

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

**FOTOPERIODICKÁ SYNCHRONIZACE
CIRKADIÁNNÍCH HODIN V
SUPRACHISMATICKÝCH JÁDRECH**

**PHOTOPERIODIC ENTRAINMENT OF THE CIRCADIAN
CLOCK IN THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS**

Bc. Daniela Parkanová

V Praze 2008

Vedoucí práce:
PharmDr. Alena Sumová, DrSc.

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Aleně Sumové, DrSc. za vedení mé práce a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Serhiy Sosniyenkovi, Lence Polidarové, Evě Suchanové a celému kolektivu oddělení Neurohumorálních regulací za mnoho cenných rad a pomoc při práci.

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a jiných citovaných pramenů. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré informace budou řádně citovány.

V Praze dne 4.9.2008

Daniela Parkanová

ABSTRACT

Most of physiological processes run in the organisms persistently, they begin in a definite rhythm again and again. The greatest attention is paid to the rhythms, whose period is equal to one day - they are called circadian rhythms. In case of mammals, these circadian rhythms are under control of the central circadian clock that resides in the suprachiasmatic nucleus, a part of the anterior hypothalamus. The mechanism of rhythm generation is based on interacting transcriptional-translational feedback loops that control expression of the clock genes in every single cell. Clock-controlled genes transmit these rhythms into the whole organism where they drive many physiological processes. Clock genes are expressed also in the peripheral oscillators (for example in liver, lungs, heart) and are under direct control of the central oscillator. Circadian clock needs to be entrained everyday to the external time to function precisely. The main entraining cue is the light part of the day. The length of the light part of the day, i.e. photoperiod, changes during the year rapidly in our latitudes and the central oscillator has to adapt to the changes all the time. The length of the photoperiod is encoded directly in the central oscillator by the transcriptional-translational relations among the clock genes and their protein products. The aim of the diploma thesis was to elucidate the effect of photoperiod on the central molecular circadian clock within the suprachiasmatic nucleus as well as the peripheral clock in the liver. Thorough understanding of the issue how the biological rhythms are generated and entrained by environmental cues seems to be important for new ways of the therapy, i.e., chronotherapy and chronopharmacology. The thing is that dysfunction of the normal circadian rhythmicity can lead as far as to serious health consequences, like depression, sleep disease, cancer, cardiovascular disorder, obesity etc. The manipulation of clock gene expression or functional clock gene activity could lead to the efficient treatment of such circadian diseases.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AA-NAT.....	arylalkyl-N-acetyltransferase, arylalkyl-N-acetyltransferáza
ASPS.....	advanced sleep phase syndrom, syndrom fázového předběhnutí spánku
ATM.....	ataxia telangiectasia mutated, protein kontrolního bodu buněčného cyklu
AVP.....	arginin vasopresin
B2M.....	β-2 mikroglobulinu
bHLH.....	basic helix-loop-helix, DNA vazebná doména basic helix-loop-helix
bZip.....	basic-leucine zipper domain, DNA vazebná doména typu bazického leucinového zipu
cAMP.....	cyclic adenosin monophosphate, cyklický adenosin monofosfát
CCGs.....	clock-controlled genes, hodinami kontrolované geny
cGMP.....	cyclic guanosin monophosphate, cyklický guanosin monofosfát
Chk2.....	checkpoint homolog 2, protein kontrolního bodu buněčného cyklu
CKIε.....	casein kinase I epsilon, kasein kináza epsilon
CRE.....	cAMP response element
CREB.....	cAMP response element-binding protein, cAMP response element-vazebný protein
Cry.....	Cryptochrome gene, gen Cryptochrome
C-SCN.....	caudal part of SCN, kaudální část SCN
Ct.....	threshold cycle
CT.....	circadian time, cirkadiánní čas
DBP.....	albumin D-element binding protein, protein vázající D-element albuminu
DD.....	dark-dark, podmínky stálé tmy
DEPC.....	diethylpyrokarbonát
dmSCN.....	dorsomedial SCN, dorsomediální část suprachiasmatického jádra
dNTP.....	deoxynukleotidtrifosfát
DSPS.....	delayed sleep phase syndrome, syndrom fázového zpoždění spánku
E4BP4.....	E4 binding protein 4
EtOH.....	ethanol
FBXL3.....	F box family of ubiquitin E3 ligases
GABA.....	γ-aminobutyric acid, kyselina γ-aminomáselná
GHT.....	geniculohypothalamic tract, genikulohypotalamický trakt
HLF.....	hepatocyte leukemia factor
IGL.....	intergeniculate leaflet, intergenikulární lístek
L 18:6.....	long photoperiod, dlouhá fotoperioda (18 hodin světla, 6 hodin tmy)
LD.....	light-dark, světelný režim světlo-tma
LL.....	light-light, podmínky stálého světla
MAP.....	mitogen-activated protein kinase, protein kináza aktivovaná mitogenem
miR-132.....	microRNA 132
miR-219.....	microRNA 219
miRNA.....	microRNA
M-SCN.....	median part of SCN, mediální část SCN
NAT.....	N-acetyltransferase, N-acetyltransferáza
NMDA.....	N-methyl-D-aspartate receptor, N-metyl-D-aspartátový receptor
NPAS2.....	Neuronal PAS domain protein 2
NPY.....	neuropeptid Y
NO.....	nitric oxide, oxid dusný
OD.....	optical density, optická denzita
PACAP.....	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PAR.....prolin and acid aminoacid rich domain, doména bohatá na prolin a kyselé
 aminokyseliny
 PAS.....Per-Arnt-Sim domain, Per-Arnt-Sim vazebná doména
 PBS.....phosphate buffered saline, fosfátový pufř
 PCR.....polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
 Per.....Period gene, hodinový gen Period
 PFA.....paraformaldehyd
 PRC.....phase response curve, fázově responzní křivka
 PRKCA.....protein kinasa C α
 RA.....z angl. rectangular, pravoúhlý, zde: náhlý přechod světlo/tma
 RHT.....retinohypothalamic tract, retinohypotalamický trakt
 R-SCN.....rostral part of SCN, rostrální část SCN
 S 6:18.....short photoperiod, krátká fotoperioda (6 hodin světla, 18 hodin tmy)
 SCN.....suprachiasmatic nucleus, suprachiasmatická jádra
 SEM.....standard error of the mean, střední chyba průměru
 TEF.....thyroid embryonic factor
 Tim.....Timeless gene, gen Timeless
 TW.....z angl. twilight, soumrak, šero, zde: pozvolný přechod světlo/tma
 VPAC₂.....vasoactive intestinal polypeptide receptor 2
 VIP.....vasoactive intestinal peptid, vasoaktivní intestinální peptid
 vlSCN.....ventrolateral SCN, ventrolaterální část suprachiasmatického jádra

