

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Faustýna Stanislavová

Dynamika degradace hodinového proteinu PER2 pomocí detekce bioluminiscence v reálném čase ve tkáňovém explantátu cirkadiánních hodin mPER2^{Luc} myši

Dynamic of PER2 clock protein degradation detected by real time bioluminescence assay in the tissue explant of the circadian clock of mPER2^{Luc} mouse

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

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, dne 20. 8. 2021

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Aleně Sumové, CSc., DSc. za čas, trpělivost a ochotu, se kterou se mi věnovala. Také za cenné rady a inspirativní přístup k práci a ke světu. Velice děkuji za pomoc a příjemné pracovní prostředí celé laboratoři Biologických rytmů na Fyziologickém ústavu AVČR: Mgr. Martinovi Sládkovi, PhD., Mgr. Milice Drapšin, Evě Suchanové a RNDr. Pavlovi Houdkovi. V neposlední řadě děkuji katedře Biochemie a Prof. RNDr. Petrovi Hodkovi, CSc. za důsledné konzultace, přípravu a propojení se zajímavým tématem.

ABSTRAKT

Hlavním oscilátorem cirkadiánních rytmů jsou suprachiasmatická jádra. Pomocí hodinových genů a jejich proteinových produktů (tvořících zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky) představují významnou roli v řízení mnoha tělesných funkcí. Díky metodě využívající transgenní organismy byla měřena bioluminiscence, potažmo množství hodinového proteinu PER2. V této práci byl využit cykloheximid k inhibici proteosyntézy a k následnému sledování degradace tohoto hodinového proteinu v reálném čase. Protein byl měřen v explantátech suprachiasmatických jader dospělých myší, v suprachiasmatických jádrech fěťů a v placentách. Dále byly porovnávány vlivy inhibitorů glykogensyntasykinasy 3 β na dynamiku degradace proteinu PER2. Využit byl selektivní inhibitor CHIR-99021 a nespecifický inhibitor chlorid lithný. Z experimentu vyplývá, že inhibitor CHIR degradaci proteinu zpomaluje, a to ve všech použitých tkáních. Oproti tomu vliv nespecifického inhibitoru chloridu lithného nebyl jednoznačně určen. U fetálních jader byl jeho vliv na dynamiku degradace zpomalující, zatímco u dospělých jader byla degradace výrazně zrychlována. U explantátů placent nebyly pozorovány signifikantní výsledky. Výzkumy, zaměřující se na ovlivnění těchto hodinových genů, resp. jejich proteinů, by v budoucnu mohly být využity k terapeutickému cílení.

Klíčová slova:

hodinový protein PER 2, degradace proteinu, inhibice proteosyntézy, cykloheximid, bioluminiscence

ABSTRACT

Suprachiasmatic nuclei are the main oscillator of circadian rhythms. Using clock genes and their protein products (forming transcription-translation feedback loops), suprachiasmatic nuclei play an important role in the control of many physiological functions. Bioluminescence (the amount of hourly protein PER2) was measured by a method using transgenic organisms. In this work, cycloheximide was used to inhibit proteosynthesis and to subsequently monitor the degradation of PER2 in real time. The protein was then measured in explants of suprachiasmatic nuclei of adult mice, in suprachiasmatic nuclei of fetuses and in placentas. Furthermore, the effects of glycogen synthase kinase 3 β inhibitors on the dynamics of PER2 protein degradation were compared. A selective inhibitor CHIR-99021 and a non-specific inhibitor lithium chloride were used. The experiment shows that the CHIR inhibitor slows down protein degradation in all tissues used. In contrast, the effect of a non-specific lithium chloride inhibitor has not been clearly demonstrated. In fetal nuclei, its effect on the dynamics of degradation was slowing, while in adult nuclei, degradation was significantly accelerated. No significant results were observed in placental explants. Research focusing on the influence of these clock genes, respectively their proteins could be used for therapeutic targeting in the future.

Key words:

clock protein PER2, protein degradation, proteosynthesis inhibition, cycloheximide, bioluminescence

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD	11
1.1	BIOLOGICKÉ RYTMY	11
1.2	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM SAVCŮ	12
1.2.1	<i>Suprachiasmatická jádra</i>	<i>13</i>
1.2.2	<i>Periferní oscilátory</i>	<i>14</i>
1.2.3	<i>Podstata molekulárního mechanismu</i>	<i>15</i>
1.2.4	<i>Synchronizace cirkadiánního systému</i>	<i>20</i>
1.2.5	<i>Transgenní organismus - PER2::LUC myš.....</i>	<i>24</i>
2	CÍL PRÁCE	25
3	MATERIÁL A METODY	26
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A PROGRAMY	26
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A JINÝ MATERIÁL.....	27
3.3	SEZNAM ROZTOKŮ A MÉDIÍ.....	28
3.4	METODY	29
3.4.1	<i>Příprava explantátů - řezů tkáně</i>	<i>29</i>
3.4.2	<i>Příprava média s luciferinem</i>	<i>30</i>
3.4.3	<i>Příprava Petriho misek pro měření explantátů.....</i>	<i>31</i>
3.4.4	<i>Měření pomocí přístroje LumiCycle</i>	<i>31</i>
3.4.5	<i>Příprava roztoků inhibitorů</i>	<i>31</i>
3.4.6	<i>Aplikace inhibitorů a měření degradace proteinu</i>	<i>32</i>
3.4.7	<i>Odmývání inhibitorů</i>	<i>33</i>
3.4.8	<i>Statistická analýza</i>	<i>33</i>
4	VÝSLEDKY	35
4.1	MĚŘENÍ DEGRADAČNÍCH KŘIVEK PROTEINU PER2.....	35
5	DISKUZE.....	39
6	ZÁVĚR.....	41
7	REFERENCE.....	42

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AMPK	"AMP-activated protein kinase", AMP-aktivovaná protein kinasa
AVP	"Arginine vasopressin", arginin-vazopresin
bHLH-PAS	"basic helix-loop-helix PAS" doména, Per-Arnt-Sim doména - proteinová doména sloužící jako receptor, název je složený ze tří proteinů (period circadian protein, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, single minded protein), šroubovice-smyčka-šroubovice je strukturní motiv, který charakterizuje tento receptor
Bmal1	"Brain and muscle ARNT-like protein 1", jeden z hodinových genů
BMAL1	protein genu Bmal1
B27	"biotin", mnohasložkový doplněk podporující životaschopnost neuronů
CCGs	"Clock Controlled Genes", hodinami kontrolované geny
CHIR	CHIR-99021, derivát aminopyrimidinu, inhibitor GSK3
CHX	"cycloheximide", cykloheximid, inhibitor syntézy bílkovin
<i>CK1ϵ/δ</i>	"Casein kinaze 1 ϵ/δ ", kasein kinasa 1 izoformy ϵ a δ
Clock	"Circadian Locomotor Output Cycles Kaput", jeden z hodinových genů
CLOCK	protein z rodiny genů Clock
CRE	"cyclic AMP responsive element", cyklický AMP responzivní element, úsek na DNA regulující transkripci
CREB	"cyclic AMP responsive element binding protein", protein vázající cAMP responzivní element (CRE)
Cry 1, Cry 2	"Cryptochrome 1, 2", hodinové geny
CRY	protein z rodiny genů Cryptochrom
DMEM	"Dulbecco's modified eagle's medium", médium pro buněčné kultury
dmSCN	"dorsomedial", dorzomediální část SCN
DMSO	"Dimethylsulfoxide", dimethylester kys. siřičité, rozpouštědlo
DMV	"Dorsal motor nucleus of the vagus", dorzální motorické jádro bloudivého nervu

DPBS	"Dulbecco's phosphate buffered saline", pufrující solný roztok
E12	"embryonal", embryonální 12. den
E15	"embryonal", embryonální 15. den
E-box	"Enhancer box" - regulační oblast na promotoru hodinových genů (sekvence 5'-CACGTG-3')
E3 ubiquitin ligasa	enzym katalyzující přenos ubiquitinu
FBS	"Fetal bovine serum", hovězí fetální sérum
GABA	"Gamma-aminobutyric acid", kyselina γ -aminomáselná, inhibiční neurotransmitter
GHT	"Geniculohypothalamic tract", genikulohypothalamický trakt
GR	"Glucocorticoid receptor", glukokortikoidní receptor
GRE	"Glucocorticoid responsive element", glukokortikoidní responzivní element, úsek DNA regulující transkripci
GRP	"Gastrin-releasing peptide", neurotransmitter stimulující uvolnění gastrinu
GSK3 β	"Glycogen synthase kinase 3 β ", glykogensyntasakinas 3 izoforma β
HBSS	"Hank's balanced salt solution", směs pufrů fyziologického pH
HEPES	"(HydroxyEthyl) Piperazine-EthaneSulfonic acid", univerzální pufrující roztok fyziologického pH
HSE	"Heat shock element", element teplotního šoku, regulační oblast DNA
HSF	"Heat shock transcription factor 1", transkripční faktor teplotního šoku 1
IGL	"Intergeniculate leaflet", intergenikulární list thalamu
IML	"Intermediolateral nucleus", intermediolaterální sloupec páteřní míchy
ipRGCs	"intrinsically photosensitive retinal ganglion cells", vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky sítnice, fotoreceptory sítnice obsahující melanopsin
LD	"light-dark cycle", cyklus světlo-tma, 12 hodin světlo a 12 hodin tma
LH	"Luteinizing hormone", luteinizační hormon

LHRH	"Luteinizing hormon releasing hormone", gonadoliberin
LL	"light-light cycle ", podmínky stálého světla, 24 hodin světlo
MAPK	"Mitogen-activated protein kinases", mitogenem aktivované kinasy
mPer2 ^{Luc}	označení transgenního organismu, gen <i>Per2</i> je sfúzován s genem pro luciferasu
NREM	"non-REM", spánková protifáze REM
PACAP	"Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide", hypofyzární adenylátcyklasu aktivující polypeptid
Per 1, Per 2, Per 3	"Period 1,2,3", hodinové geny
PER 2	protein genu Per 2
PER2::LUC	fúzní protein PER2 a luciferasy
PTMs	"Post-translational modifications", post-translační modifikace
PVN	"Paraventricular nucleus", paraventrikulární jádro hypothalamu
REM	"rapid eye movement", fáze spánku
<i>Rev-erba</i>	alternativní označení genu NR1D1, jeden z hodinových genů
REV-ERB α	jaderný receptor, protein genu <i>Rev-erba</i>
RHT	"Retinohypotalamic tract", retinohypotalamický trakt
RN	"Raphe nucleus", jádra raphe, neurony sahající od prodloužené míchy ke střednímu mozku
<i>Rora</i>	"Retinoic acid-related orphan receptor α ", gen pro jaderný receptor
ROR α	jaderný receptor, protein genu <i>Rora</i>
SCN	"Suprachiasmatic nuclei", suprachiasmatická jádra
SRE	"Serum response element", sérum responzivní element
SRF	"Serum response factor", sérum responzivní faktor, transkripční faktor vázající SRE
SUMO	"Small ubiquitin-related modifier", malý modifikátor podobný ubiquitinu, molekula podobná degradační značce - ubiquitinu
τ	perioda endogenních oscilací
T	perioda vnějšího solárního dne
TTFL	"Transcription-translation feedback loop", transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky

VIP "vasoactive intestinal peptide", vasoaktivní střevní peptid,
neurotransmitter

vISCN "ventrolateral SCN", ventrolaterální část SCN

1 Teoretický úvod

Živé organismy se přizpůsobily periodicky opakujícím se dějům v životním prostředí (například střídání dne a noci, či střídání ročních období), a to vyvinutím vlastního vnitřního časového systému. Díky této adaptaci mohou předvídat cyklické změny v prostředí a připravit se na ně. Pomocí tohoto vnitřního systému, tzv. biologických hodin mohou seřadit vlastní metabolismus tak, aby byl v souladu s okolím. Rytmičné děje v organismu jsou řízené systémem centrálních a periferních hodin s molekulárním mechanismem zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček hodinových genů. Tyto rytmy jsou endogenní povahy (vrozené) a běží i v prostředí bez periodického podnětu s vlastní periodou blízkou 24 hodinám, tzv. cirkadiánní ("circa" - asi, "dies" - den) periodou. Centrální hodiny jsou však za běžných podmínek pravidelně synchronizovány tak, aby nedocházelo k postupnému zpoždování či předbírání rytmů vůči těm okolním. Nejčastějším synchronizátorem (tzv. Zeitgeber) centrálních hodin je světlo.

