



Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Vývoj světelné synchronizace cirkadiálního
systému potkana v časně postnatální ontogenezi**

Kristýna Matějů

Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: neurovědy

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení neurohumorálních regulací,
Fyziologický ústav Akademie věd ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Kristýna Matějů

Školitel: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Školitel konsultant (byl – li):

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 2. lékařské
fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

SOUHRN.....	4
ABSTRACT.....	5
ÚVOD.....	6
HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	11
MATERIÁL A METODIKA	12
VÝSLEDKY	14
DISKUSE	23
ZÁVĚRY	25
POUŽITÁ LITERATURA	27
SEZNAM PUBLIKACÍ.....	31

Souhrn

U většiny organismů bylo pozorováno množství rytmických dějů, které běží i v prostředí bez periodických podnětů s periodou ± 24 hod (tzv. cirkadiánní rytmy). U savců jsou centrem, které řídí vznik cirkadiánních rytmů suprachiasmatická jádra hypothalamu (SCN). Světlo synchronizuje cirkadiánní rytmy s 24-hodinovým dnem. Informace o světle se dostává do SCN ze sítnice a u dospělých potkanů působí indukci exprese hodinových genů *Period1* a *Period2*, které představují fotosensitivní část molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin v SCN. Tato citlivost na světlo je cirkadiánními hodinami omezena (vrátkována) na dobu tzv. subjektivní noci. Rytmiická exprese těchto i dalších hodinových genů v SCN je navíc u dospělých potkanů modulována délkou světlé části dne (fotoperiodou). Cílem práce bylo zmapovat jak se během prenatalní a postnatální ontogeneze potkana vyvíjejí mechanismy synchronizace cirkadiánních rytmů světlem. Výsledky ukazují, že během prenatalního a časného postnatálního období dostávají cirkadiánní hodiny mládeže informaci o světle zprostředkovaně přes cirkadiánní systém matky. Cirkadiánní hodiny v SCN jsou citlivé na světlo již 1. postnatální den. Mechanismus vrátkující citlivost ke světlu je přítomen 3. postnatální den a do 10. postnatálního dne se dále vyvíjí. Výsledky rovněž naznačují, že sítnice potkana reaguje na světelné podněty již 1. postnatální den, tedy ještě před dosažením morfologické a funkční zralosti. Fotoperioda začíná ovlivňovat molekulární mechanismus cirkadiánních hodin až okolo 10. postnatálního dne a mechanismus umožňující synchronizaci cirkadiánních hodin fotoperiodou ještě dále dozrává.

Abstract

In most organisms, behavioral and physiological events oscillate with period ± 24 h, *i.e.* exhibit circadian rhythms. In mammals, circadian rhythms are generated by circadian clock within the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN). Light entrains circadian rhythms to the 24 h period of solar day. Information about light is conveyed from the retina to the SCN and induces expression of clock genes *Period1* (*Per1*) and *Period2* (*Per2*) that represent photosensitive parts of molecular circadian clockwork within SCN. Light sensitivity of *Per1* and *Per2* within SCN is temporally restricted to the subjective night phase. In addition, daily profiles of clock gene expression within SCN are modulated by daylength, *i. e.* the photoperiod. The aim of our study was to elucidate how the mechanism of photic entrainment of the rat circadian clock develops during prenatal and early postnatal ontogenesis. Our results demonstrate that maternal circadian system provides information about external light to the fetal and early postnatal circadian clock. Circadian clock within the SCN of rat pups is light sensitive already at the first postnatal day. Mechanism gating the light sensitivity is present at postnatal day 3 and gradually matures until postnatal day 10. The data suggest that the developing retina is responsive to light at postnatal day 1, far before its morphological and functional maturation. Photoperiod begins to modulate daily profiles of clock genes within the SCN around postnatal day 10 and the mechanism of photoperiodic entrainment matures gradually.

Úvod

U většiny známých organismů byla prokázána existence biologických hodin, které řídí rytmy s periodou přibližně 24 hodin, tzv. cirkadiánní rytmy (např. rytmus v pohybové aktivitě, spánku a bdění, příjmu potravy). Cirkadiánní rytmy v prostředí bez periodicky se opakujících podnětů běží s vlastní vnitřní periodou, jejíž délka se zpravidla nerovná zcela přesně 24 hodinám. Cirkadiánní hodiny jsou pravidelně synchronizovány s 24-hodinovým dnem. Nejdůležitějším synchronizátorem cirkadiánních hodin je světlo, a to jak jednotlivé světelné záblesky (tzv. diskretní synchronizace), tak i délka světlé části dne (tzv. kontinuální synchronizace). Světlo zvečera působí zpoždění rytmů s periodou kratší než 24 hodin, zatímco světlo zrána předběhnutí rytmů s periodou delší než 24 hodin (Daan a Pittendrigh, 1976).

Centrálními hodinami savců včetně člověka je párové jádro *nucleus suprachiasmaticus hypothalami* (SCN, suprachiasmatic nuclei). SCN je možno funkčně i morfologicky rozdělit na dvě části: část dorsomediální (dmSCN) a část ventrolaterální (vlSCN). DmSCN bývá považováno za místo vzniku endogenních cirkadiánních rytmů, zatímco vlSCN, které těsně přiléhá k *chiasma opticum*, hraje důležitou roli ve světelné synchronizaci (přehled viz Ibata et al., 1999; van Esseveldt et al., 2000). Informace o světle se do SCN dostává ze sítnice retinohypothalamickým traktem (RHT, *radix optica hypothalamica*).

Vlastní mechanismus vzniku endogenních oscilací je založen na systému vzájemně propojených zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček. Tyto smyčky jsou složeny z tzv. hodinových genů, tj. genů jejichž mutace či vyřazení (knock-out) způsobí narušení až ztrátu cirkadiánní rytmicity.

Proteiny kódované těmito geny vstupují do jádra a regulují transkripci vlastních genů. U savců byly jako hodinové označeny geny: *Clock*, *Bmal1*, *Period1 (Per1)*, *Period2 (Per2)* a *3*, *Cryptochrom1* a *2*, *Rev-erba*, *Rora* a *kasein-kinasa1ε/δ (CK1ε/δ)* (přehled viz Reppert a Weaver, 2001; Ko a Takahashi, 2006). Výsledkem činnosti vzájemně propojených pozitivních a negativních zpětnovazebných smyček jsou rytmické oscilace mRNA většiny hodinových genů a jejich proteinových produktů.

Výstup z cirkadiálního oscilátoru je zajišťován tzv. hodinami kontrolovanými geny (CCGs, clock controlled genes), resp. jejich proteinovými produkty. Jedná se o geny, které nejsou nutné pro vznik cirkadiálních oscilací, ale jejich exprese je řízena molekulárním mechanismem a vykazuje v SCN cirkadiální rytmus. Mezi CCGs patří např. argininvasopresin (AVP) a některé receptory a podjednotky iontových kanálů. Pomocí CCGs je tak činnost molekulárního mechanismu převáděna na rytmus ve výlevu hormonů a v elektrické aktivitě neuronů SCN (přehled viz Reppert a Weaver, 2001).

