “Circadian System, Sleep and Endocrinology.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 91–104.
- Nováková, Marta, Martin Sládek, and Alena Sumová. 2013. “Human Chronotype Is Determined in Bodily Cells under Real-Life Conditions.” *Chronobiology International* 30 (4): 607–17.
- Ohsaki, Kanae, Katsutaka Oishi, Yuko Kozono, Keiko Nakayama, Keiichi I. Nakayama, and Norio Ishida. 2008. “The Role of β -TrCP1 and β -TrCP2 in Circadian Rhythm Generation by Mediating Degradation of Clock Protein PER2.” *Journal of Biochemistry* 144 (5): 609–18.
- Östberg, O. 1973. “Circadian Rhythms of Food Intake and Oral Temperature in ‘Morning’ and ‘Evening’ Groups of Individuals.” *Ergonomics* 16 (2): 203–9.
- Panda, Satchidananda, Marina P Antoch, Brooke H Miller, Andrew I Su, Andrew B Schook, Marty Straume, Peter G Schultz, et al. 2002. “Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock.” *Cell* 109 (3): 307–20.
- Parsons, Michael J., Kathryn J. Lester, Nicola L. Barclay, Simon N. Archer, Patrick M. Nolan, Thalia C. Eley, and Alice M. Gregory. 2014. “Polymorphisms in the Circadian Expressed Genes PER3 and ARNTL2 Are Associated with Diurnal Preference and GN β 3 with Sleep Measures.” *Journal of Sleep Research* 23 (5): 595–604.
- Pedrazzoli, Mario, Fernando Mazzili Louzada, Danyella Silva Pereira, Ana Amélia Benedito-Silva, Alberto Remesar Lopez, Bruno Jacson Martynhak, Anna Ligia Korczak, et al. 2007. “Clock Polymorphisms and Circadian Rhythms Phenotypes in a Sample of the Brazilian Population.” *Chronobiology International* 24 (1): 1–8.
- Pedrazzoli, Mario, Rodrigo Secolin, Luiz Otávio, Bastos Esteves, Danyella Silva Pereira, Bruna Del, Vechio Koike, Fernando Mazzili Louzada, Iscia Lopes-cendes, and Sergio Tufik. 2010. “Interactions of Polymorphisms in Different Clock Genes Associated with Circadian Phenotypes in Humans.” *Genetics and Molecular Biology* 632: 627–32.

- Pol, A. N. van den, and Tamas Gorcs. 1986. "Synaptic Relationships Between Neurons Containing Vasopressin, Gas-Trin-Releasing Peptide, Vasoactive Intestinal Polypeptide, and Glutamate Decarboxylase Immunoreactivity in the Suprachiasmatic Nucleus: Dual Ultrastructural Immunocytochemistry With G." *Journal of Comparative Neurology* 521: 507–21.
- Pol, A. N. van den, and K. L. Tsujimoto. 1985. "Neurotransmitters of the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus: Immunocytochemical Analysis of 25 Neuronal Antigens." *Neuroscience* 15 (4): 1049–86.
- Preitner, Nicolas, Francesca Damiola, Jozsef Zakany, Denis Duboule, Urs Albrecht, and Ueli Schibler. 2002. "The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator." *Cell* 110: 251–60.
- Reischl, S., Vanselow, K., Westermarck, P. O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzel, H., and Kramer, A. 2007. " β -TrCP1-Mediated Degradation of PERIOD2 Is Essential for Circadian Dynamics." *Journal of Biological Rhythms* 22 (5): 375–86.
- Robilliard, Donna L., Simon N. Archer, Josephine Arendt, Steven W. Lockley, Lisa M. Hack, Judie English, Damien Leger, et al. 2002. "The 3111 Clock Gene Polymorphism Is Not Associated with Sleep and Circadian Rhythmicity in Phenotypically Characterized Human Subjects." *Journal of Sleep Research* 11 (4): 305–12.
- Roenneberg, Till; Wirz-Justice, Anna; Mellow, Marta. 2003. "Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes." *Journal of Biological Rhythms* 18 (1): 80–90.
- Sabino, Flávia Cal, José Américo De Oliveira, and Mario Pedrazzoli. 2016. "Per3 Expression in Different Tissues of *Cebus Apella*." *Sleep Science* 9 (4): 262–65.
- Sack, R. L.; Lewy, A. J.; Blood, M. L.; Keith, L. D.; Nakagawa, H. 1992. "Circadian Rhythm Abnormalities in Totally Blind People: Incidence and Clinical Significance." *Endocrinology And Metabolism* 75 (1): 127–34.
- Sato, Trey K, Satchidananda Panda, Loren J Miraglia, Teresa M Reyes, Radu D Rudic, Peter Mcnamara, Kinnery A Naik, et al. 2004. "A Functional Genomics Strategy Reveals Rora