1.1 Biologické rytmy

Biologické rytmy jsou obecně jevy, při nichž se určitá biologická proměnná pravidelně navrácí do výchozí fáze. Mohou to být cyklicky se měnící hladiny hormonů nebo proteinů, pomocí kterých tyto rytmy následně ovlivňují řadu fyziologických funkcí v organismech. Vyjádření rytmů nalezneme v měnící se tělesné teplotě, v homeostáze glukosy, ve střídání fází aktivity a klidu či u aktivity trávicího traktu při příjmu potravy. Dle délky periody jsou poté členěny na ultradiánní, cirkadiánní a infradiánní. Jak již názvy napovídají, ultradiánní rytmus má periodu kratší než 24 hodin (předpony jsou vztaženy k frekvenci) a u savců je to například střídání spánkových fází REM a NREM či uvolňování hormonů LHRH a LH. Infradiánní rytmus má naopak periodu delší než 24 hodin a řadíme sem například menstruační cyklus a hibernaci. U poslední zmíněné skupiny - cirkadiánních rytmů, je perioda přibližně jeden den, tedy 24 hodin [1].

Biologické vnitřní hodiny nalezneme ve všech živých systémech od fotosyntézy v rostlinách po řízení dějů v těle člověka [2]. Rytmy představují evolučně konzervativní přizpůsobení prostředí počínaje již u raných forem života. Stejně jako u člověka, tak i u vývojově nižších forem života jsou oscilátory řízeny

především světlem či příjmem potravy. První zmínky o cirkadiánních rytmech lze nalézt již na počátku 18. století, kdy francouzský geofyzik a astronom sledoval pohyb heliotropní rostliny (citlivka stydlivá - *mimosa pudica*), která se i při naprosté tmě otáčela směrem ke slunci [3] [4].

Cirkadiánní rytmy savců jsou řízené hierarchicky organizovanými vnitřními oscilátory, neboli endogenním cirkadiánním časovým systémem (od periodicky exprimovaných genů po vyjádření fyziologické funkce). Tento systém je centrálně řízen z ventrální (přední) části hypothalamu, kde sídlí tzv. pacemaker ("master oscillator" - hlavní udavatel rytmu). Tímto hlavním oscilátorem jsou suprachiasmatická jádra (SCN), která následně synchronizují všechny periferní oscilátory v těle na úrovních systémů, tkání i buněk [5].

1.2 Cirkadiánní systém savců

Jak již bylo zmíněno, cirkadiánní rytmy mají periodu blížíci se 24 hodinám a jsou řízené hierarchicky organizovanými oscilátory. Rytmy jsou endogenní povahy, což znamená, že jejich vlastní perioda je udržována i v neperiodickém prostředí. Aby však nedocházelo k předbíhání či zpoždění tohoto rytmu oproti vnějším rytmům, je tato perioda pravidelně synchronizována s okolním prostředím. Centrálními hodinami jsou suprachiasmatická jádra (SCN) sídlící v hypothalamu, která následně řídí periferní oscilátory pomocí mnoha signálů. Periferní hodiny se nacházející v jiných oblastech mozku či v různých tkáních a orgánech [6]. Pro správné fungování metabolismu je potřeba synchronizovat nejen centrální hodiny s okolím, ale také oscilátory navzájem mezi sebou [7]. Nejdůležitější synchronizace je zajištěna spojením retiny s SCN, díky které získávají centrální hodiny signál o světle a mohou následně seřizovat periferní oscilátory [8] [9].

Ne všechny oscilátory v těle jsou však schopné sebeudržujících oscilací a synchronních výstupních signálů i v izolaci. Tuto funkci zastává pouze tzv. pacemaker ("master oscillator"), kterému jsou následně podřízeny semiautonomní oscilátory. Těmi jsou buňky samostatně vytvářející rytmy (např. exprese genů), které jsou však závislé na centrálním oscilátoru. Nejsou schopné rytmicitu udržet dlouhodobě synchronizovanou v rámci jednoho orgánu. Posledním typem jsou

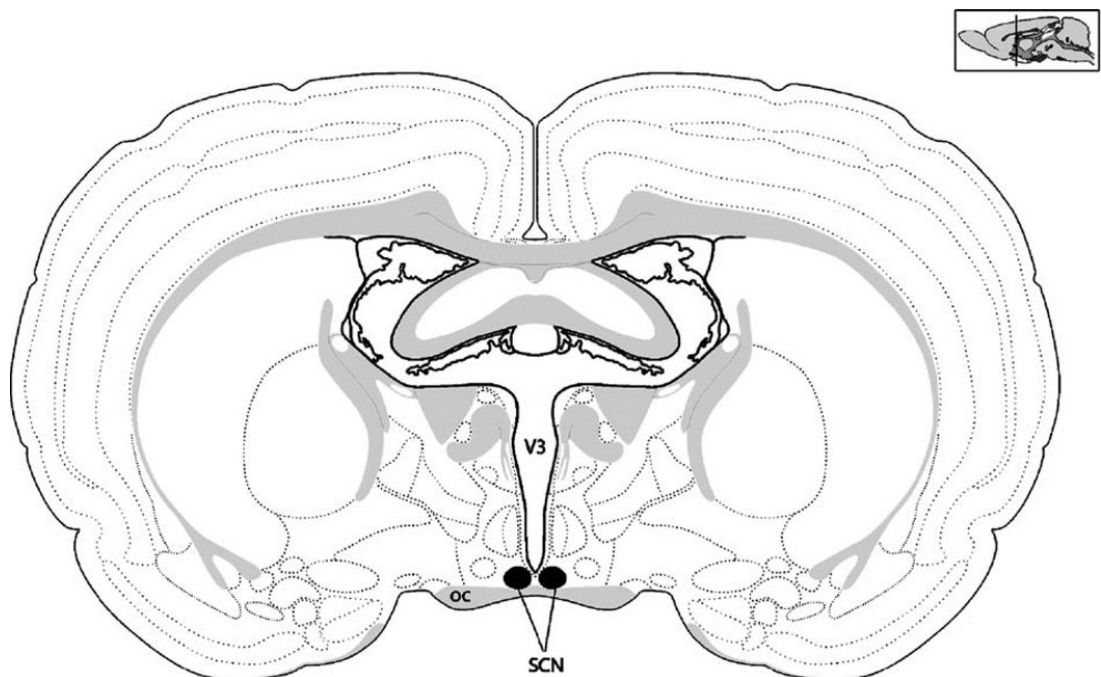
podřízené oscilátory ("slave" oscillator), které jsou schopné oscilace pouze za přítomnosti pravidelného signálu z výše postaveného oscilátoru [10] [2].

Vyjádřením cirkadiálního systému jsou různé rytmické fyziologické funkce, jako například aktivita a spánek, uvolňování hormonů, fáze krevního tlaku či teploty [11].

1.2.1 Suprachiasmatická jádra

Suprachiasmatická jádra (suprachiasmatic nuclei - SCN) jsou hlavním cirkadiálním oscilátorem (pacemaker) [11], bez kterého by organismus ztratil cirkadiální rytmicitu. U hlodavců je každá část této párové struktury složena z přibližně 8 - 10 tisíc neuronů, přičemž každá buňka je samostatným oscilátorem [12]. Přesto SCN produkují jednotný rytmický signál díky jejich vzájemnému propojení a synchronizaci [9].

Jak již název napovídá, tyto dvě jádra oválného tvaru se nachází v hypothalamu nad optickým chiasma (zkřížení optických nervů). Viz obr. č. 1 str. 13.



Obr.1: Řez mozkem hlodavce s vyznačeným umístěním suprachiasmatických jader. SCN se nacházejí těsně nad optickým chiasma (OC) a obstupují třetí mozkovou komoru (V3). Převzato a upraveno z [13].

Každé toto jádro je morfologicky a funkčně děleno na dorzomediální obal - "shell" - (dmSCN) a ventrolaterální jádro - "core" - (vlSCN) [14]. Obě tyto části

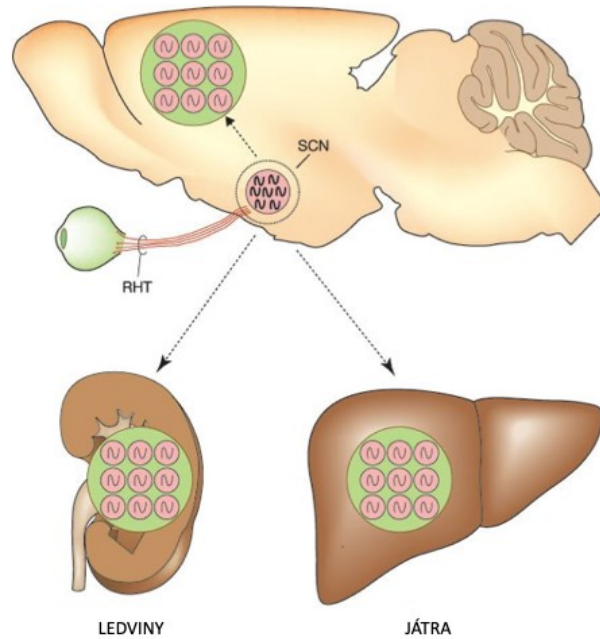
jsou propojeny mnoha synapsemi a mají odlišnou úlohu [15]. Ventrolaterální jádro je blíže optickému zkřížení a je tedy zodpovědné za příjem světelných signálů ze sítnice oka, také z thalamu a hypothalamu, zatímco dorzomediální obal získává signály z oblasti předního mozku a mozkového kmene [16].

Vzájemná komunikace oblastí SCN je zajištěna nejen elektrickou aktivitou, ale i neurotransmitery, jako je například kyselina γ -aminomáselná (GABA) či produkce neurotransmiterů specifických pro danou oblast [17]. Zatímco neurony dorzomediálního obalu produkují arginin-vasopresin (AVP), u ventrolaterálního jádra je typická produkce vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP) či gastrin uvolňujícího peptidu (GRP) [14].

Zajímavým faktem, kterým se potvrdila funkce pacemakeru, je, že při odstranění SCN dojde ke ztrátě celkové rytmicity. Následnou transplantací rytmujících SCN je však tato funkce obnovena a to s periodou odpovídající dárci transplátu [18].

1.2.2 Periferní oscilátory

Cirkadiánní hodiny lze nalézt i v jiných částech organismu (nejen v SCN) a i tyto oscilátory tvoří autonomně rytmické signály [19]. Pro synchronizaci fází v celém organismu je však stále nutné jejich pravidelné seřizování suprachiasmatickými jádry pomocí neuronálních a humorálních drah [8]. Nacházejí se například v játrech, střevu, slinivce břišní, srdci, nadledvinách, kosterním svalstvu a jiných oblastech mozku či v tukové tkáni [7] [20].



Obr.2: Hierarchický systém oscilátorů. SCN získávají informace z vnějšího prostředí a poté seřizují podřízené oscilátory v organismu. Převzato a upraveno z [21].

Periferní oscilátory jsou seřizovány nejen signály z SCN, ale též nezávisle pomocí změny režimu v příjmu potravy [22].

1.2.3 Podstata molekulárního mechanismu

Za tvorbu rytmických signálů je zodpovědný autoregulační mechanismus zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček (TTFL z angličtiny "transcription-translation feedback loop"), jehož se účastní hodinové geny a jejich proteinové produkty, které ovlivňují transkripci vlastních mRNA. Do sady hodinových genů tedy řadíme ty, které jsou rytmicky exprimovány díky zpětným vazbám svých produktů, a jejichž vyřazením z funkce by došlo ke ztrátě rytmicity. Cyklus těchto smyček je opakován s cirkadiánní periodou a oscilace jsou samy udržovány [23]. (V následném popisu smyček jsou geny psány kurzívou a proteiny velkými písmeny.)

Mezi hodinové geny zapojené do TTFL řadíme geny - *Per 1*, *Per 2*, *Per 3* (Period), *Cry 1*, *Cry 2* (Cryptochrom), *Clock* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), *Bmal1* (Brain and Muscle ARNT-like protein 1), *CK1 ϵ/δ* (kasein kinasa 1 ϵ/δ), *Rev-erba* a *Rora* (Retinoic acid-related orphan receptor) [24].