Cirkadiální hodiny v SCN jsou citlivé k synchronizaci světelnými podněty pouze v určitém období během 24-hod cyklu – v době tzv. subjektivní noci. Dříve než byly známy hodinové geny savců, využívaly studie zkoumající vliv světla na SCN jako ukazatel fáze cirkadiálních hodin časný raný gen *c-fos*. Exprese *c-fos* mRNA v SCN je zvýšená po osvětlení v první i druhé polovině subjektivní noci, tedy v době kdy světlo působí fázové zpoždění, resp. předběhnutí cirkadiálních rytmů, ale nikoliv během subjektivního dne. K indukci exprese *c-fos* mRNA a následnému zvýšení produkce proteinu c-FOS dochází výhradně ve vlSCN, tedy v místě,

kteřé je v přímém spojení se sítnicí přes RHT (Kornhauser et al., 1990, Rusak et al., 1990, 1992).

Po osvětlení v noci je v SCN uvolněn z nervových zakončení RHT glutamát, který se váže na NMDA receptory neuronů SCN a spouští tak systém signálních drah uvnitř buňky (přehledně viz Hirota a Fukada, 2004), což vede k aktivaci transkripce *Per1* a *Per2* a *c-fos*. Aplikace světelného pulsu během první a druhé poloviny subjektivní noci indukuje v SCN expresi *Per1*. Expze hodinového genu *Per2* je světlem indukována převážně v první polovině subjektivní noci (Miyake et al., 2000). Hodinové geny *Per1* a *Per2* jsou považovány za komponenty molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin nezbytné pro synchronizaci cirkadiánních rytmů světelnými podněty (Albrecht et al., 2001). Ke zvýšení hladiny *Per1* a *Per2* mRNA, resp. proteinů PER1 a PER2 po světelném pulsu dochází zejména ve vlSCN (Yan a Silver, 2004). Odtud je zřejmě informace předávána do dmSCN a ovlivňuje výstupy z oscilátoru. Expze hodinových genů *Per1* a *Per2* i genu *c-fos* je citlivá na světlo pouze v době, kdy je jejich spontánní expze v SCN nízká. Mechanismus regulace neboli „vrátkování“ citlivosti ke světlu je tak zakódován v samotném molekulárním základu cirkadiánních hodin.

Kromě okamžitého vlivu světelných pulsů na expresi hodinových genů *Per1* a *Per2*, jsou také denní profily v expresi hodinových genů *Per1*, *Cry1* a *Bmal1* v SCN modulovány délkou světlé části dne (fotoperiodou) (přehled viz Sumová et al., 2003).

Pro zajištění synchronizace cirkadiánních hodin světlem je u savců nezbytná světločivná funkce sítnice. Nedávno bylo zjištěno, že kromě tyčinek a čípků se v sítnici nacházejí ještě další fotoreceptivní buňky. Část gangliových

buněk sítnice (RGCs, retinal ganglion cells) produkuje opsinu podobný fotonopigment melanopsin a jejich axony tvoří podstatnou část RHT (Hattar et al., 2002; Berson et al., 2002). Předávají tak do SCN informaci o světle nezávisle na tyčinkách a čípcích a fungují jako tzv. „cirkadiální fotoreceptory“ (přehled viz Morin a Allen, 2006).

Některé další studie ukazují, že sítnice funguje také jako cirkadiální oscilátor (Tosini a Menaker, 1996, Sakamoto et al., 2000; přehled viz Tosini a Fukuhara, 2002). V sítnici potkana dochází k expresi základních součástí molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin - hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmall* a *Clock*, ale zdá se, že molekulární mechanismus cirkadiálních hodin v sítnici je jiný než v SCN (přehled viz Tosini a Fukuhara, 2002; Tosini et al., 2008). Po osvětlení byla pozorována indukce exprese hodinových genů *Per1* a *Per2* ale také *Bmall* a *Clock* (Namihira et al., 1999; 2001). Výsledky studií exprese hodinových genů v sítnici potkanů a myši nejsou dosud úplně konzistentní. Příčinou může být fakt, že sítnice je tvořena různými typy buněk, ve kterých může docházet k rytmické expresi jednoho či více hodinových genů, ale rytmy jsou navzájem fázově posunuty.

S ohledem na strukturu sítnice je také obtížné zjistit, ve kterém typu buněk se cirkadiální pacemaker nachází. Některé práce ho umisťují do fotoreceptorové vrstvy (Tosini et al., 2007), jiné naopak ukazují koordinovanou expresi hodinových genů ve vnitřních vrstvách sítnice (Ruan et al., 2006; Witkovsky et al., 2003). Cirkadiální oscilátor v sítnici by se mohl podílet i na regulaci citlivosti cirkadiálního systému k vnějším světelným podnětům.

V předkládané práci byl modelovým zvířetem laboratorní potkan a proto je souhrn poznatků o vývoji cirkadiálního systému omezen na tento živočišný druh. Březost trvá u potkanů 22-23 dní. SCN je tvořeno mezi 13. a 16. dnem embryonálního vývoje a vlSCN vzniká dříve než dmSCN (přehled viz Weinert, 2005). Jednotlivé části molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin se vyvíjejí postupně a převážně během časného postnatálního období (Sládek et al., 2004; Kováčiková et al., 2006).

U savců dostává *fetus* informace o vnějších světelných podmínkách již před narozením. Děje se tak zprostředkovaně přes cirkadiální systém matky. SCN matky se přímo nepodílí na vývoji cirkadiálních rytmů mláďat, ale slouží jako významný synchronizátor cirkadiálních rytmů celého vrhu (Shibata a Moore, 1988; Jud a Albrecht, 2006). Vliv matky v prenatální i časné postnatální ontogenezi napomáhá synchronizaci cirkadiálního systému mláďate s vnějšími podmínkami v době, kdy jeho cirkadiální systém není ještě plně vyvinut.

Reakce vyvíjejícího se cirkadiálního systému na světelné podněty je závislá i na vývoji drah, kterými je informace o světle přenášena ze sítnice do SCN. Cirkadiální fotorpigment melanopsin začíná být ve vnitřní vrstvě vyvíjející se sítnice potkana tvořen již od 18. dne embryonálního vývoje (Fahrenkrug et al., 2004). Gangliové buňky produkující melanopsin jsou citlivé na světlo již při narození a zároveň již v té době existují první funkční spojení mezi sítnicí a SCN (Tu et al., 2005, Sekaran et al., 2005). Tyčinky a čípky se začínají morfologicky diferencovat okolo 5. dne po narození a dozrávají až v třetím postnatálním týdnu (Weidman a Kuwabara, 1969; Sernagor et al., 2001). Fotoreceptivní gangliové buňky jsou tedy vyvinuty dříve než

klasické fotoreceptory a tzv. „cirkadiánní vidění“ je vyvinuto dříve než obrazové vidění. Oči se potkanům otevírají okolo 14. a 15. dne života. Mláďata však i přesto do určité míry vnímají světlo ještě před tímto důležitým vývojovým mezníkem (Duncan et al., 1986). Již 1. den po porodu byl pozorován vliv světelného pulsu na zvýšení exprese časného raného genu *c-fos* v SCN a to jak během subjektivní noci, tak během subjektivního dne (Leard et al., 1994). Produkce proteinu c-FOS v SCN přestává být indukovatelná světelnými podněty během subjektivního dne až 10. den po narození (Bendová et al., 2004). Je pravděpodobné, že vývoj diskrétní (světelné) a kontinuální (fotoperiodické) synchronizace souvisí s vývojem „vrátkového“ mechanismu, který vymezuje dobu citlivosti ke světlu.