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. BIOLOGICKÉ RYTMY	11
2.1.1. Cirkadiánní rytmy	12
2.2. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM	12
2.2.1. Suprachiasmatická jádra	12
2.2.2. Vstupní a výstupní dráhy z SCN	13
2.2.3. Synchronizace buněk v SCN	14
2.2.4. Periferní oscilátory	15
2.2.5. Epifýza a melatonin	16
2.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ	17
2.3.1. Obecné schema	17
2.3.2. Charakteristika hodinových genů	17
2.3.3. Model molekulárního oscilátoru	21
2.3.4. Hodinami kontrolované geny	24
2.4. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU	26
2.4.1. Světelná synchronizace	26
2.4.2. Světlem ovlivněná indukce hodinových genů	27
2.4.3. Vliv fotoperiody na cirkadiánní systém	28
2.4.3.1. Synchronizace fotoperiodou	28
2.4.3.2. Vliv fotoperiody na expresi hodinových genů	30
2.4.3.3. Odlišný vliv fotoperiody na expresi hodinových genů v různých částech SCN	31
3. MATERIÁL A METODIKA	33
3.1. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA	33
3.2. USPOŘÁDÁNÍ JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ	33
3.2.1. Vliv dlouhé a krátké fotoperiody s náhlým přechodem světlo/tma na tvorbu Per1 a Per2 mRNA a PER1 a PER2 proteinů v SCN	33
3.2.2. Vliv dlouhé a krátké fotoperiody s pozvolným přechodem světlo/tma na tvorbu Per1 a Per2 mRNA a PER1 a PER2 proteinů v SCN	33
3.2.3. Detekce exprese hodinových genů v játrech na dlouhé a krátké fotoperiodě	34
3.3. STANOVENÍ DENNÍHO PROFILU HLADIN Per1 A Per2 mRNA POMOCÍ IN SITU HYBRIDIZACE	35
3.3.1. Pracovní roztoky	37
3.3.2. Postup	39
3.3.2.1. Odběr mozků a příprava řezů	39
3.3.2.2. Příprava značené cRNA sondy	39
3.3.2.3. Prehybridizace	41
3.3.2.4. Hybridizace	42
3.3.2.5. Promývání a autoradiografie	42
3.3.2.6. Analýza hybridizačního signálu	43
3.4. IMUNOCYTOCHEMICKÉ STANOVENÍ DENNÍHO PROFILU HLADIN PROTEINŮ PER1 A PER2	43
3.4.1. Pracovní roztoky	44
3.4.2. Postup	46
3.4.3. Počítání Per1 a Per2 imunopozitivních buněk v SCN	47

3.5. DETEKCE mRNA HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH POMOCÍ Kvantitativní real-time RT-PCR.....	47
3.5.1. Postup.....	48
3.5.1.1. Odběr tkáně a izolace celkové RNA	48
3.5.1.2. Syntéza cDNA.....	49
3.5.1.3. Kvantitativní real-time PCR.....	49
3.6. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	51
4. VÝSLEDKY.....	52
4.1. SROVNÁNÍ VLIVU DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S NÁHLÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY JEJICH PROTEINŮ V SCN	52
4.1.1. Vliv na cirkadiánní profil exprese genu Per1	52
4.1.2. Vliv na cirkadiánní profil exprese genu Per2.....	55
4.1.3. Vliv fotoperiody na profil hladin proteinu PER1	57
4.1.4. Vliv fotoperiody na profil hladin proteinu PER2.....	60
4.2. POROVNÁNÍ VLIVU DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S POZVOLNÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PROTEINŮ PER1 A PER2 V SCN	62
4.2.1. Vliv fotoperiody na cirkadiánní profil exprese genu Per1	62
4.2.2. Vliv fotoperiody na cirkadiánní profil exprese genu Per2	64
4.2.3. Vliv na cirkadiánní profil hladin PER1 proteinu	67
4.2.4. Vliv na cirkadiánní profil hladin PER2 proteinu	69
4.3. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA DLOUHÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY JEJICH PROTEINŮ V SCN	72
4.3.1. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per1 mRNA.....	72
4.3.2. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per2 mRNA.....	72
4.3.3. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER1 proteinu.....	73
4.3.4. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER2 proteinu.....	73
4.4. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA KRÁTKÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PER1 A PER2 PROTEINŮ V SCN	75
4.4.1. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per1 mRNA.....	75
4.4.2. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per2 mRNA.....	75
4.4.3. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER1 proteinu.....	76
4.4.4. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER2 proteinu.....	77
4.5. VLIV FOTOPERIODY NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH	78
4.5.1. Exprese genu Rev-Erb α	78
4.5.2. Exprese genu Per1	80
4.5.3. Exprese genu Per2	81
4.5.4. Exprese genu Bmal1	82
4.5.5. Exprese genu Cry1	83
4.5.6. Exprese hodinami kontrolovaného genu DBP	84

5. DISKUZE	85
5.1. VLIV DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S NÁHLÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA CIRKADIÁNNÍ RYTMUS EXPRESE GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY JEJICH PROTEINŮ V SCN	85
5.2. VLIV DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S POZVOLNÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PROTEINŮ PER1 A PER2 V SCN	87
5.3. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PER1 A PER2 PROTEINŮ V SCN	88
5.4. VLIV FOTOPERIODY NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH	90
6. SOUHRN	92

1. ÚVOD

Všechn život na Zemi je vystaven neustále se měnícím podmínkám. Mezi ně patří beze sporu periodické střídání dne a noci, ale i změny s periodou měsíční, sezónní, či roční. Obsah této práce souvisí především s ději, které vykazují rytmus přibližně denního charakteru. Lidé se dlouho domnívali, že děje, které se v organizmech periodicky opakují (např. střídání doby spánku a bdění, pohyby listů u rostlin) pouze pasivně odrážejí střídání podmínek okolního světa (světlo přes den a tma přes noc). To je dnes již minulostí. Přihlédneme-li k míře s jakou jsou organismy schopny přizpůsobení okolním podmínkám, není divu, že si všechny, od jednobuněčných prokaryotických až po člověka, vyvinuly mechanismy pomocí nichž na tyto změny reagují. Dokonce je i dokáží předvídat a tím lépe využít nadcházející změny vnějšího prostředí. Tyto mechanismy jsou založeny na existenci vnitřního oscilátoru, biologických hodinách, který v organismu vytváří biologické rytmy. Věda, jež se těmito rytmy zabývá se nazývá chronobiologie (chronos = čas). Jako rok jejího vzniku se uvádí rok 1960, ale k velkému rozvoji došlo až v poměrně nedávné době, a to především díky novým možnostem a metodám molekulární biologie. Bylo objeveno několik tzv. hodinových genů, které tvoří základ celé tvorby vnitřních rytmů, a to pomocí zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček. V současné době je největší pozornost věnována jednak důkladnému poznání vzájemných (inter- i intracelulárních) vztahů jednotlivých dílčích komponent a jednak mechanismům, které umožňují propojení s vnějším prostředím. S tím úzce souvisí i studium vlivu fotoperiody (tedy světlé části dne) na tvorbu rytmů v „biologických hodinách“.

Cíle této diplomové práce jsou:

1. Charakterizovat vliv extrémně dlouhé (L 18:6) a extrémně krátké (S 6:18) fotoperiody na expresi hodinových genů Per1 a Per2 a hladiny proteinů PER1 a PER2 v různých částech suprachiasmatických jader: rostrální (R), mediální (M) a kaudální (C).
2. Charakterizovat vliv extrémně dlouhé a extrémně krátké fotoperiody s pozvolným přechodem světlo/tma na expresi genů Per1 a Per2 a hladiny proteinů PER1 a PER2 v rostrální, mediální a kaudální části suprachiasmatických jader.

3. Zjistit, zda délka fotoperiody ovlivňuje expresi hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α , Bmal1 a Cry1 a hodinami kontrolovaného genu DBP v periferním oscilátoru v játrech.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. BIOLOGICKÉ RYTMY

Všechny živé organizmy, od nejjednodušších po nejsložitější, vykazují různé rytmické změny. O rytmu hovoříme v případě, že daná proměnná nabývá neustále odlišných hodnot, přičemž určitou hodnotou prochází opakovaně. Tyto změny jsou navíc periodické, to znamená že dané hodnoty dosahují opakovaně po stále stejné době. Podle délky periody je dělíme:

- a) **rytmy ultradiánní**, s periodou mnohem kratší než 24 hodin.
Patří mezi ně např. rytmus v srdeční a nervové aktivitě, dechová frekvence;
- b) **rytmy cirkadiánní**, s periodou dlouhou přibližně 24 hodin.
Mezi ně patří např. rytmus spánku a bdění, pohybové aktivity, tělesné teploty, rytmus v hladině hormonů v krvi;
- c) **rytmy infradiánní**, s periodou výrazně delší než 24 hodin.
Řadíme sem menstruační a estrální cyklus, rytmus hibernace případně estivace, rytmus emočního stavu (zvýšený výskyt depresí na přechodu zimy a jara).