Proteinové produkty CLOCK a BMAL1 tvoří na začátku dne heterodimer (přes bHLH-PAS doménu), který je pozitivním regulátorem transkripce. Vazbou na E-box elementy přítomné na promotorech genů *Per*, *Cry*, *Rora* a *Rev-erba* aktivuje CLOCK:BMAL1 heterodimer transkripci příslušných genů [25]. Následně produkty PER a CRY tvoří v cytoplazmě taktéž heterodimery, které jsou po fosforylaci kinasami (CKI ϵ / δ) translokovány do jádra. V jádře se váží na komplex CLOCK:BMAL1, inhibují jeho aktivační vliv na transkripci a tím potlačují svou vlastní tvorbu [26]. Exprese genu *Bmal1* je regulována přítomností jaderných receptorů ROR α (aktivace transkripce) a REV-ERB α (inhibice transkripce), které kompetují o vazebné místo na promotoru tohoto genu [27]. Tyto proteiny jsou rytmicky tvořeny díky vazbě již zmíněného heterodimeru CLOCK:BMAL1. Tento komplex tedy nepřímo ovlivňuje transkripci svých genů [23] (viz obr. č. 3 str. 13).

Na chodu hodin se významně podílejí post-translační modifikace (PTMs) hodinových proteinů. Patří sem fosforylace, acetylace, ubiquitinace či sumoylace, které určují stabilitu proteinů a jejich lokaci. Významnou úlohu mají fosforylace. Proteiny PER a CRY jsou fosforylovány nejen pro transport do jádra, ale i pro přípravu na degradaci. Tyto negativní regulátory transkripce se během dne hromadí v cytoplazmě a je potřeba, aby byly degradovány a tím byla opožďována jejich translokace do jádra. Díky tomuto procesu je transkripčně-translační cyklus prodloužen tak, aby běžel s cirkadiánní periodou. Kinasy jako CKI ϵ / δ , AMPK (AMP-aktivovaná protein kinasa) či GSK3 β (glykogensyntasakinasa 3 β) spouštějí signální kaskády pro E3 ubiquitin ligasu, čímž zajišťují následnou degradaci proteinů v proteasomu [28] [29]. Závisí však na místě fosforylace, které rozhodne, zda bude příslušný protein degradován či translokován do jádra. Zmíněné kinasy CKI ϵ / δ či GSK3 β fosforylují PER v dimeru PER:CRY (vytvořením ternárního komplexu) a umožňují tím translokaci dimeru do jádra [30]. Fosforylace samotného PER proteinu však vede k jeho degradaci (fosforylace na jiném serinu/threoninu, bez vazby CRY) a to navázáním ubiquitinové značky, kterou rozpoznává E3 ubiquitin ligasa s následnou degradací v proteasomu [31]. Inhibicí kinasy CKI ϵ se degradace PER zpomalí a perioda hodin se prodlouží, zatímco při mutaci kinasy dochází k hyperfosforylaci PER proteinů, rychlejší degradaci a tím zkrácení cirkadiánní periody [32] [33]. CKI ϵ

také fosforylací BMAL1 zvyšuje transkripční funkci dimeru CLOCK:BMAL1 [30]. Pokud je však BMAL1 fosforylován MAPK (mitogenem aktivované kinasy), vede to naopak k inhibici této transkripční funkce [34]. Destabilizační kaskáda, vedoucí k degradaci CLOCK a BMAL1, je zajištěna fosforylací těchto proteinů kinasou GSK3 β [35]. Pro translokaci BMAL1 do jádra je využívána fosforylace kinasou CKI α a fosforylace PKC (protein kinasa C) pro CLOCK [30] [36]. Protein CRY je veden k degradaci fosforylací GSK3 β a AMPK [37] [38]. Nefunkční ubiquitin ligáza vede k prodloužení periody rytmů [39].

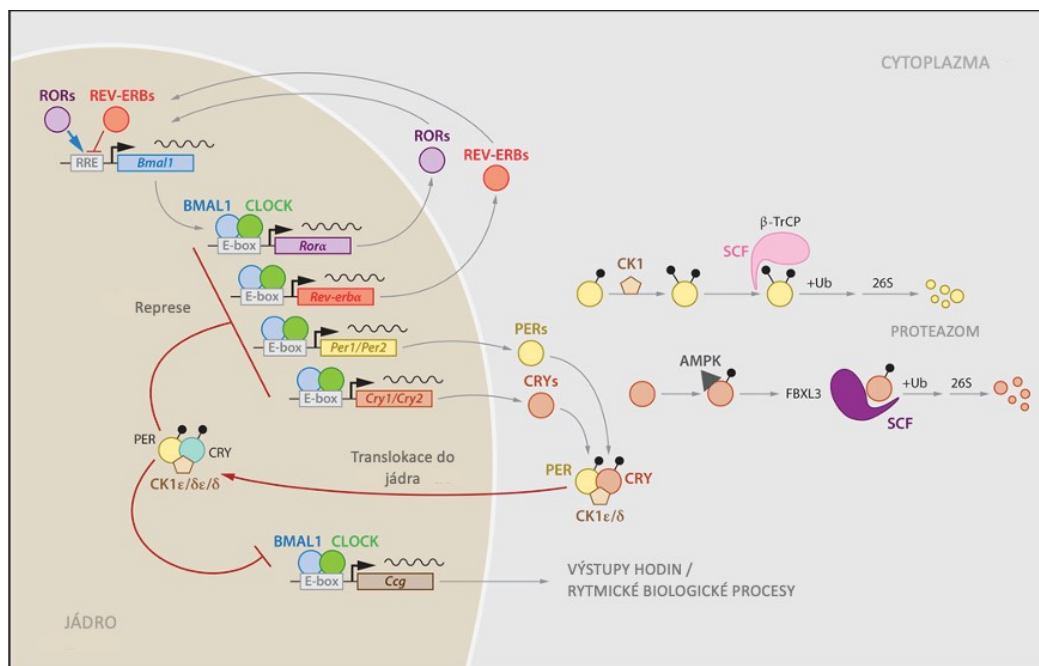
Další posttranslační modifikací je acetylace respektive deacetylace. Například protein CLOCK má acetylázovou aktivitu (acetyluje vazebného partnera BMAL1), která je využita pro usnadněnou tvorbu dimeru CLOCK:BMAL1 [40]. Zároveň je následně umožněna vazba CRY pro inhibici transkripční funkce dimeru. Dále je zajišťována acetylace PER2 pomocí O-GlcNAc transferasy, a to v místech, které jsou zároveň cíli pro fosforylaci. Acetylace je zde tedy antagonistou fosforylace, z čehož vyplývá, že při inhibici acetylace dochází ke zkrácení periody hodin a při inhibici deacetylace k jejímu prodloužení [41].

Při sumoylaci dochází k připojení proteinů SUMO (malý modifikátor podobný ubiquitinu) na BMAL1, což je signál vedoucí k degradaci. Zároveň však sumoylace podporuje transkripci dimeru BMAL1:CLOCK [42].

Již zmíněnou ubiquitinací značíme reakci, při které jsou navázáním ubiquitinu označeny proteiny k degradaci. Ubiquitin slouží jako signál pro následnou degradaci proteinu v proteasomu.

Poruchy v mechanismu PTMs mohou způsobit defekt rytmicity, a to zejména změny v délce vnitřní periody.

Kromě promotorů hodinových genů jsou E-boxy pro vazbu aktivátoru CLOCK:BMAL1 přítomny i na promotorech tzv. hodinami kontrolovaných genů (CCGs - "Clock Controlled Genes"), které nejsou přímo nutné pro tvorbu oscilací, ale zajišťují přenos cirkadiálních signálů z hodin na periferii [43].



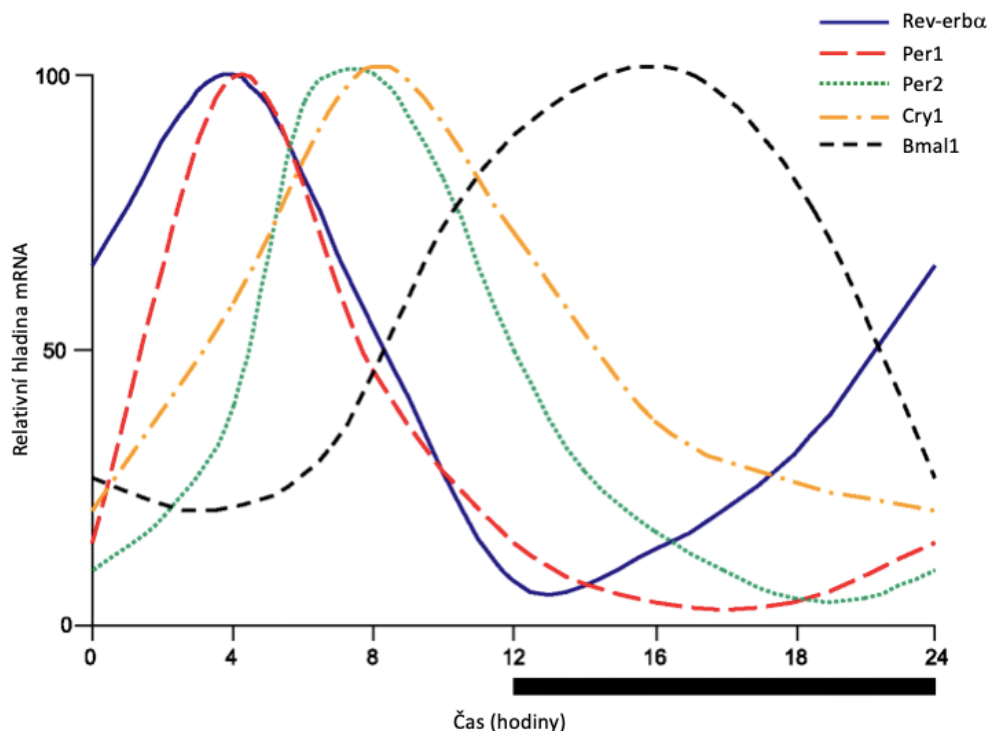
Obr.3: Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin u savců. Autoregulační zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky. Schéma pozitivních a negativních regulací exprese hodinových genů. Produkty hodinových genů *Per* a *Cry* tvoří heterodimery, které se translokují do jádra a zpětně inhibují transkripci vlastních i dalších hodinových genů. Heterodimer proteinů *BMAL1* a *CLOCK*, který sedá na *E-box* promotoru genů, má aktivační funkci. Proteiny jsou fosforylovány a degradovány v cytoplasmě pomocí proteazomů. Dalšími produkty hodinových genů jsou receptory *ROR* a *REV-ERB*, které aktivují (*ROR*) či potlačují (*REV-ERB*) expresi genu *Bmal1*. Převzato a upraveno z [5].

1.2.3.1 Period geny

Period geny a jejich proteinové produkty tvoří negativní regulační část zpětnovazebných smyček výše zmíněného mechanismu. U savců jsou známy tři homology *Per* genů - *Per1*, *Per2*, *Per3*. Mutace *Per1* a *Per2* genů ovlivňuje délku periody i udržení rytmicity [44].

Pro správnou funkčnost zpětnovazebných smyček jsou exprese jednotlivých hodinových genů s následnými hladinami daných mRNA vůči sobě vzájemně nastaveny na určitou fázi (viz obr. č. 4 str. 19). V suprachiasmatických jádrech je exprese genu *Per2* nejvyšší uprostřed světlé části dne a nejnižší během noci [45].

Hladiny proteinů jsou za hladinami mRNA opožděny o přibližně 6 hodin [46] [29]. Námí sledovaný protein *PER2* (viz obr. č. 5 str. 20) má tedy v podmínkách cyklu 12 h světlo - 12 h tma (LD12:12) nejvyšší hladinu na začátku tmavé části dne.



Obr.4: Schématické znázornění oscilujících hladin mRNA hlavních hodinových genů v závislosti na čase. Čas je znázorněn v hodinách, jako škála subjektivního dne (od úsvitu k úsvitu). Pod osou je černým pruhem vyznačena tmavá část dne (subjektivní noc) poukazující na 12 hodin tmy a 12 hodin světla. Hladiny mRNA *Rev-erba* a *Per1* vrcholí brzy v subjektivním dni, později ve světlé fázi dne vrcholí *Per2*, *Cry1* a v protifázi se staví *Bmal1*. Převzato a upraveno z [46].