- as a Component of the Mammalian Circadian Clock.” *Neuron* 43 (4): 527–37.
- Shirakawa, T.; Moore, R. 1994. “Glutamate Shifts the Phase of the Circadian Neuronal Firing Rhythm in the Rat Suprachiasmatic Nucleus in Vitro.” *Neuroscience Letters* 178 (1): 47–50.
- Shirogane, Takahiro, Jianping Jin, Xiaolu L. Ang, and J. Wade Harper. 2005. “SCF β -TRCP Controls Clock-Dependent Transcription via Casein Kinase 1-Dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (Per1) Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 26863–72.
- Siepkka, Sandra M., Seung Hee Yoo, Junghea Park, Weimin Song, Vivek Kumar, Yinin Hu, Choogon Lee, and Joseph S. Takahashi. 2007. “Circadian Mutant Overtime Reveals F-Box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression.” *Cell* 129 (5): 1011–23.
- * Smith, Jacob G., and Paolo Sassone-Corsi. 2020. “Clock-in, Clock-out: Circadian Timekeeping between Tissues.” *Biochemist* 42 (2): 1–5.
- Stephan, F. K., and I. Zucker. 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): 1583–86.
- Stokkan, K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki, and M. Menaker. 2001. “Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding.” *Science* 291 (5503): 490–93.
- Storch, Kai Florian, Ovidiu Lipan, Igor Leykin, N. Viswanathan, Fred C. Davis, Wing H. Wong, and Charles J. Weitz. 2002. “Extensive and Divergent Circadian Gene Expression in Liver and Heart.” *Nature* 417 (6884): 78–83.
- Takano, Atsuko, Kimiko Shimizu, Shuichi Kani, Ruud M. Buijs, Masato Okada, and Katsuya Nagai. 2000. “Cloning and Characterization of Rat Casein Kinase 1 ϵ .” *FEBS Letters* 477 (1–2): 106–12.
- Tsuchiya, Yoshiki, Makoto Akashi, and Eisuke Nishida. 2003. “Temperature Compensation and Temperature Resetting of Circadian Rhythms in Mammalian Cultured Fibroblasts.” *Genes to Cells* 8 (8): 713–20.

- Viola, Antoine U., Simon N. Archer, Lynette M M. James, John A. Groeger, June C.Y. Lo, Debra J. Skene, Malcolm von Schantz, and Derk Jan Dijk. 2007. "PER3 Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance." *Current Biology* 17 (7): 613–18.
- Viola, Antoine U, Lynette M James, Simon N Archer, and Derk-jan Dijk. 2008. "PER3 Polymorphism and Cardiac Autonomic Control : Effects of Sleep Debt and Circadian Phase." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295 (5): H2156–63.
- * Wang, X. S., M. E.G. Armstrong, B. J. Cairns, T. J. Key, and R. C. Travis. 2011. "Shift Work and Chronic Disease: The Epidemiological Evidence." *Occupational Medicine* 61 (2): 78–89.
- Welsh, David K., Diomedes E. Logothetis, Markus Meister, and Steven M. Reppert. 1995. "Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms." *Neuron* 14 (4): 697–706.
- Wittmann, Marc, Jenny Dinich, Martha Merrow, Till Roenneberg, San Diego, Biologisch Centrum, and Munich Germany. 2006. "Social Jetlag: Misalignment of Biological and Social Time." *Chronobiology International* 23 (1): 497–509.
- Wong, Patricia M, Brant P Hasler, Thomas W Kamarck, Matthew F Muldoon, and Stephen B Manuck. 2015. "Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (12): 4612–20.
- Wright, Kenneth P., Rod J. Hughes, Richard E. Kronauer, Derk Jan Dijk, and Charles A. Czeisler. 2001. "Intrinsic Near-24-h Pacemaker Period Determines Limits of Circadian Entrainment to a Weak Synchronizer in Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 14027–32.
- Yamazaki, Shin, Rika Numano, Michikazu Abe, Akiko Hida, Ri Ichi Takahashi, Masatsugu Ueda, Gene D. Block, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker, and Hajime Tei. 2000. "Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats." *Science* 288 (5466): 682–85.