Charakteristickou vlastností periodických rytmů je, že jsou to rytmy vnitřní, endogenní. Přetrvávají tedy i ve zcela neperiodických prostředích, např. ve stálé tmě bez jakékoliv informace o vnějším čase, kdy jakoby „volně běží v čase“ (Hastings, 1997). Z toho vyplývá, že musí být poháněny nějakými vnitřními hodinami čili pacemakerem, který je schopen tvořit sebeudržující oscilace. Endogenní perioda tohoto pacemakeru se označuje jako τ (tau) a měří se pomocí výstupních rytmů (např. spánek/bdění) v podmínkách, které nevykazují žádné rytmické vlivy prostředí, nejčastěji ve stálé tmě (Illnerová, 1994).

Je však třeba zdůraznit, že ne všechny periodicky se opakující děje v organismu jsou řízeny biologickými hodinami. O biologickém oscilátoru neboli pacemakeru můžeme hovořit pouze v případě, že daný rytmus přetrvává i v neperiodických podmínkách. Ve skutečnosti ale mají cirkadiánní hodiny téměř všechny organismy citlivé na světlo, od cyanobakterií po člověka (Schibler, 2005).

2.1.1. Cirkadiánní rytmy

Největší pozornost je věnována rytmům cirkadiánním (z lat. circa = přibližně, dies = den). Jejich název vystihuje skutečnost, že neběží s periodou přesně, ale pouze přibližně, 24-hodinovou, a to s $\tau = 20 - 28$ hod. Její délka je poměrně přesně dána druhově i geneticky, např. u myši trvá průměrně 23,4 hod, u potkana 24,5 hod a u člověka mezi 24,2 – 25 hod. To znamená, že pohybová aktivita myši držené v nepřirozených, neperiodických podmínkách (stále tmě) by každý den začínala o něco dřív, přibližně o 20 minut, než předešlý den. V přírodě je však tato vnitřní perioda τ trvale přizpůsobována 24hodinovému dni pomocí vnějších synchronizátorů. Nejdůležitějším z nich je střídání světla a tmy, přičemž větší vliv má doba světla. Dalšími synchronizátory jsou pravidelný příjem potravy, teplota okolního prostředí, sociální faktory (Hastings, 1997). Tyto synchronizátory se obecně nazývají Zeitgeber.

Světelný režim, kterému jsou organismy vystaveny, označujeme zkratkou LD x:y (z anglického light-dark), kde x značí dobu světelné fáze v hodinách a y dobu tmavé fáze. DD potom označuje podmínky stálé tmy a LL stálého světla. Subjektivní čas vnímaný živočichem, který je držený v neperiodickém prostředí, označujeme jako čas cirkadiánní, CT. CT0 – CT12 označuje subjektivní den, CT12 – CT24 označuje subjektivní noc.

2.2. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM

Nedílnou součástí cirkadiánního systému jsou kromě centrálního oscilátoru, generujícího shora uvedené rytmy, také dráhy vstupní a výstupní. Vstupní dráhy jsou nezbytné pro synchronizaci oscilátoru s periodou vnějšího prostředí, dráhy výstupní pak pro tvorbu pozorovatelných cirkadiánních rytmů. Dále je v těle mnoho periferních oscilátorů, které také vytváří oscilace a jsou suprachiasmatickým jádrem synchronizovány.

2.2.1. Suprachiasmatická jádra

Pacemaker čili centrální oscilátor je tvořen specializovanou strukturou, u obratlovců často uloženou v oblasti mezimozku: u ryb a plazů jde o epifýzu, u obojživelníků o sítnici (retinu), u ptáků o epifýzu i retinu a u savců o suprachiasmatická jádra hypotalamu.

Suprachiasmatická jádra hypotalamu (nucleus suprachiasmaticus, SCN) jsou párový orgán nacházející se po obou stranách spodní části třetí mozkové komory nad optickým chiasma. Každé z jader je tvořeno 8 000 – 10 000 drobných neuronů. Morfologicky i funkčně lze jádra rozlišit na dvě části: dorsomediální (dmSCN) a ventrolaterální (vlSCN), které mezi sebou komunikují množstvím synapsí (Leak *et al.*, 1999). Dorsomediální část, jinak také nazývána shell, se vyznačuje hlavně produkcí arginin vasopresinu (AVP), zatímco pro část ventrolaterální, core, je typický především vasoaktivní intestinální peptid (VIP). Většina neuronů SCN produkuje jako neurotransmitter také kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) (van den Pol, 1980; Abrahamson *et al.*, 2001; Albus *et al.*, 2005).

2.2.2. Vstupní a výstupní dráhy z SCN

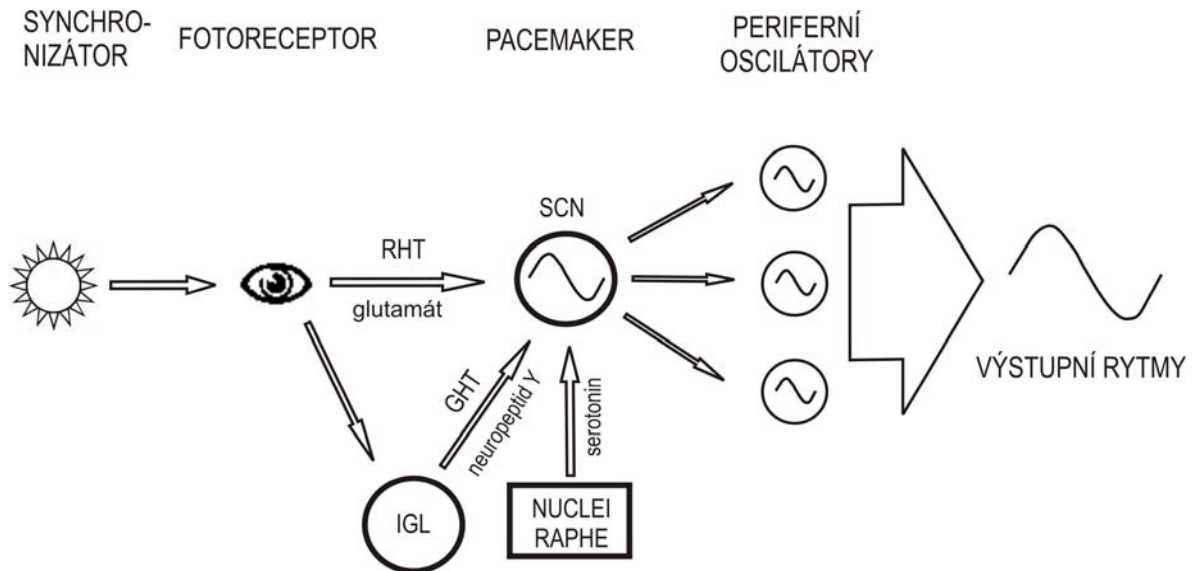
Vstupní dráhy do SCN představují především tři hlavní cesty vedoucí do jeho ventrolaterální části. Nejdůležitější z nich je retinohypotalamický trakt (RHT), který předává přímo do SCN světelné informace ze sítnice (Gooley *et al.*, 2001; Albus *et al.*, 2005). Je tvořen dendrity gangliových buněk a odděluje se z optického nervu nad chiasma opticum. Hlavní neurotransmitter této dráhy je glutamát, který se váže na N-metyl-D-aspartátové receptory (NMDA).

Druhá cesta vycházející z retiny je nepřímá a vede přes intergenikulární lístek talamu (IGL), odkud pokračuje jako genikulohypotalamický trakt (GHT) do vlSCN. V intergenikulárním lístku se integrují informace ovlivňující SCN jak světelného, tak hlavně nesvětelného charakteru. Hlavní signalizační molekulou v GHT je neuropeptid Y (NPY).

Třetí, také nepřímá dráha začíná v raphe nucleí, části středního mozku. Touto cestou přichází do vlSCN opět především podněty nesvětelného charakteru, podněty světelné mají funkci spíše modulační. Hlavní molekulou předávající informace mezi neurony je na této cestě serotonin (Sumová *et al.*, 1996).