Hypotézy a cíle práce

Cíle předkládané práce lze rozdělit do dvou tématických okruhů:

A) Vývoj cirkadiánních hodin a synchronizační vliv matky v prenatálním a časném postnatálním období

Cílem práce bylo zjistit kdy začíná molekulární mechanismus cirkadiánních hodin v SCN mláděte fungovat nezávisle na matce a do jaké míry jsou cirkadiánní hodiny mláděte ovlivňovány mateřskými signály během prenatálního a časného postnatálního období.

B) Vývoj citlivosti cirkadiánního systému ke světelným podnětům

Cílem práce bylo odhalit kdy a jak v průběhu časné postnatální ontogeneze začíná být exprese hodinových genů *Per1* a *Per2* a časného raného genu *c-fos* v SCN a v sítnici mláděte citlivá na světelné podněty. Speciálním cílem pak

bylo objasnit, kdy začínají cirkadiánní hodiny regulovat neboli „vrátkovat“ svou citlivost ke světelným podnětům. Dalším cílem práce bylo zjistit, kdy během časné postnatální ontogeneze začíná být denní profil exprese hodinových genů modulován délkou světlé části dne, tzv. fotoperiodou.

Materiál a metodika

K experimentům byla použita mláďata a dospělí potkani (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar. Všechny experimenty byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č.42084/2003-1020).

Schémata pokusů

1) studium vlivu mateřské synchronizace

Nejprve byl dospělým potkanům chovaným na světelném režimu LD12:12 (12 hod světla, 12 hod tmy) zpožděn o 6 hod. začátek tmavé fáze světelného režimu a na konci následujícího dne byli převedeni do konstantní tmy. Po celou dobu experimentu byla monitorována jejich pohybová aktivita (systém CAMS=Circadian Activity Monitoring System). V samostatném experimentu byl stejný posun světelného režimu aplikován březím samicím 20., resp. 18. den březosti (tj. 20. den embryonálního vývoje = v E20, resp. E18). Kontrolní březí samice byly ponechány při původním světelném režimu a obě skupiny pak byly převedeny do konstantní tmy. Denní profily v expresi *Per1*, *Per2*, *c-fos* a hodinami kontrolovaného genu *Avp* byly stanoveny v SCN 1-denních, 3-denních či 6-denních mláďat narozených experimentálním a kontrolním samicím.

2) okamžitý vliv světla na SCN a sítnici během časné postnatální ontogeneze

Samice potkana byly ještě před zabřeznutím chovány na světelném režimu LD12:12. Samice s mláďaty byly vypuštěny do konstantní tmy v době očekávaného rozsvícení 1., 3., 5. či 10. postnatální den. Experimentální skupiny mláďat byly vystaveny 30-min světelnému pulsu v CT7, tj. během subjektivního dne, nebo v CT15 či CT21, tj. v první, resp. druhé polovině subjektivní noci. Kontrolní skupiny mláďat byly ponechány v konstantní tmě. U obou skupin byly stanoveny hladiny mRNA *Per1*, *Per2* a *c-fos* v SCN či sítnici 30 min, 1 hod a 2 hod po začátku světelného pulsu (v případě sítnice i 4 hod po začátku světelného pulsu).

3) vliv délky dne (fotoperiody) na profily v expresi hodinových genů v SCN vyvíjejícího se potkana

K pokusům byla použita 3-denní, 10-denní a 20-denní mláďata chovaná na dlouhé letní (LD 16:8) nebo na krátké zimní fotoperiodě (LD 8:16). V době očekávaného rozsvícení v P3, P10 či P20 byla mláďata převedena do konstantní tmy a exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Bmal1* v SCN byla stanovena v 2-hodinových intervalech v průběhu 24hodinového cyklu.

Stanovení mRNA hodinových genů a genů *Avp* a *c-fos* v SCN a sítnici

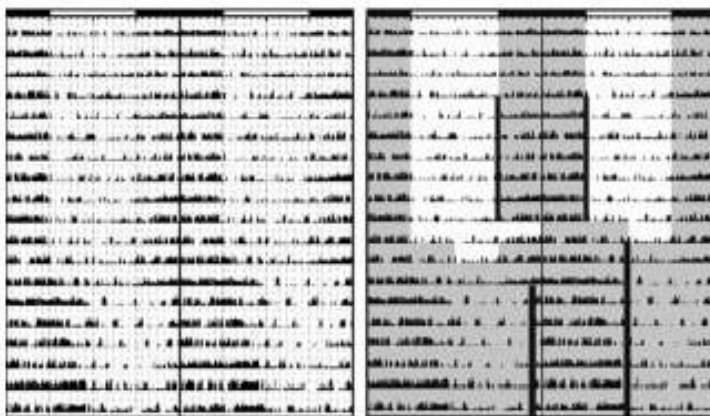
Expresa *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Bmal1*, *c-fos* a *Avp* byla stanovena pomocí *in situ* hybridizace s radioaktivně značenou RNA sondou s následnou autoradiografií. Aby bylo možno lépe lokalizovat hybridizační signál v rámci SCN nebo sítnice, byla použita i emulsní autoradiografie. Množství mRNA v SCN či sítnici bylo stanoveno jako

relativní optická densita hybridizačního signálu na autoradiografickém filmu nebo emulsním preparátu.

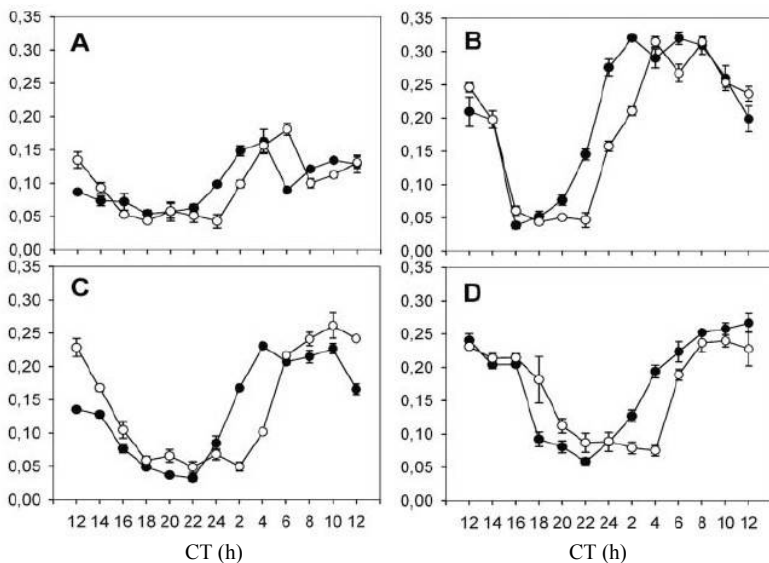
Výsledky

A) Vývoj cirkadiálních hodin a synchronizační vliv matky v prenatalním a časném postnatálním období

Monitorování pohybové aktivity dospělých zvířat ukázalo, že vlivem 6-h posunu LD dochází k fázovému zpoždění rytmu v pohybové aktivitě během tří dnů následujících po tomto posunu (viz Obr. 1). Stejně tak byly u dospělých zvířat během tří dnů fázově opožděny i profily v expresi *Per1*, *Per2*, *Avp* a *c-fos* v SCN v porovnání s profily v SCN kontrolních zvířat (viz Obr. 2).