Per geny navíc zastávají funkci jako tzv. geny časné odpovědi, jejichž exprese (transkripce s následnou translací) je rychle indukovatelná různými stimuly [47].

Na svém promotoru mají místa pro navázání transkripčních faktorů, kterými mohou být cyklický AMP responzivní element (CRE) vázající příslušný fosforylovaný protein (CREB), element teplotního šoku (HSE) vázající transkripční faktor teplotního šoku 1 (HSF), sérum responzivní element (SRE) pro vazbu sérum responzivního faktoru (SRF) či glukokortikoidní responzivní element (GRE) vázající glukokortikoidní receptor (GR). Modulace exprese *Per* genů těmito transkripčními faktory (snímající signály) hraje důležitou roli při synchronizaci hodin [48].



Obr.5: Protein PER2. PER2 (*Mus musculus*) s barevně rozlišenými strukturami (červeně alfa-helixy, žlutě beta-skládané listy, zeleně smyčky). Vytvořeno v PyMOL verze 2.4.1. - Schrödinger (zdroj kódu - uniprot 3GDI).

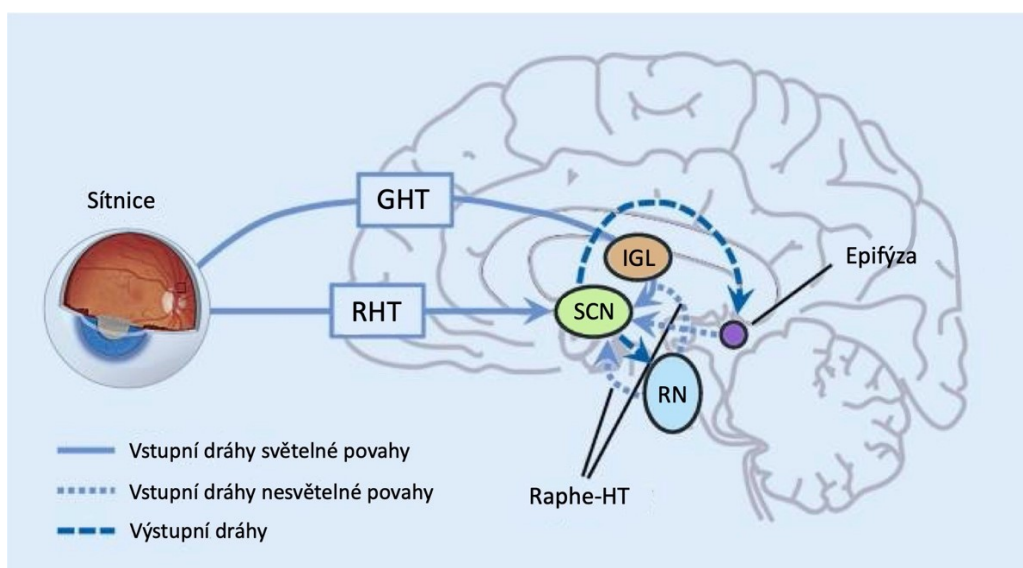
1.2.4 Synchronizace cirkadiálního systému

Jak již bylo zmíněno, centrální hodiny tvoří cirkadiální oscilace, které jsou udržovány i bez vnějších podnětů - tzv. volný běh. Aby však nedocházelo k předbíhání či zpoždění fází rytmů vůči sobě, je nutná pravidelná synchronizace endogenní periody cirkadiálních hodin organismu (τ) s vnější periodou solárního dne (T). Seřízení probíhá nejen na úrovni SCN s okolním prostředím, ale i mezi oscilátory navzájem. Je tím zaručena správná funkce hodinového systému, potažmo celého metabolismu. Hlavním synchronizátorem (tzv. Zeitgeber) SCN je světlo.

1.2.4.1 Synchronizace oscilátorů

Pro synchronizaci zmíněných period je nejdůležitějším řídicím faktorem světlo. Signál o světle je zachycen na sítnici (retině) oka retinálními fotoreceptory - světločivnými gangliovými buňkami ipRGCs ("intrinsically photosensitive retinal ganglion cells") [50]. Tyto buňky tvoří fotopigment melanopsin, který absorbuje fotony (podobně jako další opsiny fotoreceptorů) a díky kterému je informace zachována i v případě absence tyčinek a čípků [51].

Následný přenos informace do vlSCN je zajištěn axony gangliových buněk, tvořících retinohypothalamický a genikulohypothalamický trakt (schéma drah viz obr. č. 6 str. 21).

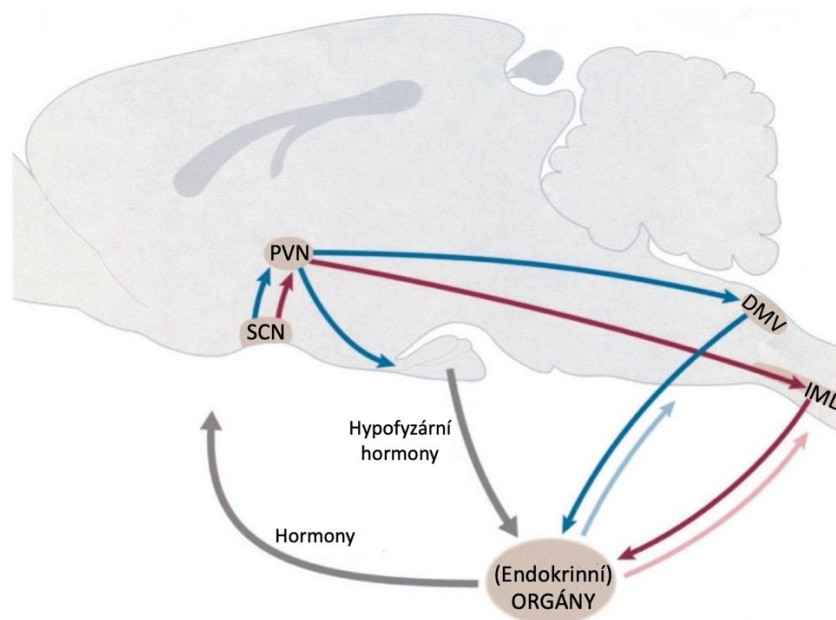


Obr.6: Vstupní a výstupní dráhy SCN. Jednou z hlavních drah přivádějících signál o světle do vlSCN je retinohypothalamický trakt (RHT). Z nervových zakončení této dráhy se vylévají neurotransmitery glutamát a PACAP (hypofyzární adenylátcyklázu aktivující polypeptid), které aktivují specifickou signální kaskádu vedoucí k fosforylaci proteinu CREB [53]. Ten se následně váže na specifický úsek promotoru (CRE) genů *Per*, a tím indukuje jejich transkripci. Následné zvyšování hladiny PER proteinů má vliv na dynamiku zpětnovazebných smyček, a tím vyvolává posun fáze exprese hodinových genů. Další možnou dráhou pro přenos informace o světle je genikulohypothalamický trakt (GHT), který je z retiny nepřímě veden skrze intergenikulární listek thalamu (IGL) [56]. Na synapsích ve vlSCN je uvolňovaným mediátorem neuropeptid Y. V této dráze dochází k integraci světelných a nsvětelných podnětů, které jsou do thalamu přiváděny z jiných částí mozku [57]. Z epifýzy a jader raphe (RN) přijímají SCN skrze serotonergní dráhu podněty nefotických signálů (raphe-hypothalamický trakt Raphe-HT), jako je například pohybová aktivita [60]. Hlavní výstupní dráhy z SCN směřují k RN (informace o fázi cirkadiálních hodin a regulace stavu bdělosti) a k epifýze, kde se produkuje melatonin. Dráhy tvoří vzájemné smyčky. Převzato a upraveno z [61].

Světelný signál není jediným synchronizátorem cirkadiálních rytmů SCN. Například v podmínkách stálého světla (light-light cyklus - LL) mohou být SCN ovlivněny rytmickým režimem příjmu potravy. Je zde například obnovena exprese genů *Bmal1* a *Rev-erba* [22]. Po nějakém čase však vznikne desynchronizace mezi jednotlivými neurony (oscilátory) a ztrátou vzájemné rytmicity dojde k narušení výstupních rytmů [62]. Přesný mechanismus zatím není znám.

Dále jsou SCN citlivá i na mnohé další nesvětelné podněty [63]. Těmi může být pohybová aktivita [64] či humorální signály. Například přítomností melatoninových receptorů jsou SCN zpětně ovlivňována melatoninem, jehož tvorba v epifyze je jádrem rytmicky řízena [65]. Dále jsou zde přítomné receptory i pro leptin či ghrelin [66] [67].

Ze suprachiasmatických jader jsou vedeny výstupní nervové dráhy směrem k dalším oblastem mozku a následně do míchy a periferních orgánů. Zde je důležitým přepojovacím centrem paraventriculární jádro hypothalamu (PVN). Je tím zajišťována synchronizace podřízených oscilátorů v celém organismu s okolními podmínkami [68].



Obr.7: Schéma základních cest vedoucích z SCN směrem k periferním orgánům. Hlavní výstup SCN vede přes paraventriculární jádro hypothalamu (PVN) do hypofýzy, čímž je zajištěna kontrola tvorby hormonů. Přes PVN je také ovlivněno dorzální motorické jádro bloudivého nervu (DMV) či preganglionické neurony míchy v intermediolaterálním sloupci páteřní míchy (IML). Převzato a upraveno z [68].

Kromě SCN jsou v organismu i již zmíněné periferní oscilátory, které se nacházejí v mnoha tkáních, jimiž mohou být játra, střeva, slinivka či žaludek. Periferní hodiny nejsou přímo ovlivněny světlem, neboť zde není přímé spojení s retinou. Jsou však synchronizovány rytmickými multisynaptickými dráhami z SCN. Tyto dráhy jsou zprostředkovány autonomním nervovým systémem i signály humorální povahy [69]. Hlavním synchronizátorem v těchto drahách jsou

glukokortikoidy. Z SCN míví signály do PVN (jíž zmíněné dráhy v 1.2.4.1), odkud jsou dále přenášeny do jader sympatiku a parasympatiku. Následná sympatická inervace dřeně nadledvin způsobí vyelití zmíněných glukokortikoidů. Po jejich navázání na příslušné receptory (GR), s následnou vazbou na úsek (GRE) promotoru *Per* genů, je spuštěna transkripce příslušných genů s fází endogenních oscilací [70].

Kromě signalizace od SCN mohou být periferní hodiny synchronizovány i časem dostupnosti potravy. V případě, že je potrava zpřístupněna jen v omezeném časovém intervalu během dne, hovoříme o režimu "restricted feeding" (RF). V tuto dobu dochází ke zvýšení aktivity organismu a příjem potravy se tak stává hlavním Zeitgeberem pro seřizení periferních oscilátorů. Touto synchronizací dochází k posunu fází exprese hodinových genů, a to až o 12 hodin, zatímco exprese daných genů v SCN zůstává nezměněna. Díky výraznému posunu fází tak vzniká desynchronizace rytmů v SCN a v periférii [71].

Další roli v synchronizaci periferních hodin mají i rytmické změny v tělesné teplotě. I tyto rytmy jsou kontrolované SCN a mediátorem těchto synchronizací je faktor teplotního šoku (HSF1). Při zvýšení teploty je faktor aktivován fosforylací, čímž je umožněna vazba do promotoru hodinových *Per* genů (úsek HSE) a dochází k transkripci [72].

1.2.4.2 Vývoj a synchronizace fetálních SCN

Hlavní pacemaker cirkadiálních rytmů se u myši vyvíjí především od dvanáctého do patnáctého dne prenatalního období (E12 - E15), tedy později v embryonální fázi (březost u myši trvá asi 20 dní) [73]. Vývoj rytmů v expresi hodinových genů je detekovatelný již v E17, a to rytmickou expresí *Per1*, avšak nejsou pozorovány hladiny proteinů hodinových genů, kromě BMAL1 [74]. Tyto rytmy jsou shodné s rytmy mateřských SCN. Jelikož není umožněno přímé spojení se světelným signálem, fetální SCN jsou synchronizována mateřskou signalizací skrze rytmické nesvětelné podněty. Jednou z možných signalizačních molekul může být například melatonin, který prochází placentou a jehož receptory jsou přítomné na fetálních SCN. Přesný mechanismus není znám, ale rytmická přítomnost melatoninu ve fetálních SCN poukazuje na možnou synchronizační funkci, protože feta melatonin nejsou schopná tvořit [74]. Další možností s opačnou fází signalizace může být dopaminergní systém. V závislosti na zvýšení

neuronové aktivity SCN během dne jsou aktivovány receptory pro dopamin, který může působit jako synchronizační signál [75]. Nedávno bylo prokázáno, že se mateřské synchronizace fetálních SCN mohou účastnit také glukokortikoidní hormony [70].