Výstupní dráhy z SCN směřují jak do dalších částí mozku a do míchy, tak do periferních orgánů. V mozku vedou tyto dráhy zejména do oblasti mezimozku, do hypotalamu a talamu (Abrahamson *et al.*, 2001). Signál je pravděpodobně přenášen pomocí AVP a kyseliny γ -aminomáselné (GABA). Snížení elektrické aktivity v SCN totiž koreluje se sníženým uvolňováním GABA. Tímto způsobem SCN mimo jiné ovlivňuje tvorbu melatoninu v epifyze a informuje tak celé tělo o vnějších světelných podmínkách.

Melatonin je totiž na základě noradrenalinového signálu tvořen v noci, naopak ve dne je jeho hladina nízká (Illnerová et Vaněček, 1985, Illnerová et Vaněček, 1988).



Obr. 1: Schéma cirkadiálního systému savců. RHT – retinohypotalamický trakt, IGL – intergenikulární listek, GHT – genikulohypotalamický trakt, SCN – suprachiasmatická jádra. Uvedeny jsou pouze hlavní neurotransmitery synchronizačních drah. Zpracováno dle údajů z literatury.

2.2.3. Synchronizace buněk v SCN

SCN je nezbytné pro tvorbu cirkadiálních rytmů, které přetrvávají i v prostředí, kde není přítomna žádná vnější synchronizace. Je zajímavé, že když jeho buňky pěstujeme *in vitro* v disperzní kultuře, každá osciluje ve vlastní fázi rytmu, i dva neurony vedle sebe mohou být v opačné fázi. A to i přes množství synapsí, kterými jsou propojeny. Z toho vyplývá, že oscilátorem je vlastně každá buňka. Aby SCN mohlo generovat navenek jednoznačný rytmus, musejí být neurony navzájem synchronizovány (Welsh *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 2003). Nejpravděpodobnější se zdá být možnost synchronizace pomocí neurotransmiteru a to GABA, jelikož je exprimován ve většině (ne-li ve všech) buňkách SCN (Van den Pol, 1993; Albus, 2005). V úvahu připadá ale i možnost synchronizace pomocí VIP. Pro tuto možnost hovoří především to, že VIP je tvořený v neuronech ventrolaterálního SCN, které přijímá světelné informace ze sítnice, a synchronizuje neurony v dorsomediální části SCN. To souvisí s hustými projekcemi z vlSCN

do dmSCN, zatímco projekce v opačném směru jsou velmi vzácné. Výhodou tvorby rytmů v SCN pomocí multioscilačního systému založeného na vzájemné komunikaci mezi buňkami je, že neurony jsou nejen usměrňovány do správné fáze, ale také je velmi snížena variabilita v dlouhodobém udržování délky periody a to mnohem lépe než jedním samotným neuronem (Liu *et al.*, 1997; Aton et Herzog, 2005). Určitá usměrňená fáze generovaná

v SCN je tedy výsledkem jak působení vnitřního synchronizátoru (GABA, VIP), tak fázově závislou odpovědí na světlo a další vnější podněty (pomocí glutamátu, NPY nebo serotoninu). Správná funkce SCN vyžaduje přesnou koordinaci mezi intercelulárními synchronizujícími procesy a intracelulární tvorbou rytmicity (Liu et Reppert, 2000).

2.2.4. Periferní oscilátory

Dlouhou dobu byla za jedinou strukturu v těle, která obsahuje cirkadiální hodiny, považována vedle SCN pouze sítnice. S objevem hodinových genů však nastal průlom i v této oblasti. Bylo zjištěno, že k rytmické expresi hodinových genů dochází kromě SCN i v mnoha dalších orgánech. Patří mezi ně například játra, plíce, srdce, kosterní svaly, varlata a další periferní tkáně. Dříve se předpokládalo, že tvorba rytmů je v těchto orgánech pod přímou kontrolou suprachiasmatického jádra a že po jeho odstranění dochází k postupnému utlumování činnosti jednotlivých oscilátorů (Reppert et Weaver, 2001). Později však bylo prokázáno, že každý z periferních orgánů je samostatným oscilátorem schopným zachovávat rytmicitu i v nepřítomnosti SCN. V tom případě však dochází k desynchronizaci periferních oscilátorů. Z toho vyplývá, že suprachiasmatická jádra fungují jako jejich synchronizátor (Yoo *et al.*, 2004). Zatím však není zcela jasné, jakým způsobem k synchronizaci dochází, pravděpodobně se jedná o humorální i nervovou cestu. Rytmická exprese je v těchto orgánech oproti expresi v SCN fázově opožděna, obvykle o 3 až 9 hodin. Periferní oscilátory mohou být kromě světla významnou mírou synchronizovány i příjmem potravy. Při fázové změně vnějšího světelného režimu (předběhnutí či zpoždění) dochází k synchronizaci SCN mnohem rychleji než periferních oscilátorů (Yamazaki *et al.*, 2000). Výzkumy také naznačují, že mechanismus regulace exprese hodinových genů je v periferní orgánech do určité míry odlišný od mechanismu v SCN.

2.2.5. Epifýza a melatonin

Důležitou a nepostradatelnou součástí biologických hodin je bezesporu melatonin. Tato látka je tvořena v epifýze (šišince), která je stejně jako další periferní orgány pod přímou kontrolou SCN. Melatonin představuje zejména převodní článek ze signálu neuronálního na humorální (Illnerová et Vaněček, 1980). Tato nízkomolekulární látka je u savců tvořena z aminokyseliny tryptofanu. Nejdůležitějším enzymem této dráhy je arylalkyl-N-acetyltransferáza (AA-NAT). Rytmus v její hladině je řízen přímo SCN a zaujímá klíčový krok při tvorbě melatoninu. V noci, kdy je její hladina vysoká, výrazně stoupá i hladina melatoninu, naopak během dne hladina klesá (Illnerová et Vaněček, 1988). Bylo zjištěno, že melatonin není tvořen pouze u obratlovců, ale také u bezobratlých, u vyšších rostlin i jednobuněčných řas. Ve všech organismech se navíc tvoří převážně či výhradně ve tmě (ať jde o denní nebo noční živočichy) a je tedy jakýmsi signálem noci. Rytmická tvorba melatoninu leží na jedné z výstupních cest biologických hodin, může však zpětně ovlivňovat i jejich chod. V SCN totiž byla nalezena místa, která jej specificky váží (Vaněček *et al.*, 1987). Účinků, které by na organismus mohl melatonin mít, bylo vysloveno již velmi mnoho. Provéřit se však podařilo pouze některé z nich. Hlavní úlohou je informovat tělo o vnitřním čase biologických hodin, např. pokles jeho koncentrace v krvi velmi úzce souvisí s koncem subjektivní noci. Může však vnitřní hodiny i nastavovat a synchronizovat - podání melatoninu zvečera způsobuje předběhnutí biologických hodin, podání v ranních hodinách jejich zpoždění. Díky tomu, že je melatonin tvořen jen v noci, informuje délka jeho signálu organismus o roční době. V zimě, kdy jsou noci dlouhé, je melatoninový signál dlouhý, v létě, kdy jsou noci krátké, je naopak krátký (Illnerová *et al.*, 1984; Hastings *et al.*, 1987). Tím dává živočichům signál buď pro počátek či konec reprodukční aktivity. V poslední době se nahromadilo mnoho informací i o jeho rozmanitých farmakologických účincích, avšak většina z nich zatím nebyla přesvědčivě dokázána. Zde jsou některé z nich: podávání melatoninu podporuje imunitu, odstraňuje volné radikály – působí jako antioxidant a tím má i ochranné účinky proti rakovině, zpomaluje stárnutí atd (Reiter, 2003; Reiter *et al.*, 2004). Jak už bylo řečeno, pro tyto účinky zatím chybí přesvědčivý důkaz. V některých případech se však jeho umělé podávání zdá být již jen otázkou času: např. k rychlé adaptaci cestujících letadlem na nový vnější čas, synchronizaci slepých osob s 24hodinovým dnem či ke zlepšení kvality spánku u starších osob trpících nespavostí (Hastings, 1997; Illnerová 1996).