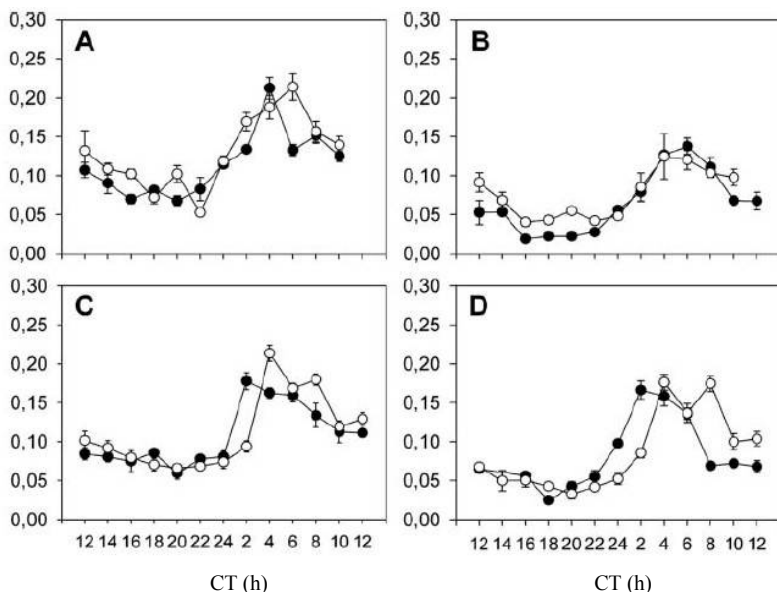
Obrázek 1: Reprezentativní aktogram dospělé samice potkana. V levé části je záznam pohybové aktivity v tzv. dvojitém vynesení, v pravé části je tentýž záznam s vyznačeným světelným režimem (šedé podbarvení označuje tmavou fázi světelného režimu). Svislé silné čáry spojují začátky, resp. konce pohybové aktivity. Ze záznamů je patrné, že aplikace posunu vede u dospělých zvířat během tří dnů k seřízení cirkadiálního rytmu v pohybové aktivitě.



Obrázek 2: Vliv 6-hod posunu světelného režimu ve smyslu zpoždění na genovou expresi v SCN dospělého potkana. Profily v expresi časného raného genu *c-fos* (A), hodinami kontrolovaného genu *Avp* (B) a hodinových genů *Per1* (C) a *Per2* (D) byly stanoveny v SCN kontrolních zvířat (černé body), a zvířat vystavených 6-hod posunu světelného režimu (bílé body). Obě skupiny byl vypuštěny do konstantní tmy a 24-hod profily v expresi byly stanoveny po třech (A, B) a pěti (C, D) dnech v konstantní tmě. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty relativní optické density ($n=4$) \pm S. E. M.

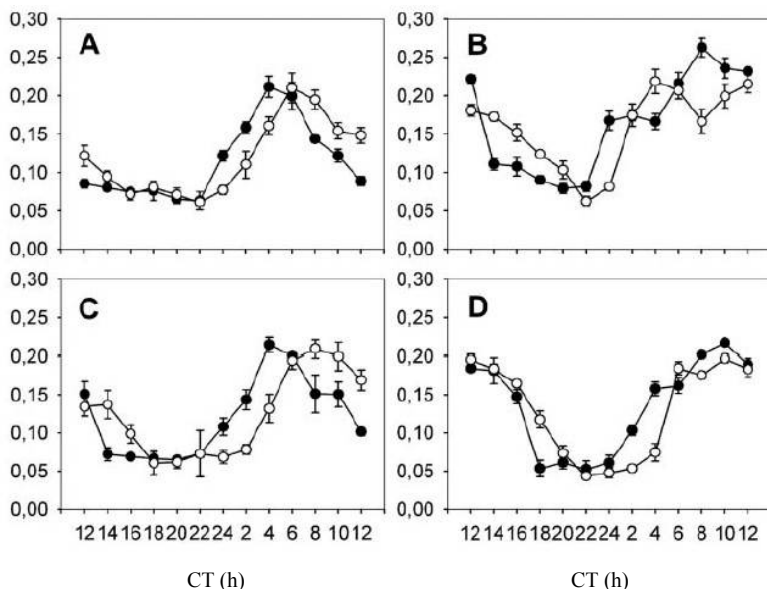
Výše popsaný fázový posun světelného režimu jsme aplikovali březím samicím ve 20. dnu březosti a zjistili jsme, že profily v expresi *c-fos* a *Avp* v SCN experimentálních mláďat nebyly 1. postnatální den (tj. 3 dny po posunu) v porovnání s profily u stejně starých mláďat z kontrolní skupiny nijak ovlivněny (Obr. 2: A, B). Pokud jsme však porovnávali fáze profilů v expresi genů *Per1* a *Per2* v SCN u 3-denních a 6-denních potkaních mláďat, tj. za 5 a 8 dnů po

posunu (Obr. 3), prokázali jsme jejich významné fázové opožďení. Interval mezi E20 a P3 (tj. 5 dní) byl tedy pro seřízení SCN mateřskou synchronizací již dostačující.



Obrázek 3: Vliv α -noci posunu světelného režimu na expresi casného raného genu *c-fos* (A, C) a hodinami kontrolovaného genu *Avp* (B, D) v SCN potkaních mládřat v P0-P1. Byl-li posun světelného režimu aplikován březím samicím 20. den březosti, tj. 20. den embryonálního vývoje (E20), profily v expresi *c-fos* (A) i *Avp* (B) v SCN mládřat jejichž matkám byl aplikován posun světelného režimu (bílé body) se v P0-P1, tj. tři dny po posunu nelišily od profilů v SCN kontrolních zvířat (černé body). Byl-li posun světelného režimu aplikován v E18, profily v expresi *c-Fos* (C) i *Avp* (D) v SCN mládřat jejichž matkám byl aplikován posun světelného režimu (bílé body) byly v P0-P1, tj. pět dní po posunu posunuty oproti profilům kontrolních zvířat ve smyslu zpoždění. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty relativní optické density ($n=4$) \pm S. E. M.