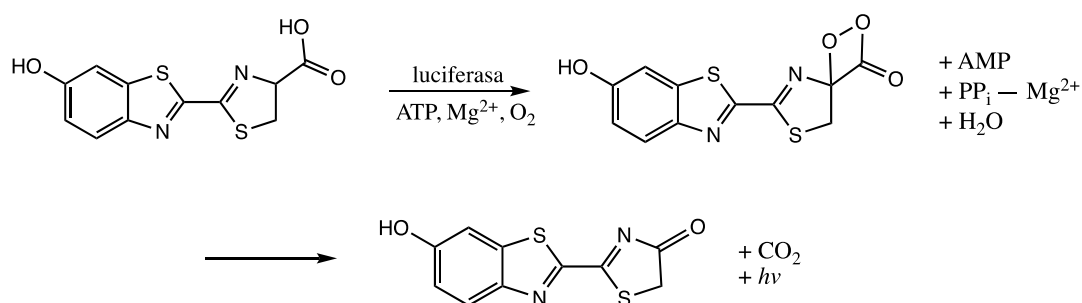
Fotosenzitivnost SCN se vyvíjí postupně během postnatálního vývoje [71]. Světelná synchronizace tedy zcela nahrazuje mateřskou signalizaci až kolem osmého dne po narození [72].

1.2.5 Transgenní organismus - PER2::LUC myš

Geneticky modifikovaný organismus (transgenní organismus) má pozměněný genom lidským zásahem. Jedná se o cílené vnesení úseku rekombinantní DNA do genetické informace organismu.

V našem případě jsme využili myš s vneseným genem pro luciferasu, který je přítomen u světlušky. Vzniká tak reportér cirkadiánní genové exprese v reálném čase, kterým lze sledovat dynamiku cirkadiánně regulovaných proteinů (v našem případě PER2) [73]. Sekvence kódující enzym luciferasu je fúzována s 3' koncem genu *Per2*. Následná exprese tohoto fúzního genu je řízena promotorem *Per2*, což umožňuje sledovat tvorbu fúzního proteinu PER2::LUC, potažmo proteinu PER2 [73].

Luciferasa je enzym, který s vhodným substrátem vede k produkci světla k tzv. bioluminiscenci. Mechanismus reakce, která je luciferasou katalyzována, spočívá v oxidaci luciferinu za přítomnosti molekulárního kyslíku, ATP a Mg^{2+} .



Obr.8: Mechanismus reakce oxidace luciferinu. Za přítomnosti hořčnatých iontů, kyslíku a ATP je schopen enzym luciferasa oxidovat luciferin (pigment emitující energii v podobě světla). Reakce je vedena přes reaktivní intermediát (skrze excitovaný stav), který se rozpadá za uvolnění CO_2 a fotonu ($h\nu$). Mechanismus nakreslen v ChemDraw 18.1.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo zaznamenat dynamiku degradace proteinu PER2 v reálném čase a její farmakologické ovlivnění ve vzorcích tkání obsahujících cirkadiánní hodiny s využitím geneticky modifikovaného myšího modelu mPer2^{Luc}.

Jednotlivé dílčí kroky:

- monitorování degradace proteinu PER2 v reálném čase pomocí měření bioluminiscence v organotypických explantátech obsahujících a) suprachiasmatická jádra dospělých jedinců, b) suprachiasmatická jádra fétů a placenty odebrané v embryonálním dni 17
- porovnání degradačních křivek pro PER2 protein u dospělých a fetálních suprachiasmatických jader a placent
- porovnání vlivu selektivního inhibitoru GSK3 β (CHIR-99021) na dynamiku degradace proteinu PER2 ve všech sledovaných tkáních
- porovnání vlivu nespecifického inhibitoru GSK3 β (LiCl) na dynamiku degradace proteinu PER2 ve všech sledovaných tkáních

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje a programy

Analytické váhy	KERN, ABJ 220-NM
Box s laminárním prouděním	Safe Flow 1.2 - Biohazard box, Bioair
Heater - suchý ohřívač, termoblok	Cube dry bath, Cleaver Scientific Ltd, EL-01
Inkubátor pro lumicycle	Binder KB 115
Inkubátor pro uchování vzorků	Incubator BD 53, WTB Binder
LumiCycle	LumiCycle 32 color, Actimetrics
Magnetická míchačka	ARED heating magnetic stirrer high power, VELP Scientifica
Mechanický sekáček	FMI Gmbh D-64342 Seeheim/Ober- Beerbach, (chopper)
Mikroskop	Mikroskop NIB-100, Novel optics
Mraznička	Ultra low temperature freezer, KM- DU73Y1, Panasonic
pH metr	VWR pHenomenal, pH 1100L
Pipetové plnidlo s čerpadlem	Hirschmann Pipetus standard
Vibratom	Vibratom Leica VT 1200S, Leica Biosystems Nussloch GmbH
Vodní lázeň	Termostat, Grant, GD 120
ChemDraw	verze 18.1., PerkinElmer
LumiCycle Analysis	Actimetric
Microsoft Excel	verze 16.50, Microsoft
Prism	verze 7, GraphPad
PyMOL	Molecular Graphics System, verze 2.4.1., Schrödinger, LLC

3.2 Použité chemikálie a jiný materiál

B27	B-27 TM Supplement (50×), Gibco (USA)
cykloheximid	Cycloheximide C4859, Sigma-Aldrich (USA)
ddH ₂ O	destilovaná deionizovaná voda, WATEK (ČR)
DMEM	DMEM D5030, Sigma-Aldrich (USA)
DMSO	Dimethyl sulfoxide D2650, Sigma-Aldrich (USA)
DPBS	DPBS D8537, Sigma-Aldrich (USA)
ethanol	Ethanol 96% p.a., 64-17-5, Penta (ČR)
FBS	Fetal Bovine serum F9665, Sigma-Aldrich (USA)
glukosa	D-(+)-Glucose, G-6152, Sigma-Aldrich (USA)
glutamax	GlutaMAX TM Supplement (100×), Gibco (USA)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), HEPES H0887, Sigma-Aldrich (USA)
hydrogenuhličitan sodný	Sodium bicarbonate S8761, 7,5% roztok, Sigma-Aldrich (USA)
hydroxid sodný	Sodium hydroxide S5881, Sigma-Aldrich (USA)
CHIR	CHIR 99021, SML1046, Sigma-Aldrich (USA)
chlorid lithný	Lithium chloride L9650, Sigma-Aldrich (USA)
chlorid sodný	Chlorid sodný p.a., 7647-14-5, Penta (ČR)
kyselina chlorovodíková	Hydrochloric acid 35% g.r., Lach-ner (ČR)
luciferin	Luciferin V8921, Promega (USA)
Penicillin-Streptomycin	Pen-Strep P0781, Sigma-Aldrich (USA)
RNase-free water	ultračistá voda bez ribonukleasy, 160032064, QIAGEN GmbH (Německo)

3.3 Seznam roztoků a médií

HBSS medium	500 ml fosfátový pufr „Dulbecco's phosphate buffered saline" - DPBS, 5 ml 1M HEPES roztok, 2,5 ml 7,5% roztok hydrogenuhličitanu sodného
"Air medium"	10 ml 1M HEPES roztok, 8,3 g pevné médium pro buněčné kultury tzv. DMEM (z anglického „Dulbecco's Modified Eagle's Medium"), 10 ml komerční roztok antibiotik penicillinu a streptomycinu, 4,7 ml 7,5% roztok hydrogenuhličitanu sodného, 4,5 g glukosa
medium s luciferinem (explantáty SCN)	47,95 ml Air medium, 1 ml B27, 0,5 ml roztoku Glutamax, 0,3 ml 16,6 mM roztok luciferinu, 0,25 ml 5,36 M roztok chloridu sodného
medium s luciferinem (explantáty placent)	41,2 ml Air medium, 0,5 ml Glutamax, 0,5 ml B27, 0,3 ml 16,6 mM luciferinu, 7,5 ml fetální hovězí sérum FBS (z anglického „fetal bovine serum")

3.4 Metody

Myši, využívané pro tuto práci, byly chovány v podmínkách LD (12 hodin světlo : 12 hodin tma) s volným přístupem k jídlu a kontrolovanou teplotou.

Všechny popsané použité nádoby, nástroje i pracovní plochy, byly udržovány sterilní po celou dobu práce. Laboratorní sklo bylo autoklávováno a neustále byl využíván 70% ethanol, pro dezinfekci ploch, nástrojů a rukavic.

Přípravy roztoků, médií a další níže popsané úkony (mimo příprav tkáně) byly prováděny v laminárním boxu (flowbox), který filtrací vzduchu zajišťuje sterilní prostředí.

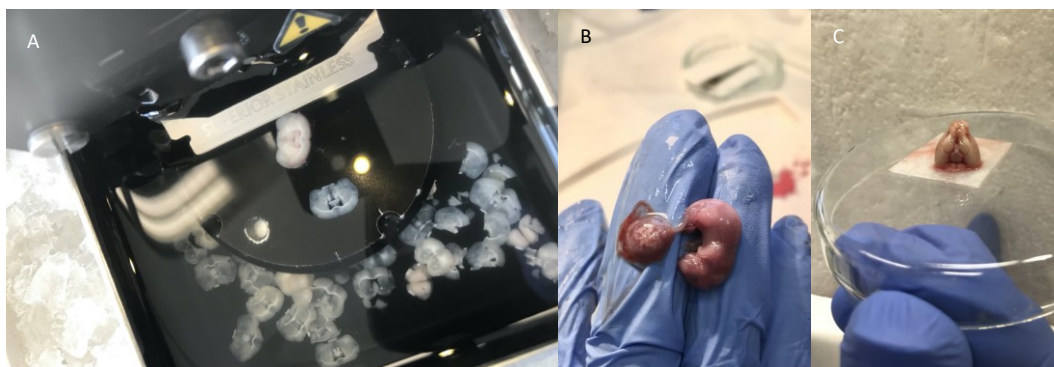
3.4.1 Příprava explantátů - řezů tkáně

Pro přípravu explantátů byl využíván Vibratom, pomocí kterého byly mozky právě usmrcených myší nařezány na 250 μ m řezy. Tento stroj využívá posuvnou, jemně vibrující, ostrou tenkou žiletku, aby byl řez tkáně co nejrovnější a tkáň byla co nejméně rozrušena. Po celou dobu (od smrti zvířete, přes řezání na vibratomu až k finálnímu získání části řezu obsahující SCN) byly tkáně uchovávány v chlazeném (předem připraveném) médiu tzv. HBSS z anglického „Hank's balanced salt solution" (směs pufrů vhodných při přípravě explantátů), a to v Petriho miskách na ledu.

Složky média HBSS pro uchovávání řezané tkáně, byly odměřeny do uzavíratelné láhve, ve které bylo následně upraveno pH tohoto roztoku (za použití klasické skleněné elektrody a roztoků 1M kyseliny chlorovodíkové a 1M hydroxidu sodného), a to na hodnotu pH 7,2. Roztok byl poté ponecháván v lednici.

V případě velmi měkkých tkání, jakými jsou námi použité placenty a části fetálních mozků, byl využit místo Vibratomu mechanický sekáček "chopper".

Ze zmíněných řezů byly následně vyříznuty (kouskem žiletky v kleštích) oblasti s cílenými SCN či malé části mateřské strany placenty (s částí přeměněné dělohy, tzv. decidua). Takto vyjmuté a připravené explantáty byly zkontrolovány pod mikroskopem (zvětšení 200 \times) a dány na připravené Petriho misky s médiem luciferinu a s tkáňovými "inzerty" (mikropórové destičky). Pokud nebyly explantáty ihned dány k měření do přístroje LumiCycle, byly ponechány v inkubátoru při 37°C.



Obr.9: Ukázky z přípravy tkání.