2.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ

2.3.1. Obecné schema

Od objevení suprachiasmatického jádra, centrálního oscilátoru, roku 1972, se hlavní směr výzkumu zaměřil na poznání samotné podstaty tvorby rytmů. Poznání, že přidáním inhibitoru proteinové syntézy dojde k utlumení rytmicity, narozdíl od aplikace inhibitoru Na⁺ kanálů, tetrodotoxinu, která na ni nemá vliv, vedlo k závěru, že tvorba rytmů není spojena se synaptickou aktivitou neuronů, ale je závislá na intracelulárních biochemických pochodech. Díky rozvoji metod molekulární biologie bylo dosud objeveno několik genů zodpovědných za tvorbu cirkadiánních rytmů, které byly nazvány geny hodinovými. Podstata vzniku cirkadiánních oscilací je založena na mechanismu transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky (Dunlap, 1999; Reppert et Weaver, 2001; Okamura *et al.*, 2002; Hastings et Herzog, 2004). Ta se skládá z pozitivních a negativních elementů. Negativní faktory jsou představovány proteiny, které zpětně inhibují svoji vlastní transkripci, pozitivní faktory transkripci hodinových genů (negativních elementů) naopak stimulují. Na tomto principu je založena tvorba rytmů u všech živočichů, s evolucí však stoupá složitost tohoto mechanismu. Proto je třeba v názvu genu uvádět, ze kterého živočišného druhu pochází, a to pomocí prvních písmen z anglických názvů (mPer - mouse, rPer - rat, hPer - human...). Proteiny těchto genů jsou označovány velkými písmeny (PER). V následujícím textu se budu zabývat geny savčími, především myšimi a potkaními. Mezi nejvýznamnější hodinové geny patří: Clock a Bmal1 jakožto pozitivní elementy, tři geny Per (Per1, Per2, Per3) a dva geny Cry (Cry1, Cry2) tvořící negativní elementy a další, jako Kasein kináza Iε, Rev-Erbα, geny skupiny Ror, Dec1 a Dec2.

2.3.2. Charakteristika hodinových genů

Regulační domény proteinů kódovaných hodinovými geny

Interakce pozitivních a negativních elementů s hodinovými geny, případně těchto proteinů mezi sebou se uskutečňují pomocí několika strukturních motivů. Ty jsou společné jak pro většinu proteinů cirkadiánního systému, tak pro různé druhy organizmů. Jedním z nich je tzv. PAS doména (PAS je akronym názvů tří proteinů, u kterých byla tato

doména poprvé objevena). Je tvořena zhruba 270 aminokyselinami a obsahuje dvě repetitivní struktury PAS-A a PAS-B, které umožňují tvorbu homo- či heterodimerů. Tyto proteinové dimery mohou mít různou funkci, např. regulaci transkripce (Huang *et al.*, 1993).

Pro pozitivní elementy je společná bHLH (basic helix-loop-helix) doména. PAS-PAS dimerům umožňuje rozeznávat a vázat tzv. E-boxy (5'-CACGTG-3'), specifické sekvence v promotorech genů, jejichž transkripci aktivuje (Hao *et al.*, 1997).

Hodinový gen Clock

Název tohoto genu byl vytvořen z prvních písmen slov „*c*ircadian *l*ocomotor *o*utput *c*ycles *k*aput“, což do jisté míry vystihuje jeho funkci. Patří mezi transkripční faktory s DNA vazebnou doménou typu bHLH a dimerizační PAS doménou (King *et al.*, 1997). Exprese mRNA tohoto genu ani tvorba proteinu v SCN nevykazuje rytmicitu anebo jen velmi slabou (Sumová *et al.*, 2003). Z toho plyne, že pro vznik cirkadiánní rytmicity je potřeba jeho interakce s dalším transkripčním regulátorem. Avšak u homozygotních Clock mutantů dochází ve stálé tmě ke ztrátě rytmicity (Reppert et Weaver, 2001). Mutantní protein CLOCK totiž není schopen aktivovat transkripci a tím dochází k výraznému snížení amplitudy exprese ostatních hodinových genů (Per, Cry, Bmal1). Až do nedávna byl proto funkční gen Clock považován pro funkci cirkadiánního systému za nepostradatelný. V poslední době však byla nezbytnost proteinu CLOCK pro funkci cirkadiánních hodin zpochybněna. Bylo prokázáno, že i u CLOCK deficientních myši nepřestává transkripčně-translační smyčka fungovat a zvířata nadále vykazují rytmicitu v pohybové aktivitě (Debruyne *et al.*, 2006). To by mohlo být vysvětleno nalezením transkripčního faktoru NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2), jehož primární aminokyselinová sekvence je proteinu CLOCK velmi podobná. NPAS2 je schopen protein CLOCK funkčně nahradit a spolupodílet se tak na regulaci cirkadiánní rytmicity (Debruyne *et al.*, 2007).

Hodinový gen Bmal1

Název genu Bmal1 je odvozen od „*b*rain and *m*uscle *A*rnt-like protein“. Pomocí PAS domény tvoří protein BMAL1 dimery s proteinem CLOCK. Ty se vážou na E-box v oblasti promotoru a působí jako aktivátor transkripce dalších hodinových genů (Per a Cry) (Gekakis *et al.*, 1998). Exprese genu Bmal1 v SCN vykazuje výrazný rytmus, s maximální hladinou během subjektivní noci a minimální během dne (Abe *et al.*, 1998).

Gen *Bmal1* je pro cirkadiánní hodiny nezbytný a jeho mutace způsobuje ve stálé tmě okamžitou ztrátu rytmicity (Bunger *et al.*, 2000).

Hodinové geny Period

U savců byly identifikované tři geny *Period*: *Per1*, *Per2* a *Per3*. Introny těchto genů obsahují E-box sekvence, na které se váží regulátory jejich transkripce. Proteiny těchto genů obsahují PAS domény, pomocí nichž dimerizují s dalšími PER proteiny. Interakcí s proteiny CRY mohou vznikat i heterodimery. Tím jsou jednak PER proteiny chráněny před ubiquitinizací a následnou degradací a jednak tyto heterodimery jednodušeji pronikají do jádra, kde inhibují vlastní transkripci (Kume *et al.*, 1999). Protein genu *Per1* by mohl být zodpovědný za přenos světlem indukovaných změn ve fázi na molekulární úroveň (Shigeyoshi *et al.*, 1997). Hladiny *Per* mRNA mají výrazný cirkadiánní rytmus s maximem během subjektivního dne (Shearman *et al.*, 1997). Mutace genu *Per1* způsobuje ve stálé tmě zkrácení periody, mutace *Per2* ztrátu rytmicity a mutace *Per3* nemá na rytmicitu žádný účinek. To naznačuje, že *Per3* není pro cirkadiánní hodiny nezbytný a pravděpodobně nejde o gen účastnící se vlastní tvorby oscilací (Shearman *et al.*, 2000b).

Především v poslední době se hromadí důkazy, že geny *Per* (a pravděpodobně i další hodinové geny) hrají zároveň důležitou roli při vzniku nádorového bujení. Podílejí se totiž na regulaci genů buněčného cyklu a genů tumorové suprese. Myši s mutací v genu *Per2* vykazují výrazně vyšší výskyt vzniku nádorů. Dochází u nich ke ztrátě p53 zprostředkované apoptózy a poruchám regulace genů jako např. *c-Myc* a cyklinů. Proteiny *PER1* a *PER2* navíc interagují s proteiny kontrolních bodů buněčného cyklu (*ATM*, *Chk2*). Ztráta nebo špatná regulace genů *Per1* a *Per2* byla zjištěna i v mnoha lidských nádorech (Gery *et al.*, 2006; Chen-Goodspeed et Lee, 2007).