Vlivem posunu LD již v E18 došlo k fázovému zpoždění profilů exprese *c-fos* a *Avp* v SCN v P0-P1. (Obr. 3: C, D). Prokázali jsme tak, že cirkadiální hodiny jsou ve fetálním SCN schopny reagovat na mateřské signály fázovým posunem během pěti dnů počínaje již od E18.



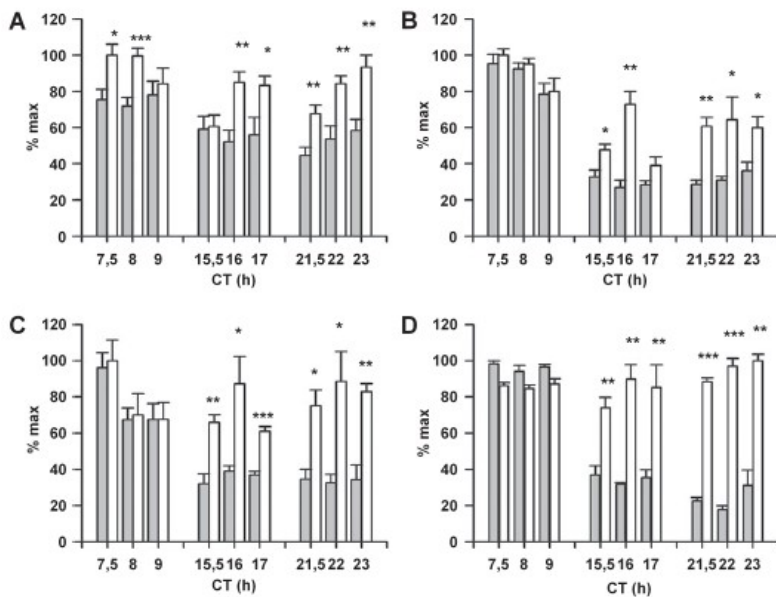
Obrázek 4: Vliv o-nou posunu světelného režimu v LZV na profily v expresi hodinových genů *Per1* (A, C) a *Per2* (B, D) v SCN 3-denních (A, C) a 6-denních (B, D) potkaních mláďat. V SCN mláďat jejichž matkám byl aplikován posun světelného režimu (bílé body) jsou 3. postnatální den profily v expresi *Per1* (A) a *Per2* (B) posunuty oproti profilům v expresi v SCN kontrolních mláďat (černé body) fázově posunuty. Tento rozdíl přetrvává i 6. postnatální den, tj. osm dní po posunu. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty relativní optické density ($n=4$) \pm S. E. M.

B) Vývoj citlivosti cirkadiánního systému ke světelným podnětům

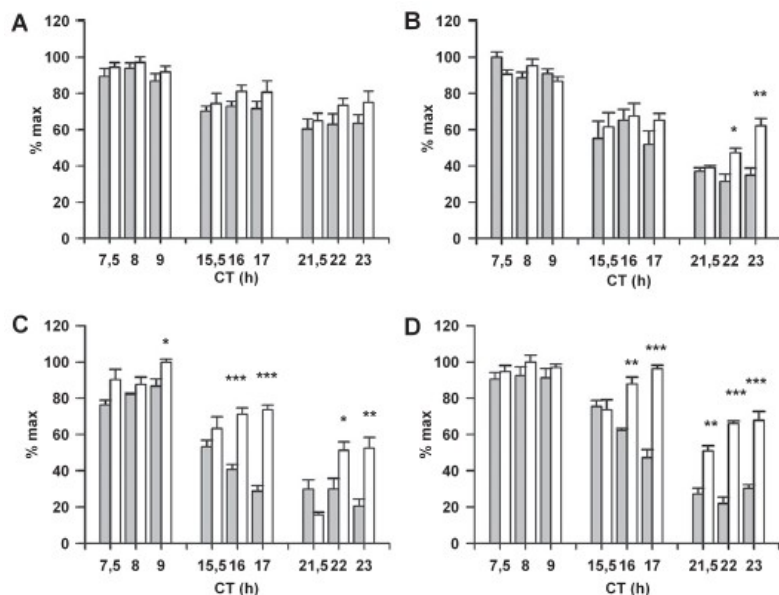
Exprese *Per1* byla v SCN 1-denních mládřat indukována světelným pulsem aplikovaným jak během subjektivního dne, tak během subjektivní noci (Obr. 5A). U 3-denních (obr. 5B), 5-denních (Obr. 5C) a 10-denních (Obr. 5D) mládřat je exprese *Per1* v SCN citlivá na světlo během subjektivní noci, avšak již nikoliv během subjektivního dne. Mechanismus regulující citlivost *Per1* na světlo byl tedy v SCN přítomen již 3. postnatální den a dále se vyvíjel.

Citlivost exprese *Per2* v SCN na světelné podněty (Obr. 6) se vyvíjí pomaleji než *Per1*. Světelná indukce exprese *Per2* byla pozorována teprve 3. postnatální den (Obr. 6B). V SCN 5-denních mládřat (Obr. 6C) byla fotoindukce exprese *Per2* omezena především na dobu subjektivní noci, i když k mírnému zvýšení exprese došlo také po pulsu během subjektivního dne. Teprve u 10-denních mládřat (Obr. 6D) byla fotoindukce exprese *Per2* omezena výhradně na dobu subjektivní noci.

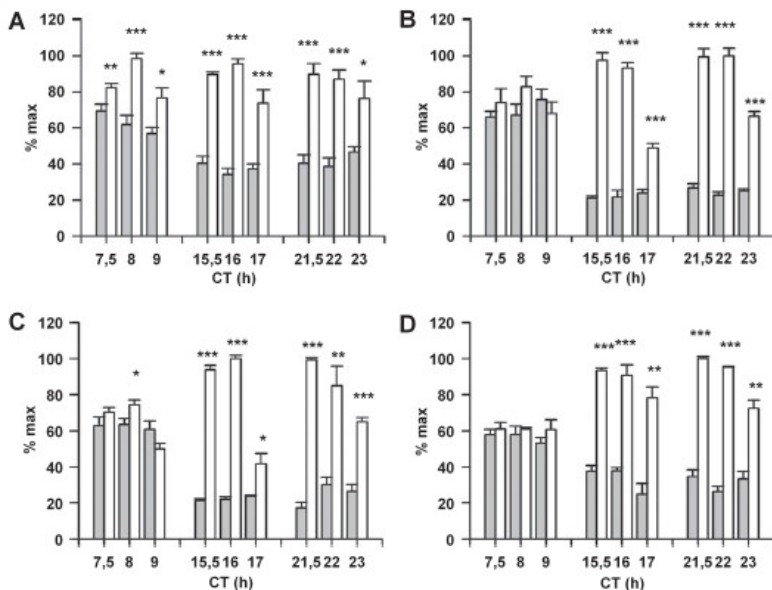
Exprese *c-fos* v SCN 1-denních mládřat byla citlivá na světlo během subjektivní noci i během subjektivního dne (Obr. 7A). U 3-denních mládřat (Obr. 7B) byla exprese *c-fos* v SCN indukována světlem během subjektivní noci a nikoliv během subjektivního dne, avšak ještě 5. postnatální den (Obr. 7C) byla pozorována mírná indukce exprese *c-fos* po světelném pulsu aplikovaném během subjektivního dne. Teprve u 10-denních mládřat (Obr. 7D) byla fotoindukce *c-fos* omezena výhradně na dobu subjektivní noci.