A: Řezy myšního mozku v HBSS médiu (nádobka obklopena ledem) v procesu řezání na Vibratomu.

B: Myší fetus (E17) s placentou.

C: Myší dospělý mozek připraven k řezání.

3.4.2 Příprava média s luciferinem

Pro přípravu média s luciferinem byl nejdříve připraven podporující roztok, obsahující aminokyseliny, vitamíny a antibiotika (vzduchem pufrované živné "Air" medium). Do velké sterilizované kádiny bylo převedeno asi 800 ml ultra čisté deionizované vody a za stálého míchání na magnetické míchače, byly postupně přidány složky tohoto roztoku. Roztok byl míchán asi 10 minut, než se všechny složky řádně rozpustily a následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,2 (opět využitím skleněné elektrody). Roztok byl přelit do litrového odměrného válce, doplněn deionizovanou vodou na objem jednoho litru a byl filtrován. Na plastovou uzavíratelnou nádobu byla našroubována podobná shora otevřená nádoba s filtrem (0,2 μm póry) a s výpustí pro vakuové odsátí, do které byl námi připravený roztok přelit. Po zapnutí odsávání a vytvoření podtlaku, byl roztok velmi rychle přefiltrován a tím sterilizován. Takto připravený roztok ("Air medium") byl skladován v lednici.

Média s luciferinem pro vzorky SCN a placent byly připraveny do plastových uzavíratelných 50ml zkumavek a promíchány krátkým intenzivním třepáním v ruce. Pro placentární vzorky bylo připravováno médium s malým rozdílem ve složení. K zajištění sterilizace roztoků byla využita opět filtrace.

Na novou 50ml zkumavku byl přiložen kruhový filtr (0,22 μm póry) se šroubovitém výstupem pro stříkačku. Stříkačka (bez vnitřního pístu) byla našroubována na filtr a byl do ní převeden promíchaný roztok. Následně byl

roztok stlačen (zasunutím pístu) do zkumavky pod filtrem. Médium bylo uchováváno taktéž při 5 °C.

3.4.3 Příprava Petriho misek pro měření explantátů

Petriho misky (průměr 35 mm) s "inzerty" a s médiem obsahující luciferin, byly připravovány pro explantáty souběžně s řezáním tkáně.

Zkumavky s médiem byly předeřhřívány asi 20 minut před aplikací ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Na vydezinfikované ploše bylo do jednotlivých misek odměřeno po 1 ml předem vyhřátého média s luciferinem. Krouživým pohybem byl roztok rozprostřen po miskách a následně byly doprostřed pinzetou pokládány "inzerty" (pórovité destičky o průměru 30 mm s velikostí pórů 0,4 μm). Petriho misky byly přikryty příslušnými víčky a uchovány v inkubátoru (37 °C) do chvíle, než byly připraveny a nanášeny explantáty.

3.4.4 Měření pomocí přístroje LumiCycle

Přístroj LumiCycle umožňuje vysoce výkonnou luminometrii, tedy velmi citlivé zaznamenání emitovaných fotonů z tkáně, která je díky genu luciferasy samozářívá. Námí použitý typ přístroje měří až 32 vzorků najednou a využívá čtyři fotonásobiče, což jsou vakuové trubice detekující záření. Pomocí fotoefektu jsou při dopadu fotonů na fotokatodu vyráženy elektrony, které jsou dále urychlovány mezi řadou dynod (elektrickým napětím), čímž je postupně vyrážen větší počet elektronů. Na konci trubice dopadá zesílený proud elektronů na anodu a je tak detekován signál. LumiCycle je po celou dobu chodu uchováván v inkubátoru při 37 °C.

Před vložením Petriho misek s explantáty do LumiCycle, byla na misky nalepena tenká sterilní kruhová sklíčka. Podél celého okraje sklíčka byla stříkačkou nanášena vazelína, sklo bylo nalepeno na Petriho misku a vzorek byl popsán (přiřazené číslo a zkratka tkáně). Takto připravené vzorky byly vloženy do přístroje.

3.4.5 Příprava roztoků inhibitorů

Do 1ml plastových mikrozkuvek byly připraveny roztoky inhibitorů a jejich příslušných srovnávacích roztoků. Pro inhibitor chlorid lithný byl připraven

kontrolní roztok chloridu sodného a pro roztok inhibitoru CHIR (derivát aminopyrimidinu) bylo kontrolou samotné rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO).

Pro přípravu 10M roztoku chloridu lithného bylo naváženo 0,2140 g LiCl, čemuž odpovídá objem roztoku 0,5048 ml. Do mikrozkušavky byla kvantitativně převedena navážka, odměřen objem 505 μ l ultra čisté vody (bez ribonukleasy) a třepáním byla navážka rozpuštěna.

Pro kontrolní 10M roztok chloridu sodného byla připravena navážka 0,5820 g této soli a byl určen objem roztoku. Navážka byla kvantitativně převedena do 1ml mikrozkušavky a rozpuštěna v 996 μ l ultra čisté vody (bez ribonukleasy).

Inhibitor CHIR byl již připravený jako roztok (rozpuštěno v DMSO) s koncentrací 20 mM. Tento roztok byl uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před použitím byl vždy 10 minut rozehríván ve vodní lázni.

Dále byl připraven 142,2 mM (40 mg/ml) roztok nescifického inhibitoru translace cykloheximidu (CHX). Do mikrozkušavky bylo aplikováno 120 μ l DMSO a 80 μ l zásobního roztoku CHX o koncentraci 100 mg/ml. Tento roztok byl taktéž skladován v mrazničce.

3.4.6 Aplikace inhibitorů a měření degradace proteinu

Po asi 30 hodinách měření v přístroji LumiCycle, ve chvíli, kdy byla hladina měřeného proteinu nejvyšší (největší amplituda v zobrazovaných sinusoidních křivkách) byly aplikovány inhibitory. Používány byly pouze ty vzorky, které měly měřitelně vysokou luminiscenci sinusoidního tvaru. Pokud byla naměřená hodnota svítivosti velmi malá či vykazovala plochý tvar měřené křivky, vzorek byl vyjmut a zlikvidován z důvodu nízké viability vzorku.

Měření bylo pozastaveno a vybrané vzorky vyjmuty z LumiCycle. V laminárním boxu byly připraveny roztoky inhibitorů, nástroje a termoblok, vyhřátý na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z misek byla opatrně odlepena popsaná sklíčka. Inzert s explantátem byl pinzetou vyjmut a položen na sterilní Petriho misku, ležící na termobloku. Do Petriho misek s médiem byl odměřen vždy 1 μ l připraveného roztoku CHX (pro výslednou koncentraci 142,2 μ M (0,04 mg/ml)) a zároveň 1 μ l vybraného inhibitoru či kontrolního roztoku. K části vzorků byl tedy přidán 1 μ l

10M chloridu lithného (pro konečnou koncentraci 10 mM), k další části 1 μ l 10M chloridu sodného (výsledná koncentrace taktéž 10 mM), dále 1 μ l 20mM roztoku CHIR (o výsledné koncentraci 20 μ M) či 1 μ l DMSO. Po aplikaci inhibitoru bylo miskou mírně zatočeno pro promíchání média, byl vrácen příslušný inzert s explantátem a miska opět zavřena daným sklíčkem.

Po nanesení inhibitorů do všech misek byly vzorky vráceny k měření v LumiCycle. Okamžitě byl znatelný začínající pokles signálu, tedy námi cílená klesající křivka.

3.4.7 Odmývání inhibitorů

Následující den, po asi 15 hodinách, byly inhibitory odstraněny promytím inzertů s explantáty a následnou změnou média. Předem bylo ve vodní lázni (37 °C) předehřáto luciferinové medium a DPBS pufr. Do šestijamkové plastové kultivační destičky bylo aplikováno po 1 ml DPBS pufru do každé jamky (kruhové jamky o průměru 35 mm).

Vzorky byly vyjmuty z přístroje, následně byla odejmuta sklíčka s vazelínou a inzerty s explantáty byly po třech dány do šestijamkových destiček. Ve vyhřátém pufru byly ponechány po dobu 5 minut, a to dvakrát za sebou. Po uplynutí prvních pěti minut byly přeneseny do zbývajících třech jamek (s čistým vyhřátým pufrům) a opět ponechány odmytí 5 minut. Mezitím bylo odměřeno do nových Petriho misek po 1 ml vyhřátého média, kam byly následně přeneseny promyté inzerty s tkáněmi.

Takto promyté vzorky s obnovenou translací byly buď dále měřeny (pro důkaz odmytí inhibitorů), nebo ponechány v inkubátoru při 37 °C a využity později k jiným účelům.

3.4.8 Statistická analýza

Luminiscenční křivky zaznamenané přístrojem LumiCycle byly zpracovány v programech LumiCycle Analysis a Prism (verze 7, GraphPad). Pro srovnání vlivu inhibice GSK3 β na rychlost degradace PER2, byl použit úsek luminiscenčního signálu začínající maximální hladinou PER2 a trvající přesně 12h od podání cykloheximidu a zastavení translace. Během této doby došlo k exponenciálnímu poklesu PER2. Pro kvantifikaci rychlosti poklesu byla využita

nelineární regrese implementovaná v programu Prism 7 - nejprve byla data v každé skupině normalizována, poté do nich byla metodou nejmenších čtverců vložena jednofázová křivka exponenciálního rozpadu (rovnice: $y = (y_0 - \lambda)e^{-Kx} + \lambda$, kde K je degradační konstanta, y_0 počáteční hladina PER2 a x je čas). Vypočítána byla průměrná degradační konstanta K a pomocí F testu bylo srovnáno K po aplikaci inhibitoru GSK3 β (CHIR nebo LiCl) a po aplikaci negativní kontroly (DMSO nebo NaCl).

4 Výsledky

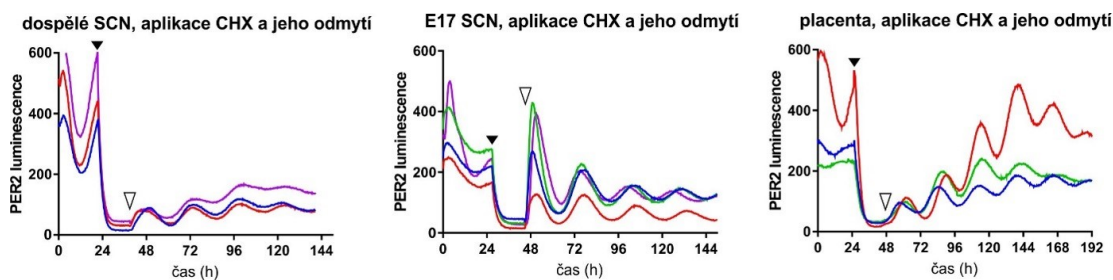
4.1 Měření degradačních křivek proteinu PER2

Využitím transgenních „knockin“ myší, které mají gen *Per2* sfúzovaný s genem *luciferasy*, bylo umožněno sledování degradace proteinu PER2 v reálném čase. Buňkami tvořená luciferasa katalyzuje přeměnu luciferinu přítomného v použitém médiu za vzniku světla (viz schématická rovnice na obr. č. 8 str. 24), které bylo měřeno fotonásobiči v přístroji LumiCycle. Množství světla je pak přímo úměrné hladině PER2 proteinu, regulované cirkadiánními hodinami v analyzované tkáni.

Koncentrace luciferinu, v námi připravovaném médiu pro měření množství proteinu, byla 99,6 μM . Využívány byly SCN dospělých jedinců, fetální SCN a placenty s částí přeměněné mateřské dělohy. Řezy pro dospělé SCN byly 250 μm silné a 500 μm silné v případě fetálních SCN a placent.