Hodinové geny Cryptochrome

U savců byly nalezeny dva geny *Cryptochrome*, *Cry1* a *Cry2*. *Cry1* je exprimován rytmicky s maximem během subjektivního dne, *Cry2* vykazuje jen velmi slabou rytmicitu. Mutace genu *Cry1* způsobuje ve stálé tmě zkrácení periody, mutace genu *Cry2* prodloužení periody a mutace obou těchto genů okamžitou ztrátu rytmicity. Ve zpětnovazebné smyčce cirkadiánních hodin fungují tyto geny jako negativní regulátory – heterodimery s PER proteiny inhibují *CLOCK/BMAL1* aktivovanou transkripci (Kume *et al.*, 1999; Reppert et Weaver, 2001).

Kasein kináza Iε

Tato serin/treoninová protein kináza je důležitým regulačním enzymem zpětnovazebné smyčky. Neúčastní se přímo regulace transkripce, nýbrž fosforyluje proteiny PER a CRY (Vielhaber *et al.*, 2000). Tím zvyšuje míru ubiquitinizace a napomáhá tak jejich degradaci v proteazomu. První známá cirkadiánní mutace u savců byla způsobena právě poškozením lokusu kodujícího CKIε (Ralph et Menaker, 1988). *Tau* mutantní křečci mají zkrácenou délku periody. Mutace *tau* totiž zeslabuje aktivitu CKIε, což vede k hypofosforylaci proteinů PER a CRY a tím snížení jejich degradace. To vede k jejich rychlejšímu nahromadění v buňce a tak i ke zkrácení cirkadiánní periody. Podobný základ má i autosomálně dědičná lidská porucha ASPS (advanced sleep phase syndrome). U postižených jedinců se totiž objevuje mutace genu *Per2* v místě, na které se váže CKIε. Tím dochází k hypofosforylaci kasein kinázou Iε a následnému zkrácení cirkadiánní periody. Spolu s posunem cirkadiánní fáze dopředu to způsobuje, že se tito lidé budí velmi brzy ráno a usínají již zvečera (Toh *et al.*, 2001).

Hodinový gen Timeless

Zatímco u *Drosophily* bylo prokázáno již poměrně dávno, že gen *Timeless* (*Tim*) je pro funkci cirkadiánního systému nezbytný, role savčího genu *Tim* není zatím úplně jasná. Zdá se totiž, že u savců přebraly většinu funkcí proteinu *TIM* proteiny *CRY*. Rytmus v hladině mRNA tohoto genu se podařilo prokázat pouze v LD podmínkách, v DD rytmus zjištěn nebyl (Tischkau *et al.*, 1999). *TIM* proteiny mohou tvořit heterodimery se všemi třemi proteiny *PER*. Trvalá blokáce *TIM* proteinu vede k vymizení elektrické aktivity buněk *SCN* (Barnes *et al.*, 2003). Homozygotní mutanty v genu *Tim* se nepodařilo vypěstovat, což souvisí se skutečností, že je tento gen nepostradatelný pro embryonální vývoj (Gotter *et al.*, 2000).

Hodinový gen Rev-Erba

Gen *Rev-Erba* patří do skupiny jaderných receptorů označovaných jako orphan receptory. V promotoru tohoto genu se nachází několik E-boxů, do kterých se váží transkripční faktory a regulují tak jeho transkripci. Pomocí heterodimeru *CLOCK/BMAL1* je aktivována, pomocí proteinů *PER* a *CRY* inhibována (Triqueneaux *et al.*, 2004). Zároveň může být inhibována i vlastním produktem, proteinem *REV-ERBα*, který se váže na promotor v další regulační oblasti a to v *RevRE* (*Rev-Erba* response element). Na stejné místo se může vázat i další pozitivní regulátor *RORα*, který

transkripci aktivuje (Harding at Lazar, 1993). Exprese genu Rev-Erb α má výraznou cirkadiánní rytmicitu s maximem během subjektivního dne. Protein REV-ERB α negativně ovlivňuje transkripci genu Bmal1 (Triqueneaux *et al.*, 2004). Velmi podobnou funkci má i další příbuzný gen a to Rev-Erb β .

Hodinové geny skupiny Ror

Geny Ror α , Ror β a Ror γ (retinoic acid-related orphan receptors) patří stejně jako gen Rev-Erb α do skupiny jaderných orphan receptorů. Geny Ror se společně právě s geny Rev-Erb významně podílejí na regulaci transkripce genu Bmal1. Ta je výsledkem kompetice mezi těmito geny. Oba se váží do specifické oblasti v promotoru genu Bmal1 s tím, že zatímco REV-ERB transkripci inhibují, ROR ji aktivují (Guillaumond *et al.*, 2005). V SCN dosahuje exprese Ror α mRNA maxima během subjektivního dne, rytmus Ror β mRNA je nevýrazný a Ror γ mRNA nebyla zaznamenána vůbec. U Ror α mutantů dochází ke ztrátě rytmicity v expresi genu Bmal1 a zkrácení periody rytmu, Ror β mutanti mají poruchy v koordinaci pohybů a prodlouženou periodu (Sato *et al.*, 2004).

Hodinové geny Dec1 a Dec2

Geny Dec1 a Dec2 patří mezi bHLH transkripční faktory. Inhibují transkripci genu Per1 tím, že soupeří s heterodimerem CLOCK/BMAL1 (který transkripci Per1 aktivuje) o E-box v promotoru Per1 (Honma *et al.*, 2002). Transkripce těchto genů je regulována pomocí E-boxů v jejich promotorech. Dimer CLOCK/BMAL1 ji aktivuje, proteiny PER, CRY a DEC potlačují (Hamaguchi *et al.*, 2004). Exprese Dec1 i Dec2 je rytmická s vrcholem během subjektivního dne. Nesprávná regulace exprese Dec genů pravděpodobně souvisí se změnami v cirkadiánním rytmu a může tak významně přispívat k patogenezi u mnoha onemocnění včetně rakoviny - exprese Dec genů může být totiž ovlivněna podněty vnějšího prostředí a je výrazně zvýšena v nádorové tkáni (Li *et al.*, 2004).

2.3.3. Model molekulárního oscilátoru

Již od objevu prvních hodinových genů se lidé snaží odpovědět na otázku, jakým způsobem se tyto geny podílejí na tvorbě rytmických cirkadiánních oscilací. Na základě studia exprese hodinových genů, funkce, úprav a interakcí jejich proteinů a mutací těchto genů, byly získány výsledky vedoucí k představě o modelu založeném

na zpětnovazebném působení (Reppert et Weaver, 2001). Jeho podstatou jsou dvě vzájemně propojené zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky. Významnou roli hrají rovněž posttranslační modifikace (především fosforylace) a řízená degradace klíčových elementů (ubiquitinace a odbourání v proteasomu). Tímto způsobem vytvářené výrazné oscilace v expresi hodinových genů jsou v každém neuronu suprachiasmatického jádra spráženy a zesíleny. Jednoznačně synchronizované rytmické signály jsou poté rozesílány nejen do celého mozku, ale i do periferních orgánů, které obsahují periferní hodiny (Reppert et Weaver, 2001).