Obrázek 5: Vliv 30 min světelných pulsů na expresi *Per1* mRNA v SCN 1-denních (A), 3-denních (B), 5-denních (C) a 10-denních (D) potkaních mládřat. Mládřata vypuřřena do konstantní tmy a následně vystavena 30min světelnému pulsu během subjektivního dne (CT7) nebo během první (CT15) či druhé (CT21) poloviny subjektivní noci. Hladina *Per1* mRNA v SCN kontrolních (ředé sloupce) a osvětlených mládřat (bílé sloupce) byla stanovena 30min, 1hod a 3hod po začátku každého pulsu. Množství *Per1* mRNA bylo stanoveno jako relativní optická densita oblastí SCN na autoradiografickém filmu a převedeno na procenta maximální průměrné hodnoty. Každý sloupec reprezentuje průměr \pm S. E. M. (pro A $n=6-8$; pro B-D $n=4$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; * $P<0,001$ (T-test)**



Obrázek 6: Vliv světelných pulsů na expresi *Per2* mRNA v SCN 1-denních (A), 3-denních (B), 5-denních (C) a 10-denních (D) potkaních mlád'at. Mlád'ata byla vypuštěna do konstantní tmy a následně vystavena 30min světelnému pulsu během subjektivního dne (CT7) nebo během první (CT15) či druhé (CT21) poloviny subjektivní noci. *Per2* mRNA byla stanovena 30min, 1hod a 2hod po začátku každého pulsu v SCN kontrolních (šedé sloupce) a osvětlených mlád'at (bílé sloupce). Množství *Per2* mRNA bylo vyhodnoceno jako relativní optická densita oblasti SCN na autoradiografickém filmu a převedeno na procenta maximální průměrné hodnoty. Každý sloupec reprezentuje průměr \pm S. E. M. (pro A $n=6-8$; pro B-D $n=4$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ (T-test)



Obrázek 7: Vliv 30 min světelných pulsů na expresi *c-fos* mRNA v SCN 1-denních (A), 3-denních (B), 5-denních (C) a 10-denních (D) potkaních mládřat. Mládřata vypuštěna do konstantní tmy a následně vystavena 30min světelnému pulsu během subjektivního dne (CT7) nebo během první (CT15) či druhé (CT21) poloviny subjektivní noci. Hladina *c-fos* mRNA v SCN kontrolních (šedé sloupce) a osvětlených mládřat (bílé sloupce) byla stanovena 30min, 1hod a 3hod po začátku každého pulsu. Množství *c-Fos* mRNA bylo stanoveno jako relativní optická densita oblasti SCN na autoradiografickém filmu a převedeno na procenta maximální průměrné hodnoty. Každý sloupec reprezentuje průměr \pm S. E. M. (pro A $n=6-8$; pro B-D $n=4$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; * $P<0,001$ (T-test)**

Prokázali jsme, že molekulární mechanismus zajišťující synchronizaci cirkadiálních hodin v SCN je citlivý ke světlu již 1. postnatální den. V souladu s předchozími výsledky (Leard et al., 1994; Bendová et al., 2004) jsme dále potvrdili, že mechanismus, kterým

cirkadiánní hodiny vymezují citlivost exprese *c-fos* ke světlu, se začíná postupně vyvíjet od 3. dne po narození, je však plně vyvinut až 10. den po narození.

V další studii jsme se zaměřili na vývoj citlivosti sítnice ke světlu u 1-denních, 3-denních, 5-denních a 10-denních potkaních mláďat.

Již první den po narození dochází v sítnici potkaních mláďat ke spontánní expresi *Per1* a *Per2*. Až do 10. dne po narození v sítnici kontrolních zvířat nebyla pozorována výrazná spontánní exprese *c-fos*.

Světelný puls aplikovaný během subjektivního dne i subjektivní noci způsobil indukci exprese *c-fos* v gangliových buňkách sítnice. Expresce *Per1* a *Per2* v těchto buňkách ovlivněna nebyla. Počet *c-fos* mRNA pozitivních buněk byl vysoký 30min a 1hod po začátku světelného pulsu a pak postupně klesal. Analýza emulsních autoradiogramů také ukázala, že po světelném pulsu aplikovaném během subjektivního dne i během subjektivní noci dochází v sítnici 1-denních a 3-denních mláďat k indukci exprese *Per1* a *c-fos* v ostře ohraničené vrstvě na vnějším okraji sítnice. Vzhledem k tomu, že *pars nervosa retinae* je ještě 3. postnatální den jen málo diferencovaná, je onou vrstvou s největší pravděpodobností RPE. Zvýšené množství světlem indukované *Per1* i *c-fos* mRNA v RPE bylo u 1-denních mláďat pozorováno 1-2 hod po zahájení světelného pulsu a pak klesalo. U 3-denních mláďat citlivost exprese *Per1* a *c-fos* v RPE ke světlu pomalu odeznívá a u 5-denních mláďat již nebyla pozorována.

Ve studii zaměřené na vývoj reakce cirkadiánního pacemakeru v SCN na délku dne jsme zkoumali vliv dlouhé

letní a krátké zimní fotoperiody na denní profily v expresi *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Bmall* v SCN 3-denních, 10-denních a 20-denních potkaních mláďat. Třetí den po narození nebyly profily exprese ani jednoho ze sledovaných genů modulovány fotoperiodou. U 10-denních mláďat docházelo pouze k ovlivnění profilů exprese *Per1* a *Per2*, tedy genů, jejichž exprese je citlivá na světlo. Na profily genů, jejichž exprese není fotosensitivní, měla fotoperioda vliv až v pozdějších vývojových stádiích. 20. den po narození byla fotoperiodou ovlivněna exprese *Cry1* mRNA. Vliv fotoperiody na expresi *Bmall* v SCN se neprojevil ještě ani u 20-denních mláďat. Synchronizace cirkadiálního systému fotoperiodou se tedy u potkana začíná vyvíjet okolo 10. dne po narození, během postnatální ontogeneze postupně dozrává a dospělé úrovně dosahuje pravděpodobně až v období odstavu.

Diskuse

Výsledky předložených prací pomáhají vytvořit obraz ontogenetického vývoje synchronizace cirkadiálního systému potkana. Během prenatálního vývoje se informace o světelném režimu dostávají k mláďatům zprostředkovaně přes cirkadiální systém matky. Cirkadiální hodiny mláďete nejsou při změně světelného režimu během prenatálního vývoje synchronizovány zároveň s matkou, ale jsou seřizovány mateřskými signály až poté, co se cirkadiální hodiny matky přizpůsobí změně. Mateřská synchronizace hraje nejvýznamnější roli v prenatálním období vývoje a v prvních dnech po narození. S postupující maturací se cirkadiální hodiny mláďete „osamostatňují“ od synchronizačního vlivu matky a postupně převládá synchronizace světlem.