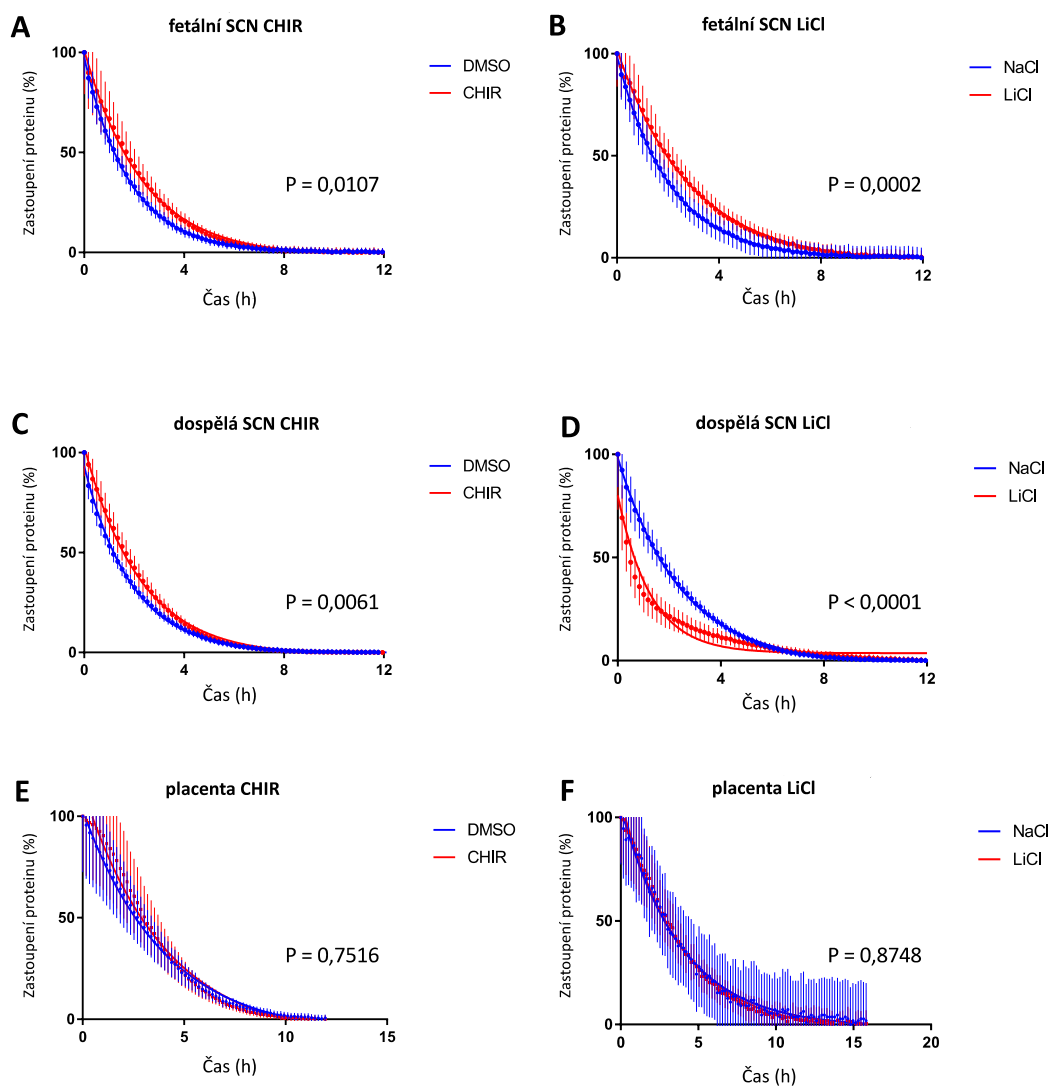
Přípravené tkáňové explantáty byly na mikroporézních inzertech dány do Petriho misek s 1 ml média. Pro zjištění momentální fáze hladiny proteinu PER2, byly vzorky měřeny v přístroji LumiCycle po dobu dvaceti až třiceti hodin. Ve chvíli, kdy byla vysledována maximální hladina proteinu, byly ke vzorkům přidány inhibitory pro následné sledování degradačních křivek. Ke všem explantátům byl přidáván nespecifický inhibitor translace cykloheximid, a dále pak byly k jednotlivým skupinám vzorků přidávány inhibitory ovlivňující GSK3 β či jejich srovnávací roztoky negativních kontrol (roztok chloridu lithného, roztok CHIR, chlorid sodný, DMSO). Konečné koncentrace inhibitorů a kontrol v měřeném mililitru média byly 10mM pro chlorid lithný a chlorid sodný, 20 μM pro CHIR a 40 $\mu\text{g/ml}$ pro cykloheximid. Po inhibici translace došlo během 8-10h k exponenciálnímu poklesu hladiny PER2.

Po ustálení minimální hodnoty hladiny proteinu, byly vybrané vzorky promyty puftrem a dány do nového média, čímž bylo zaručeno odstranění inhibitorů. Na obr. č. 10 str. 36 je ukázka účinku aplikace a následného odmytí samotného cykloheximidu na hladinu PER2 v čase.



Obr.10: Aplikace a následné odmytí cykloheximidu má vliv na hladinu *PER2* měřenou v čase. Černá šipka – aplikace inhibitoru translace cykloheximidu. Bílá šipka – odmytí cykloheximidu.

Po naměření dostatečného počtu vzorků byly křivky zpracovány v programech LumiCycle Analysis a Prism tak, aby byla určena rychlost degradace *PER2*. Výsledné grafy viz obr. č. 11 str. 36.



Obr.11: Grafy výsledných degradačních křivek v reálném čase. Normalizované křivky degradace proteinu *PER2*, sledované u fetálních SCN, dospělých SCN a

placent. Intenzita měřené luminiscence je přímo úměrná množství proteinu. Časová osa (v hodinách) ukazuje reálný čas, po který probíhala degradace proteinu PER2. V čase nula byl nanesen inhibitor translace s inhibitorem GSK3 β či kontrolou (počátek degradace) a bylo započato měření. Kontrolní reakce jsou vyznačeny modrými křivkami. Červené křivky označují dynamiku degradace, kdy byly do média přidány inhibitory GSK3 β . Ve všech grafech jsou znázorněny chybové úsečky.

A: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 u E17 fetálních SCN. Červená křivka znázorňuje dynamiku degradace za přítomnosti inhibitoru CHIR, modrá křivka je křivkou kontrolní. V kontrolní reakci je použito DMSO místo inhibitoru CHIR.

B: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 u E17 fetálních SCN. Červená křivka znázorňuje reakci při použití inhibitoru chloridu lithného, modrá křivka kontrolní reakci s chloridem sodným.

C: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 v SCN dospělých jedinců. Červená křivka značí degradaci za použití inhibitoru CHIR, modrá křivka je kontrolní reakci s použitím DMSO.

D: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 v SCN dospělých jedinců. Červená křivka zobrazuje degradaci při použití inhibitoru chloridu lithného, modrá pak kontrolní reakci s chloridem sodným.

E: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 v explantátu placenty. Červená křivka znázorňuje reakci za použití inhibitoru CHIR, modrá křivka zobrazuje kontrolní reakci s použitím DMSO místo inhibitoru.

F: Normalizované degradační křivky proteinu PER2 v explantátu placenty. Červená křivka značí použití chloridu lithného a modrá křivka kontrolní reakci s použitím chloridu sodného.

Všechny křivky mají vyznačené i chybové úsečky, které označují velikost střední chyby průměru (SEM) - F test $P < 0,05$.

Statistickým srovnáním degradačních konstant byly získány tyto výsledné hodnoty:

pro fetální SCN: $K_{\text{DMSO}} = 0,553 \pm 0,019 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{CHIR}} = 0,430 \pm 0,028 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,0107$, $t_{1/2}(\text{DMSO}) = 1,252 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{CHIR}) = 1,610 \text{ h}$, $K_{\text{NaCl}} = 0,487 \pm 0,028 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{LiCl}} = 0,354 \pm 0,021 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,0002$, $t_{1/2}(\text{NaCl}) = 1,422 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{LiCl}) = 1,958 \text{ h}$

pro dospělé SCN: $K_{\text{DMSO}} = 0,526 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{CHIR}} = 0,449 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,0061$, $t_{1/2}(\text{DMSO}) = 1,317 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{CHIR}) = 1,541 \text{ h}$, $K_{\text{NaCl}} = 0,412 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{LiCl}} = 0,779 \pm 0,061 \text{ h}^{-1}$, $P < 0,0001$, $t_{1/2}(\text{NaCl}) = 1,682 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{LiCl}) = 0,889 \text{ h}$

pro placenty: $K_{\text{DMSO}} = 0,258 \pm 0,031 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{CHIR}} = 0,244 \pm 0,032 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,7516$, $t_{1/2}(\text{DMSO}) = 2,686 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{CHIR}) = 2,835 \text{ h}$, $K_{\text{NaCl}} = 0,262 \pm 0,043 \text{ h}^{-1}$, $K_{\text{LiCl}} = 0,255 \pm 0,022 \text{ h}^{-1}$, $P = 0,8748$, $t_{1/2}(\text{NaCl}) = 2,646 \text{ h}$, $t_{1/2}(\text{LiCl}) = 2,715 \text{ h}$.

Z výsledných grafů a hodnot K je zřejmé, že u fetálních SCN (v obr. č. 11 str. 36 grafy A,B) námi použité specifické inhibitory CHIR a chlorid lithný fungovaly stejně, a to zpomalením degradace proteinu PER2. U dospělých jedinců

se však jejich funkce liší. Zatímco CHIR opět degradaci zpomaluje, chlorid lithný reakci velmi povzbuzuje a degradace má rychlý spád.

U placent jsou bohužel výsledky nesignifikantní, možná z důvodu velké variability mezi jednotlivými explantáty, nelze tedy s jistotou určit, zda inhibice GSK3 β má nějaký vliv na stabilitu PER2 v této tkáni.

Výsledky experimentů tedy prokázaly, že inhibitor CHIR zpomaluje degradaci proteinu PER2 ve fetálních i dospělých SCN, zatímco u LiCl byl efekt závislý na stupni vývoje SCN a u dospělých SCN vyvolával opačnou reakci než u fetálních SCN.

5 Diskuze

V úvodu této práce je stručně naznačeno, jak komplexní je téma týkající se cirkadiánních hodin a řízení času v těle organismu. Zcela nepochybně by mohly výzkumy tohoto oboru přinést objevy zatím nezjištěných spojitostí a tím pomoci v léčbě stavů, spojených s poruchou cirkadiánních rytmů. Z tohoto důvodu je potřeba hledat a nalézat mechanismy a látky, které je ovlivňují.

Například změnou dynamiky degradace cirkadiánně tvořených proteinů by bylo možné ovlivnit chod hlavního oscilátoru - SCN - a tím pozměnit vnitřně vnímaný čas organismu. Cílem této bakalářské práce bylo sledovat a porovnat vlivy dvou inhibitorů glykogensyntasykinasy 3 izoformy β (GSK3 β). Prvním je selektivní inhibitor CHIR-99021 [28] a druhým nespecifický inhibitor LiCl [74]. Kinasa GSK3 β je zodpovědná za fosforylaci proteinu PER2 vedoucí k degradaci tohoto proteinu [28]. Je tedy předpokládáno, že pokud bude tato kinasa inhibována, nebude s běžnou účinností fosforylovat protein PER2 a tak bude jeho hladina snižována pomaleji (dynamika degradace bude zpomalována).

V případě selektivního inhibitoru CHIR-99021 byl tento předpoklad potvrzen ve všech použitých explantátech a prokázala se tím funkčnost tohoto inhibitoru. Jeho přítomnost měla zpomalující vliv na pokles hladiny proteinu PER2 (viz obr. č. 11 str. 36).

Vliv LiCl na degradaci proteinu PER2 byl odlišný od efektu CHIR-99021 a závisel na tom, zda byl testován u dospělých či fetálních SCN. U fetálních SCN LiCl degradaci zpomaluje stejně jako CHIR, zatímco u dospělých SCN má LiCl opačný efekt, a to rapidní zrychlení degradace PER2. Z grafu (D na obr. č. 11 str. 36) je zřejmý rychlý a strmý pokles hladiny proteinu. Dříve bylo prokázáno, že CHIR a LiCl mají opačný efekt na délku periody hodin, kdy CHIR periodu zkracuje a LiCl naopak prodlužuje [75], avšak vliv na stabilitu PER2 proteinu nebyl zkoumán. Protože je LiCl nespecifický inhibitor [76], je pravděpodobné, že ovlivňuje řadu jiných přítomných enzymů a tím prokazuje odlišné působení na stabilitu PER2 proteinu.