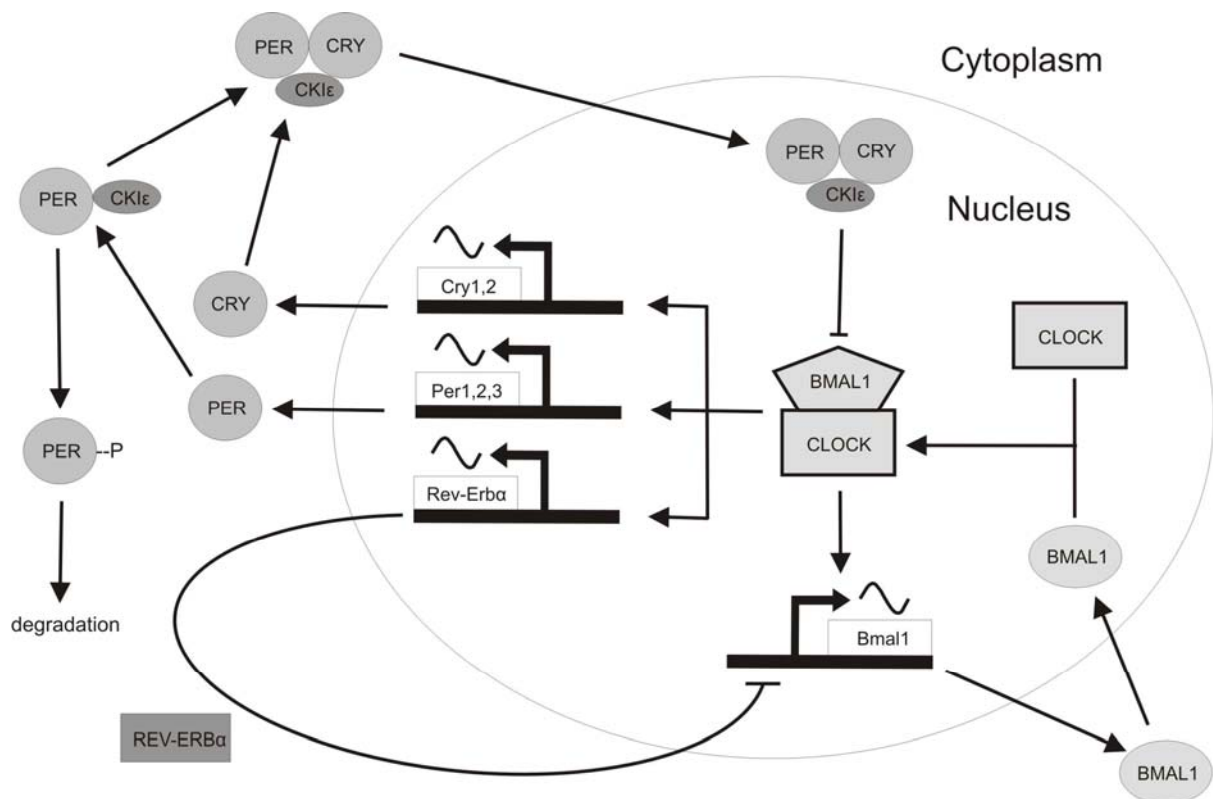
Podstatu první smyčky tvoří dimery CLOCK/BMAL1 a PER/CRY. Heterodimer CLOCK/BMAL1 se po vstupu do jádra váže na E-box genů *Per* a *Cry*, čímž aktivuje jejich přepis. Produkty těchto genů se v cytoplazmě spojují za tvorby dimerů PER/CRY a po fosforylaci kasein kinázou vstupují zpět do jádra, kde inhibují svoji vlastní transkripci (interakcí s CLOCK/BMAL1 heterodimerem). Protein PER2 má však možná i funkci pozitivního regulátoru – v jádře aktivuje transkripci genu *Bmal1* (Yu *et al.*, 2002).

Druhá smyčka je založena na produktech genů *Rev-Erb α* a *Ror*. CLOCK/BMAL1 heterodimer aktivuje transkripci genu *Rev-Erb α* . Po vstupu do jádra působí protein REV-ERB α jako inhibitor transkripce genu *Bmal1*, naopak protein ROR ji aktivuje (Preitner *et al.*, 2002).

Vzájemným propojením těchto dvou transkripčně-translačních smyček vzniká přibližně 24hodinový rytmus v expresi každého z hodinových genů (kromě *Clock*), přičemž se liší fází, kdy jejich hladina dosahuje maxima. Na počátku subjektivního dne výrazně stoupá transkripce genů *Per* a *Cry* a to díky působení aktivátoru CLOCK/BMAL1. V cytoplazmě dochází k translaci mRNA těchto genů. Proteiny PER zde mohou být fosforylovány kasein kinázou, což vede k jejich rychlé ubiquitinizaci a následné degradaci v proteasomu. Zároveň mohou tvořit dimery s proteiny CRY, což naopak brání jejich degradaci a urychluje vstup do jádra, kde jejich koncentrace postupně stoupá až do poloviny subjektivního dne, kdy je nejvyšší (Yu *et al.*, 2002). Heterodimer CLOCK/BMAL1 aktivuje vedle genů *Per* a *Cry* i transkripci genu *Rev-Erb α* . Protein tohoto genu působí negativně na transkripci *Bmal1*, a tak hladina BMAL1 v průběhu dne klesá (Preitner *et al.*, 2002). V důsledku nízké hladiny BMAL1 a současně vysoké hladiny proteinů PER a CRY dochází k inhibici (CLOCK/BMAL1 aktivované) transkripce genů *Per* a *Cry*. PER a CRY proteiny navíc působí negativně na transkripci genu *Rev-Erb α* . Díky poklesu koncentrace jeho proteinu a hlavně pozitivní regulaci pomocí ROR je opět aktivována transkripce *Bmal1*. K translaci dochází o několik hodin později, takže

koncentrace BMAL1 dosahuje maxima během subjektivní noci. Tím se uzavírá celý cyklus, neboť BMAL1 je opět v dostatečné míře k dispozici pro tvorbu dimerů s proteinem CLOCK, které aktivují transkripci Per a Cry.

Z výše uvedeného vyplývá, že pro správné fungování cirkadiálního systému je nezbytná nejen důkladná regulace transkripce, ale i přesně řízená buněčná lokalizace, aktivita a degradace jednotlivých elementů. Důležitou roli při aktivaci transkripce většiny genů hrají i modifikace histonů (acetylace, metylace, fosforylace...). Největší význam má acetylace, která míru přepisu zvyšuje, zatímco deacetylace ji snižuje (Naruse *et al.*, 2004).



Obr. 2: Schéma tvorby cirkadiálních oscilací. Pro větší přehlednost jsou některé hodinové geny vynechány. Zpracováno dle údajů z literatury.

Donedávna se předpokládalo, že výše popsany model cirkadiálního oscilátoru, založený na transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčlách, vystihuje princip tvorby cirkadiálních oscilací. V poslední době se však ukazuje, že podstata cirkadiálních

hodin je pravděpodobně složitější a její nedílnou součástí jsou i další mechanismy. Jedním z nich jsou microRNA (miRNAs). Tyto krátké, nekódující transkripty se podílejí na posttranskripční regulaci genů a to buď repressí translace nebo degradací mRNA. V suprachiasmatických jádrech byly nalezeny dvě miRNA (miR-132 a miR-219), které jsou schopné ovlivňovat molekulární oscilátor. miR-219 patří mezi hodinami kontrolované geny a hraje významnou roli v regulaci délky cirkadiálního dne. Je exprimována rytmicky, ve stejné fázi jako geny *Clock* a *Bmal1* a na jejich dimer se váže. Myši s knock-downem miR-219 mají výrazně prodlouženou délku cirkadiální periody. miR-132 je světlem indukovatelná a k její expresi dochází rovněž rytmicky. Ovlivňuje expresi hodinových genů a především zeslabuje účinek světla na posun fáze rytmu. Jak miR-219 tak i miR-132 jsou navíc schopné působit na buněčnou excitabilitu a i díky tomu regulují cirkadiální oscilátor i jeho synchronizaci (Cheng *et al.*, 2007).

Další, až v poslední době objevenou, nedílnou součástí molekulárního oscilátoru je pravděpodobně signalizace pomocí adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP). Koncentrace cAMP vykazuje cirkadiální rytmus a je řízena cirkadiálním oscilátorem. Zároveň však podporuje tvorbu zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček v centrálním oscilátoru – pomáhá udržovat správnou amplitudu, fázi a periodu (O'Neill *et al.*, 2008).