Pro synchronizaci cirkadiánních rytmů světlem je důležitá fotosensitivní funkce sítnice a funkční propojení sítnice s centrálním pacemakerem v SCN. SCN samo pak musí být dostatečně zralé, aby mohl být cirkadiánní pacemaker synchronizován světelnými podněty. K prvnímu propojení sítnice s SCN dochází již první den po narození a již tehdy je sítnice potkaních mláďat citlivá na světlo. Fotosensitivita gangliových buněk sítnice se 1. postnatální den projevuje expresí časného raného genu *c-fos* po osvětlení a během časné postnatální ontogeneze se dále vyvíjí. Již od prvního dne po narození dochází také ke spontánní expresi *Per1* a *Per2* v sítnici. Zdá se, že exprese *Per1* a *Per2* není v *pars nervosa retinae* citlivá na světlo, ale v prvních dnech po narození byla přechodně pozorována indukce exprese *Per1* a *c-fos* v RPE.

Již první den po narození reagují cirkadiánní hodiny v SCN na světelné podněty, a to jak na úrovni aktivace neuronů SCN reprezentované indukcí exprese *c-fos* (Leard et al., 1994), tak také indukcí exprese *Per1* v SCN. Mechanismus kterým cirkadiánní hodiny v SCN vrátkují citlivost exprese *Per1* a *c-fos* ke světelným podnětům se začíná uplatňovat od 3. postnatálního dne. Citlivost exprese hodinového genu *Per2* a její vrátkování se vyvíjí pomaleji, což naznačuje, že by mohlo být řízeno jiným mechanismem než u *Per1* a *c-fos*. Jak postupně dozrává molekulární mechanismus cirkadiánních hodin, vrátkovací mechanismus se dále vyvíjí a citlivost exprese *Per1*, *Per2* a *c-fos* je 10. postnatální den již omezena pouze na dobu subjektivní noci. Vývoj vrátkovacího mechanismu je doprovázen funkčním rozdělením SCN na dmSCN, kde dochází pouze ke spontánní rytmické expresi hodinových genů a vlSCN, kde je exprese

Per1 a *c-fos* indukována světelným pulsem během subjektivní noci.

Mechanismus, kterým jsou cirkadiánní hodiny v SCN synchronizovány světlem, má více součástí. Kromě okamžité reakce na světelné podněty dochází i ke komplexnímu ovlivnění denních profilů ve spontánní expresi hodinových genů v SCN. Zdá se, že přítomnost mechanismu vrátkujícího citlivost vlSCN ke světelným podnětům je předpokladem pro to, aby spontánní cirkadiánní rytmicita v dmSCN byla ovlivněna fotoperiodou. Spontánní exprese *Per1* a *Per2* v SCN začíná být modulována délkou dne 10. postnatální den a reakce na fotoperiodu se dále vyvíjí. Profil v expresi *Cry1* je ovlivněn fotoperiodou až 20. postnatální den a exprese *Bmal1* je ovlivněna délkou dne ještě později.

Získané výsledky naznačují, že funkčně nejprve dozrává vlSCN, ve kterém dochází k okamžitému ovlivnění exprese hodinových genů světlem. Když je dostatečně vyvinutý mechanismus vrátkující citlivost vlSCN ke světlu a synaptické propojení vlSCN a dmSCN dosáhne dospělé úrovně, může být informace o světle zpracovaná ve vlSCN předána do dmSCN, kde dojde k modulaci exprese hodinových genů. Jak komplexní bude ovlivnění spontánní exprese hodinových genů v dmSCN délkou dne závisí i na celkové zralosti molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin.

Závěry

V předložené disertační práci jsme se pokusili zmapovat vývoj světelné synchronizace cirkadiánního systému potkana. Pozornost byla věnována zejména tomu, jak během prenatalního a postnatalního období působí světelný režim na vyvíjející se cirkadiánní hodiny mláďete.

V prenatalním období se informace o světle dostává k mláďatům zprostředkovaně přes cirkadiánní systém matky. Během postnatálního období se postupně vyvíjí nejprve okamžitá reakce cirkadiánních hodin v SCN mláďat na světelné podněty a posléze modulace cirkadiánní rytmicity délkou světlé části dne. Rovněž jsme ukázali, že sítnice potkana reaguje na světelné podněty již v průběhu morfologické a funkční maturace.

Práce vznikla za finanční podpory grantů Grantové agentury České republiky č. 309/05/0350, 309/08/0503, doktorského grantového projektu pro studenty neurověd 309/08/H079, výzkumných záměrů LC554 a AV0Z 50110509 a projektu 6. RP EU EUCLOCK č. 018741.

Použitá literatura

- Albrecht, U.; Zhong, B.; Larkin, D.; Sun, Z. S.; Lee, Ch. Ch. 2001. mPer1 and mPer2 are Essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms*, 2001, vol. 16, no. 2, s. 100-104.
- Bendová, Z.; Sumová, A.; Illnerová, H. 2004. Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Dev. Brain Res.*, 2004, vol. 148, no. 1, s. 105-112.
- Berson, D. M.; Dunn, F. A.; Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 2002, vol. 295, no. 5557, s. 1070-1073.
- Daan, S.; Pittendrigh, C. S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol. A*, vol. 106, no. 3, s. 255-266.
- Duncan, M. J.; Banister, M. J.; Reppert, S. M. 1986. Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Res.*, 1986, vol. 369, no. 1-2, s. 326-330.
- Fahrenkrug, J.; Nielsen, H. S.; Hannibal, J. 2004. Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport*, 2004, vol. 15, no. 5, s. 781-784.
- Hattar, S.; Liao, H. W.; Takao, M.; Berson, D. M.; Yau, K. W. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections and intrinsic photosensitivity. *Science*, 2002, vol. 295, no. 5557, s. 1065-1070.
- Hirota, T.; Fukada, Y. 2004. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zool. Sci.*, 2004, vol. 21, no. 4, s. 359-368.
- Ibata, Y.; Okamura, H.; Tanaka, M.; Tamada, Y.; Hayashi, S.; Iijima, N.; Matsuda, T.; Munekawa, K.; Takamatsu, T.; Hisa, Y.; Shigeyoshi, Y.; Amaya, F. 1999. Functional Morphology of the Suprachiasmatic Nucleus. *Front. Neuroendocrinol.*, 1999, vol. 20, no. 3, s. 241-268.
- Jud, C.; Albrecht, U. 2006. Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J. Biol. Rhythms*, 2006, vol. 21, no. 2, s. 149-154.
- Ko, C. H.; Takahashi, J. S. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 2006, vol. 15, spec no. 2, s. R271-R277.