Internetové zdroje:

single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable (nature.com), citováno: 8.7.2021 / Dostupné z: www.nature.com/scitable/definition/snp-295/

microsatellite / VNTR | Learn Science at Scitable (nature.com), citováno: 8.7.2021 / Dostupné z: www.nature.com/scitable/definition/microsatellite-vntr-209/

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Informace o studii a informovaný souhlas

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKA STUDIE

NÁZEV STUDIE: „Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s fenotypem vyhraněného chronotypu“

VÝZKUMNÝ TÝM: doc. RNDr. Zdeňka Bendová Ph.D., Bc. Lucie Turečková, Mgr. Roman Šolc, Ph.D., Mgr. Kateřina Červená

Vážená paní, vážený pane,

dovolujeme si Vám nabídnout účast ve studii „Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s fenotypem vyhraněného chronotypu“. Předtím, než se rozhodnete studii zúčastnit, si, prosím, pozorně přečtete následující informace. Obsahují přehled použitých metod, postup, jakým studie probíhá a k čemu mohou její výsledky posloužit. V případě jakýchkoli nejasností nás neváhejte kontaktovat, vše Vám ochotně vysvětlíme.

O čem studie je a jaké jsou naše hlavní cíle?

V naší studii si klademe otázku, zda lze vyhraněný chronotyp, (osoba s výrazně ranní nebo výrazně večerní aktivitou), asociovat s polymorfismy (variantami) tzv. hodinových genů, které jsou součástí regulačního mechanismu biologických hodin, a vybraných hodinami kontrolovaných genů, které s tímto regulačním mechanismem úzce souvisí.

Jak bude studie probíhat?

Budete-li mít zájem o účast ve studii, vyplníte dotazník týkající se chronotypu (na adrese **chronotyp.cz**), kde uvedte Vaši e-mailovou adresu. V případě, že Vás dotazník zařadí do skupiny ranních nebo večerních chronotypů, budete požádáni o vzorek slin.

Odběr vzorku slin pro genetickou analýzu: Za tímto účelem budete požádán/a o naplívání 1 ml slin do speciální zkumavky, které budou anonymizované. Naplívání zmíněného vzorku

zabere maximálně 5-10 minut. 30 minut před odběrem byste si neměl/a čistit zuby, jíst, pít, kouřit a žvýkat žvýkačku. Vzorek slin je odebírán za účelem izolace Vaší DNA určené pro analýzu variant neboli polymorfismů tzv. hodinových genů (tedy genů zodpovídajících za opakovatelnost procesů v našem těle). Analyzovány budou polymorfismy hodinových genů *Clock*, *Bmal1*, *Per2* a *Per3*. Vzorek Vaší DNA bude uchován po dobu trvání studie pro potřebu provedení opakovaných či následných analýz souvisejících s polymorfismy tzv. hodinových genů, přičemž veškeré úkony prováděné se vzorkem a též způsob jeho uskladnění budou podléhat obvyklým standardům zaručujícím odpovídající stupeň anonymizace dat a znemožňující jakékoli zneužití. Pokud k tomu svolíte, Váš anonymizovaný vzorek bude uchováván i po ukončení studie pro případné další výzkumné analýzy, které však budou vždy provedeny až s Vaším aktuálním informovaným souhlasem. Pokud s uchováním Vašeho anonymizovaného vzorku i po skončení studie nesouhlasíte, bude Váš vzorek ihned po ukončení této studie zlikvidován.

Výstupy studie:

Po skončení a vyhodnocení pokusu, budete-li si to přát, můžete obdržet výsledky Vašeho testování, které Vám zašleme na Vámi uvedenou e-mailovou adresu. Dostanete informace o tom, jakých variant analyzovaných hodinových genů jste nositeli. Tato data Vám mohou poskytnout zajímavé podněty týkající se vašeho chronotypu.

Odstoupení od studie:

Vaše účast v této studii je zcela dobrovolná a máte právo od ní kdykoli odstoupit.