U vzorků placent se bohužel nepodařilo prokázat vlivy žádného z testovaných inhibitorů. V grafech je zřejmá velká variabilita v odpovědi. Důvodem může být buď to, že tkáň placenty je více náchylná k náhlým změnám a také to, že používané médium není zcela vhodné pro placentární tkáň. Změna

složení (či poměrů) pufrů a jednotlivých vyživujících složek by možná napomohla k delší životnosti explantátů. Velkou roli ale zřejmě hraje fakt, že placenta nemá stejně robustní cirkadiánní hodiny, jako SCN. Většina vzorků placent vykazovala proto velmi slabé oscilace (ploché s nízkými amplitudami) a tudíž i degradační křivky vykazovaly velkou variabilitu. Navíc, značná část placentárních explantátů ztratila během experimentu životaschopnost.

Ve chvíli, kdy byl pokles hladiny proteinu minimální (po 12-15 hodinách), byly vzorky vyjmuty z měření a inhibitory byly odmyty. Viabilní explantáty by po výměně média by měly být explantáty schopné opět vykazovat rytmicitu. To však bylo zaznamenáno jen v několika případech. Většina vzorků již nebyla oživena zřejmě v důsledku neopatrného zacházení (teplotní šoky či kontaminace bakteriemi). K experimentům s inhibitory bylo použito asi 85 vzorků z celkových 125, ale křivky vhodné k vyhodnocení byly získány z pouhých 23 vzorků.

Významným výsledkem bakalářské práce bylo zjištění, že LiCl ovlivňuje stabilitu PER2 odlišným mechanismem než specifický inhibitor GSK3 β , a tento účinek je navíc závislý na stupni vývoje hodin v SCN. Bakalářská práce tak poskytla důležité pilotní výsledky pro další zkoumání mechanismů, jakými post-translační modifikace, a konkrétně aktivita GSK3 β , ovlivňují hodiny v SCN a dalších tkáních.

Na tuto pilotní studii naváže další výzkum s cílem potvrdit pozorované efekty a zjistit mechanismy, které je zprostředkovávají. Zvláštní pozornost bude věnována možnosti zkoumání vlivu inhibitorů i u hodin v placentě.

6 Závěr

- Metodou měření bioluminiscence byla zachycena dynamika degradace proteinu PER2 v reálném čase v explantátech cirkadiálních hodin v dospělých a fetálních SCN a placenty.
- Porovnávány byly účinky inhibitorů ovlivňujících GSK3 β , a to LiCl a CHIR-99021.
- Na základě výsledků lze usoudit, že CHIR degradaci PER2 proteinu mírně zpomaluje, zatímco u chloridu lithného záleží, zda jsou SCN již plně vyvinutá (dospělý jedinec) či nikoli (fetus). U explantátů placenty nebyl vliv inhibitorů prokazatelný.

7 Reference

1. Schibler, U., The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin. Neurosci.* **9**, 257–72 (2007).
2. Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 544–56 (2005).
3. Klarsfeld, A. *Aux aurores de la chronobiologie.*, Paříž, 1729.
4. McClung, C.R., Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* **18**, 792–803 (2006).
5. Mohawk, J.A., Green, C.B., Takahashi, J.S., Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 445–62 (2012).
6. Balsalobre, A., Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **309**, 193–99 (2002).
7. Albrecht, U., Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron* **74**, 246–60 (2012).
8. Reppert, S.M., Weaver, D.R., Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–41 (2002).
9. Ramkisoensing, A., Meijer, J.H., Synchronization of Biological Clock Neurons by Light and Peripheral Feedback Systems Promotes Circadian Rhythms and Health. *Front. Neurol.* **6**, 128 (2015).
10. Brown, A.J., Pendergast, J.S., Yamazaki, S., Peripheral Circadian Oscillators. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 327–35 (2019).
11. Hastings, M.H., Circadian clocks. *Current biology*, **7**, 670–672 (1997).
12. Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M., Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697–706 (1995).
13. Kriegsfeld, L.J., Silver, R., The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Horm. Behav.* **49**, 557–74 (2006).
14. Moore, R.Y., Speh, J.C., Leak, R.K., Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* **309**, 89–98 (2002).
15. Leak, R.K., Card, J.P., Moore, R.Y. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res.* **819**, 23–32 (1999).
16. Buijs, R.M., Kalsbeek, A., Romijn, H.J., Pennartz, C.M.A., Mirmiran, M., *Hypothalamic integration of circadian rhythms*, Amsterdam, Elsevier, 103–19 (1996).
17. Moore, R.Y., Speh, J.C., GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* **150**, 112–16 (1993).
18. Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science* **247**, 975–78 (1990).
19. Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5339–46 (2004).
20. Sládek, M., Rybová, M., Jindráková, Z., Zemanová, Z., Polidarová, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pácha, J., Sumová, A., Insight Into the Circadian Clock Within Rat Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology* **133**, 1240–49 (2007).
21. Reppert, S.M., Weaver, D.R., Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–41 (2002).
22. Nováková, M., Polidarová, L., Sládek, M., Sumová, A., Restricted feeding

regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience* **197**, 65–71 (2011).

23. Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., Der, G.T.J. van, Horst, Hastings, M.H., Reppert, S.M., Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science* **288**, 1013–19 (2000).

24. Ko, C.H., Takahashi, J.S., Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **15**, R271–77 (2006).

25. Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., Weitz, C.J., Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science* **280**, 1564–69 (1998).

26. Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* **98**, 193–205 (1999).

27. Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U., The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* **110**, 251–60 (2002).

28. Besing, R.C., Paul, J.R., Hablitz, L.M., Rogers, C.O., Johnson, R.L., Young, M.E., Gamble, K.L., Circadian Rhythmicity of Active GSK3 Isoforms Modulates Molecular Clock Gene Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus. *J. Biol. Rhythms* **30**, 155–60 (2015).

29. Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F.R.A., Loudon, A.S.I., Reppert, S.M. Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell* **107**, 855–67 (2001).

30. Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., Virshup, D.M., The Circadian Regulatory Proteins BMAL1 and Cryptochromes Are Substrates of Casein Kinase I ϵ . *J. Biol. Chem.* **277**, 17248–54 (2002).

31. Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E., Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1693–1703 (2002).

32. Badura, L., Swanson, T., Adamowicz, W., Adams, J., Cianfrogna, J., Fisher, K., Holland, J., Kleiman, R., Nelson, F., Reynolds, L., Germain, K.S., Schaeffer, E., Tate, B., Sprouse, J., An Inhibitor of Casein Kinase I ϵ Induces Phase Delays in Circadian Rhythms under Free-Running and Entrained Conditions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**, 730–38 (2007).

33. Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., Takahashi, J.S., Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation tau. *Science* **288**, 483–92 (2000).

34. Sanada, K., Okano, T., Fukada, Y., Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates and Negatively Regulates Basic Helix-Loop-Helix-PAS Transcription Factor BMAL1 *. *J. Biol. Chem.* **277**, 267–71 (2002).

35. Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P., Regulation of BMAL1 Protein Stability and Circadian Function by GSK3 β -Mediated Phosphorylation. *PLOS ONE* **5**, e8561 (2010).

36. Shim, H.S., H, K., J, L., Gh, S., S, C., Th, O., Sh, K., Ds, S., Kh, L., K, K., Rapid activation of CLOCK by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* **8**, 366–71 (2007).

37. Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., Thompson, C.B., Evans, R.M., AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science* **326**, 437–40 (2009).
38. Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., Fukada, Y., Ser-557-phosphorylated mCRY2 Is Degraded upon Synergistic Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β *. *J. Biol. Chem.* **280**, 31714–21 (2005).
39. Gossan, N.C., Zhang, F., Guo, B., Jin, D., Yoshitane, H., Yao, A., Glossop, N., Zhang, Y.Q., Fukada, Y., Meng, Q.-J., The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5765–75 (2014).
40. Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi, P., CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* **450**, 1086–90 (2007).
41. Kim, E.Y., Jeong, E.H., Park, S., Jeong, H.-J., Edery, I., Cho, J.W., A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed. *Genes Dev.* **26**, 490–502 (2012).
42. Lee, J., Lee, Y., Lee, M.J., Park, E., Kang, S.H., Chung, C.H., Lee, K.H., Kim, K., Dual Modification of BMAL1 by SUMO2/3 and Ubiquitin Promotes Circadian Activation of the CLOCK/BMAL1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6056–65 (2008).
43. Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., Vries, G.J.D., Reppert, S.M. A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Cell* **96**, 57–68 (1999).
44. Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., Bradley, A., The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**, 169–73 (1999).
45. Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N., Okamura, H., A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**, 167–76 (1998).
46. Guilding, C., Piggins, H.D., Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* **25**, 3195–3216 (2007).
47. Kornhauser, J.M., Mayo, K.E., Takahashi, J.S., Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav. Genet.* **26**, 221–40 (1996).
48. Bollinger, T., Schibler, U., Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. *Swiss Med. Wkly.* **144** (2014).
49. Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M., Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science* **295**, 1070–73 (2002).
50. Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., Rollag, M.D., A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J. Neurosci.* **20**, 600–605.
51. Ebling, F.J.P. (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.* **50**, 109–32 (2000).
52. Pickard, G.E., Ralph, M.R., Menaker, M., The Intergeniculate Leaflet Partially Mediates Effects of Light on Circadian Rhythms. *J. Biol. Rhythms* **2**, 35–56 (1987).
53. Moore, R.Y., Card, J.P., Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* **344**, 403–30 (1994).
54. Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P.J., Mikkelsen, J.D., Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* **25**, 293–310 (2003).

55. Blume, C., Garbazza, C., Spitschan, M., Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. *Somnologie* **23**, 147–56 (2019).
56. Ohta, H., Yamazaki, S., McMahon, D.G., Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* **8**, 267–69 (2005).
57. Hastings, M.H., Duffield, G.E., Smith, E.J.D., Maywood, E.S., Ebling, F.J.P. Entrainment of the Circadian System of Mammals by Nonphotic Cues. *Chronobiol. Int.* **15**, 425–45 (1998).
58. Maywood, E.S., Mrosovsky, N., Field, M.D., Hastings, M.H., Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 15211–16 (1999).
59. Armstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Redman, J.R., Short, R.V. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.* **21**, 375–94 (1986).
60. Håkansson, M.-L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C., Meister, B., Leptin Receptor Immunoreactivity in Chemically Defined Target Neurons of the Hypothalamus. *J. Neurosci.* **18**, 559–72 (1998).
61. Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B., Elmquist, J.K., Expression of Ghrelin Receptor mRNA in the Rat and the Mouse Brain. *J. Comp. Neurol.* **494**, 528–48 (2006).
62. Buijs, R.M., van Eden, C.G., Goncharuk, V.D., Kalsbeek, A., The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J. Endocrinol.* **177**, 17–26 (2003).
63. Bartness, T.J., Song, C.K., Demas, G.E., SCN Efferents to Peripheral Tissues: Implications for Biological Rhythms. *J. Biol. Rhythms* **16**, 196–204 (2001).
64. Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., Okamura, H., Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* **2**, 297–307 (2005).
65. Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–61 (2000).
66. Brown, S.A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U., Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Curr. Biol.* **12**, 1574–83 (2002).
67. Kabrita, C.S., Davis, F.C., Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus. *Brain Res.* **1195**, 20–27 (2008).
68. Ansari, N., Agathagelidis, M., Lee, C., Korf, H.-W., von Gall, C., Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 477–89 (2009).
69. Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Reppert, S.M., D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9201–4 (1992).
70. Čečmanová, V., Houdek, P., Šuchmanová, K., Sládek, M., Sumová, A., Development and Entrainment of the Fetal Clock in the Suprachiasmatic Nuclei: The Role of Glucocorticoids. *J. Biol. Rhythms* **34**, 307–322 (2019).
71. Matějů, K., Bendová, Z., El-Hennamy, R., Sládek, M., Sosniyenko, S., Sumová, A., Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 490–501 (2009).

72. Duncan, M.J., Banister, M.J., Reppert, S.M., Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Res.* **369**, 326–30 (1986).
73. Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5339–46 (2004).
74. González, A., Manosalva, I., Liu, T., Kageyama, R., Control of Hes7 Expression by Tbx6, the Wnt Pathway and the Chemical Gsk3 Inhibitor LiCl in the Mouse Segmentation Clock. *PLoS ONE* **8**, e53323 (2013).
75. Hirota, T., Lewis, W.G., Liu, A.C., Lee, J.W., Schultz, P.G., Kay, S.A., A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20746–51 (2008).
76. Kerr, F., Bjedov, I., Sofola-Adesakin, O., Molecular Mechanisms of Lithium Action: Switching the Light on Multiple Targets for Dementia Using Animal Models. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 297 (2018).