- Kornhauser, J. M.; Nelson, D. E.; Mayo, K. E.; Takahashi, J. S. 1990. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, 1990, vol. 5, no. 2, s. 127-134.
- Kováčiková, Z.; Sládek, M.; Bendová, Z.; Illnerová, H.; Sumová, A. 2006. Expression of Clock and Clock-Driven Genes in the Rat Suprachiasmatic Nucleus during Late fetal and Early Postnatal Development. *J. Biol. Rhythms.*, 2006, vol. 21, no. 2, s. 140-148.
- Leard, L. E.; Macdonald, E. S.; Heller, H. C.; Kilduff, T. S. 1994. Ontogeny of Photic-induced c-fos mRNA Expression in Rat Suprachiasmatic Nuclei. *Neuroreport*, 1994, vol. 5, no. 18, s. 2683-2687.
- Miyake, S.; Sumi, Y.; Yan, L.; Takekida, S.; Fukuyama, T.; Ishida, Y.; Yamaguchi, S.; Yagita, K.; Okamura, H. 2000. Phase-dependent response of *Per1* and *Per2* genes to a light stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, 2000, vol. 294, no. 1, s. 41-44.
- Morin, L. P.; Allen, C. N. 2006. The circadian visual system, 2005. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2006, vol. 51, no. 1, s. 1-60.
- Namihira M., Honma S., Abe H., Tanahashi Y., Ikeda M., Honma K. 1999. Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and Bmal1, transcripts in the rat retina. *Neurosci. Lett.*, 1999, vol. 271, no. 1, s. 1-4.
- Namihira, M.; Honma, S.; Abe, H.; Masubuchi, S.; Ikeda, M.; Honma, K. 2001. Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *Neuroreport*, 2001, vol. 12, no. 3, s. 471-475.
- Reppert, S. M.; Weaver, D. R. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.*, 2001, vol. 63, s. 647-676.
- Ruan, G. X.; Zhang, D. Q.; Yamazaki, S.; McMahan, D. 2006. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, vol. 103, no. 25, s. 9703-9708.
- Rusak, B.; McNaughton, L.; Robertson, H. A.; Hunt, S. P. 1992. Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1992, vol. 14, no. 1-2, s. 124-130.
- Rusak, B.; Robertson, H. A.; Wisden, W.; Hunt, S. P. 1990. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 1990, vol. 248, no. 4960, s. 1237-1240.

- Sakamoto, K.; Oishi, K.; Shirashi, M.; Hamano, S.; Otsuka, H.; Miyake, Y.; Ishida, N. 2000. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport*, 2000, vol. 11, no. 18, s. 3995-3997.
- Sekaran, S.; Lupi, D.; Jones, S. L.; Sheely, C. J.; Hattar, S.; Yau, K.-W.; Lucas, R. J.; Foster, R. G.; Hankins, M. W. 2005. Melanopsin dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr. Biol.*, 2005, vol. 15, no. 12, s. 1099-1107.
- Sernagor, E.; Eglén, S. J.; Wong, R. O. 2001. Development of retinal ganglion cell structure and function. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2001, vol. 20, no. 2, s. 139-174.
- Shibata, S.; Moore, R. Y. 1988. Development of a fetal circadian rhythm after disruption of a maternal circadian system. *Brain Res.*, 1988, vol. 469, no. 1-2, s. 313-317.
- Sládek, M.; Sumová, A.; Kováčiková, Z.; Bendová, Z.; Laurinová, K.; Illnerová, H. 2004. Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, vol. 101, no. 16, s. 6231-6236.
- Sumová, A.; Jáč, M.; Sládek, M.; Šauman, I.; Illnerová, H. 2003. Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J. Biol. Rhythms*, 2003, vol. 18, no. 2, s.134-144.
- Tosini, G.; Davidson, A. J.; Fukuhara, C.; Kasamatsu, M.; Castanon-Cervantes, O. 2007. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J.*, 2007, vol. 21, no. 14, s. 3866-3871.
- Tosini, G.; Fukuhara, C. 2002. The mammalian retina as a clock. *Cell. Tissue Res.*, 2002, vol. 309, no. 1, s. 119-126
- Tosini, G.; Menaker, M. 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, vol. 272, no. 5260, s. 419-421.
- Tosini, G.; Pozdeyev, N.; Sakamoto, K.; Iuvone, P. M. 2008. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays*, 2008, vol. 30, no. 7, s. 624-633.
- Tu, D. C.; Zhang, D.; Demas, J.; Slutsky, E. B.; Provencio, I.; Holy, T. E.; VanGelder, R. N. 2005. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron*, 2005, vol. 48, no. 6, s. 987-999.

- van Esseveldt, L. E.; Lehman, M. N.; Boer, G. J. 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Rev.*, 2000, vol. 33, no. 1, s. 34-77.
- Weidman, T. A.; Kuwabara, T. 1969. Development of the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1969, vol. 8, no. 1, s. 60-69.
- Weinert, D. 2005. Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol. Int.*, 2005, vol. 22, no. 2, s.179-205.
- Witkovsky, P.; Veisenberger, E.; LeSauter, J.; Yan, L.; Johnson, M.; Zhang, D. Q.; McMahon, D.; Silver, R. 2003. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period1* in the mouse retina. *J. Neurosci.*, 2003, vol. 23, no. 20, s. 7670-7676.
- Yan, L.; Silver, R. 2004. Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, vol.19, no. 4, s. 1105-1109.

Seznam publikací

1) publikace *in extenso* které jsou podkladem disertace:

a) v časopisech s IF:

El Hennamy R., Matějů K., Bendová, Z., Sosniyenko S., Sumová A.: Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 2008, 23 (5), 435-444 (IF=3,868)

Matějů K., Bendová Z., El-Hennamy R., Sládek M., Sosniyenko S., Sumová A.: Development of the light sensitivity of clock gene *Period1*, *Period2* and immediate-early gene *c-fos* within the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 2009, 29 (3), 490-501 (IF=3,673)

Kováčiková Z., Sládek M., Laurinová K., Bendová Z., Illnerová H., Sumová A.: Ontogenesis of photoperiodic entrainment of the molecular core clockwork in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 2005, 1064 (1-2), 83-89 (IF=2,296)

Matějů K., Bendová Z., Sumová A. Light sensitivity of expression of clock genes *Period1*, *Period2* and immediate-early gene *c-fos* within retina of early postnatal rat. *v době podávání práce manuskript v přípravě*

Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Matějů K., Polidarová L., Sosniyenko S., Illnerová H. Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiological Research*, 2008, 57 (Suppl. 3), S139-S148 (IF=1,505)

Sumová A., Bendová Z., Sládek M., Kováčiková Z., El-Hennamy R., Laurinová K., Illnerová H.: The rat circadian clockwork and its photoperiodic entrainment during development. *Chronobiology International* 2006, 23 (1-2), 237-43 (IF=2,4)

Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Laurinová K., Jindráková Z., Illnerová H.: Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS Letters* 2006, 580 (12), 2836-42 (IF=3,4)

b) v časopisech bez IF:

Laurinová K., Sumová A.: Ontogenetický vývoj cirkadiánního systému savců. *Československá fyziologie* 2006; 55 (4), 96-102

2) publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

a) v časopisech s IF:

Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K., Illnerová H.: Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of National Academy of Science U. S. A.* 2004, 101(16), 6231-6. (IF=10,4)

b) v časopisech bez IF:

-