Bezpečnost, důvěrnost údajů a Vaše práva:

V případě, že se studie zúčastníte, budou veškeré informace o Vás považovány za důvěrné. Data získaná během studie budou užita výhradně pro výzkumné účely. Celá studie bude anonymizovaná. Pokud budou výsledky studie jakoukoliv formou publikovány, bude to provedeno tak, aby nebylo možné určit informace o jednotlivých účastnících studie, tedy ani o Vás. Studie byla schválena Etickou komisí Přírodovědecké fakulty UK (Předseda Etické komise Prof. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc., telefon: (+420) 221951821, e-mail: flegr@cesnet.cz).

Máte-li jakékoliv dotazy ohledně samotné studie, obraťte se na:

Doc. RNDr. Zdeňku Bendovou, Ph.D., email: zdenka.bendova@natur.cuni.cz

Mgr. Romana Šolce, Ph.D., email: roman.solc@natur.cuni.cz

INFORMOVANÝ SOUHLAS

s účastí na výzkumné studii „Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s fenotypem vyhraněného chronotypu“.

1. **Byl/a jsem seznámen/a s Informací pro účastníka o studii „Asociace vybraných polymorfismů hodinových genů s fenotypem vyhraněného chronotypu“.** Porozuměl/a jsem údajům v něm obsaženým. Všechny mé dotazy a připomínky byly zodpovězeny k mé spokojenosti.
2. **Souhlasím s účastí v této studii a podstoupím procedury, které jsou součástí studie, a výzkumníkům poskytnu nezbytné informace.**
3. **Souhlasím s odběrem vzorku slin za účelem izolace DNA, jejím využitím ke genotypizaci polymorfismů vybraných hodinových genů a jejím uchováním po dobu nezbytně nutnou pro účely tohoto výzkumného projektu.**
4. **Souhlasím s tím, aby byl anonymizovaný vzorek mé DNA uchováván i po ukončení této studie pro účely dalšího vědeckého výzkumu. Případné další analýzy budou však vždy provedeny až s mým aktuálním informovaným souhlasem. Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoli odvolat a můj vzorek bude zlikvidován.**
5. **Nesouhlasím s uchováváním anonymizovaného vzorku mé DNA i po ukončení této studie pro účely dalšího vědeckého výzkumu a požaduji, aby byl vzorek ihned po ukončení této studie zlikvidován.**
6. **Jsem si vědom/a, že svůj souhlas s účastí ve studii mohu kdykoliv bez udání důvodu stáhnout a že testování podstupuji dobrovolně a mohu svoji účast kdykoli v průběhu testování ukončit, a to i bez udání důvodu.**

.....
Jméno a příjmení účastníka studie

.....
Datum, podpis účastníka

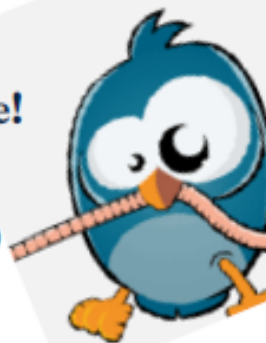
doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

.....
Jméno a příjmení výzkumníka

.....
Datum, podpis výzkumníka

Jste sova či skřivan? Je to vepsáno do Vaší DNA?

Pomozte nám
to zjistit a zapojte se do naší studie!



KOHO HLEDÁME:

- Osoby ve věku 20-40 let
- Nepracující na směny
- S dobrým zdravotním stavem

zzz



CO PRO TO UDĚLAT:

- Vyplnit dotazník na adrese "chronotyp.cz" (cca 45 minut)
- Uveďte Váš e-mail na konci dotazníku
- Dle vašich časových preferencí se osobně sejít za účelem odběru DNA

CO TÍM ZÍSKÁTE

- Informace o Vašem chronotypu na Vámi uvedený e-mail
- Informaci o Vaší DNA ve spojitosti s Vaším chronotypem

PRO BLIŽŠÍ INFORMACE SE NEVÁHEJTE NA NÁS OBRÁTIT!

Bc. Lucie Turečková
e-mail: lucie.tureckova@natur.cuni.cz

doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.
e-mail: zdenka.bendova@natur.cuni.cz

Katedra fyziologie
Univerzita Karlova
Přirodovědecká fakulta
Viničná 7, 128 43 Praha 2
www.natur.cuni.cz