Ukazuje se, že důležitou funkci při tvorbě cirkadiálních oscilací má i cílená degradace proteinů. FBXL3, což je do F-box rodiny patřící ubiquitin E3 ligasa, se váže na proteiny CRY a tím zapříčiňuje jejich degradaci. Myši s mutací v genu pro FBXL3 mají prodlouženou cirkadiální periodu. FBXL3 se totiž nemůže vázat na proteiny CRY, ty nejsou odbourávány a díky tomu déle inhibují transkripci dalších hodinových genů – dochází k prodloužení negativní smyčky cirkadiálního oscilátoru. Cílená degradace tedy pravděpodobně ovlivňuje jak rychlost, kterou se hodinové proteiny hromadí v cytoplasmě, tak i rychlost jejich degradace (Siepková *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2007).

2.3.4. Hodinami kontrolované geny

Pomocí mechanismu transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček, popsaného v předchozí kapitole, jsou v neuronech SCN vytvářeny výrazné, přesně určené a pravidelné rytmy dané aktivitou hodinových genů. Informace o těchto oscilacích je však třeba z centrálního molekulárního oscilátoru předávat dál, do celého organismu. To zajišťují právě hodinami kontrolované geny (clock-controlled genes, CCGs). Vyznačují se

tím, že jsou rytmicky regulované (buď přímo hodinovými geny nebo nepřímo pomocí transkripčních faktorů) a mohou dokonce centrální pacemaker částečně ovlivňovat, avšak na rozdíl hodinových genů nejsou pro jeho funkci nepostradatelné. Informaci o výstupních rytmech předávají do těla pomocí signálů například biochemických (aktivita enzymů) nebo elektrochemických (neuronální aktivita).

Mezi nejlépe prostudované hodinami kontrolované geny patří gen pro DBP, gen pro AVP a gen pro arylalkyl-N-acetyltransferázu (AA-NAT).

Protein vázající D-element albuminu (DBP, albumin D-element binding protein) patří, spolu s dalšími hodinami kontrolovanými geny TEF (thyroid embryonic factor) a HLF (hepatocyte leukemia factor), mezi PAR/bZip transkripční faktory. To znamená, že tyto proteiny obsahují jednak tzv. PAR doménu (sekvenci bohatou na prolin a kyselé aminokyseliny) a jednak DNA vazebnou doménu typu bazického leucinového zipu (bZip). DBP je rytmicky exprimovaný nejen v SCN, ale i v periferních orgánech. Jeho transkripce je aktivována CLOCK/BMAL1 heterodimerem (vázajícím se na E-box) a inhibována proteiny a CRY1, CRY2 a PER3. Z toho vyplývá, že je rytmicky exprimován ve stejné fázi jako geny *Per* a *Cry* (Yamaguchi *et al.*, 2000). DBP ovlivňuje mnoho procesů, mimo jiné pohybovou aktivitu či expresi jaterních enzymů. Homozygotní mutanti v genu pro DBP se vyznačují zkrácením periody rytmu a snížením pohybové aktivity.

Protein E4BP4 (E4 binding protein 4), který také patří mezi hodinami kontrolované geny, je proteinu DBP příbuzný, exprimován je však v opačné fázi. To je způsobeno tím, že jeho expresi ovlivňuje REV-ERB α . E4BP4 a DBP se společně podílejí na regulaci transkripce mnoha genů, např. genu nezbytného pro metabolismus tuků nebo i genu *Per1*. Poslední výzkumy navíc naznačují, že E4BP4 by mohl fungovat jako jeden z klíčových negativních regulátorů centrálního cirkadiálního oscilátoru (Ohno *et al.*, 2007).

Dalším hodinami kontrolovaným genem je gen kódující AVP. V SCN je rytmicky exprimován převážně v neuronech dorzomedilární části, produkují jej ale i buňky v dalších částech hypothalamu. AVP je neuropeptid významný tím, že v těle pomáhá regulovat rovnováhu vody a solí. Podílí se totiž na řízení rytmické produkce kortikosteronu z kůry nadledvin a to regulací hypothalamus-hypofýza-nadledvinové dráhy. Zároveň má AVP i mnoho funkcí jako neurotransmitter v nervovém systému. Nejdůležitější z nich je rytmická regulace elektrické aktivity buněk SCN. Tu v době subjektivního dne výrazně zvyšuje působením na V1a receptory, což vede k zesílení výstupních signálů z SCN (Ingram *et al.*, 1998). Mutace genu pro AVP tím pádem vede ke snížené amplitudě v rytmu pohybové

aktivity a zvýšení fragmentace rytmů. Exprese genu pro AVP je aktivována heterodimerem CLOCK/BMAL1, inhibována je naopak PER a CRY proteiny.

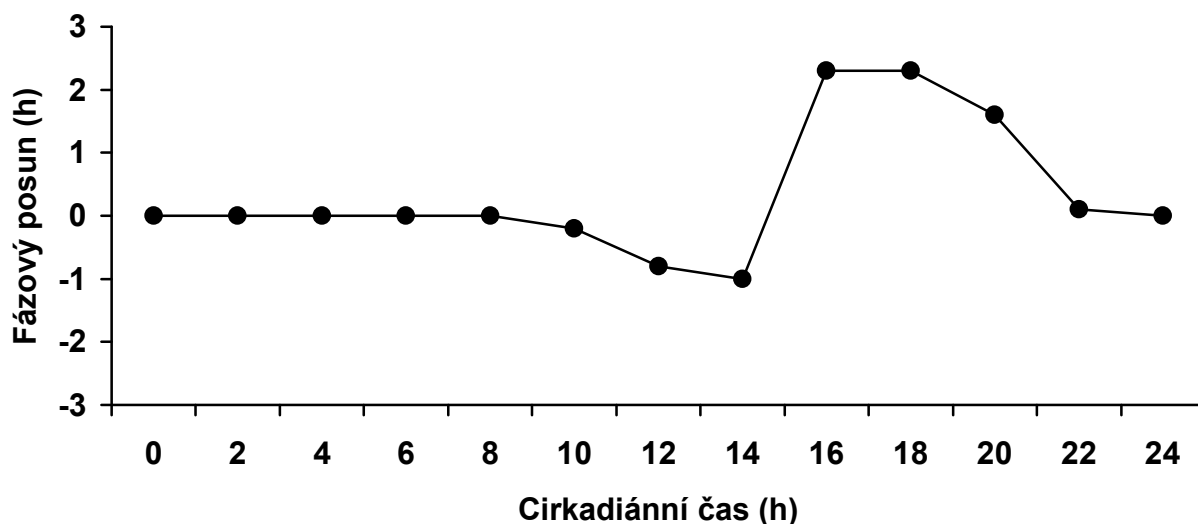
Mezi geny kontrolované hodinami patří také gen pro AA-NAT. Tento enzym představuje klíčový prvek v dráze syntézy melatoninu (Klein *et al.*, 1970). Jeho aktivita v retině a epifýze má výrazný cirkadiánní rytmus, s maximem během subjektivní noci (Illnerová et Vaněček, 1980).

2.4. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

2.4.1. Světelná synchronizace

Pro správnou funkci cirkadiánního systému je nezbytná jeho každodenní synchronizace s vnějším prostředím. Rytmus, který generuje, musí běžet jak s 24-hodinovou periodou solárního dne, tak v přesně určené fázi. Nejdůležitějším synchronizátorem je bezesporu pravidelné střídání světla a tmy. Tento fakt byl zkoumán mnoha pokusy, při nichž byl určitý organismus vypuštěn do stálé tmy a následovně vystaven krátkému světelnému pulzu, jehož vliv na fázi cirkadiánního rytmu byl sledován. Velikost fázového posunu jako funkci doby, kdy k aplikaci světelného podnětu došlo, shrnuje tzv. fázově responzní křivka (phase response curve, PRC). Z jejího průběhu je zřejmé, že velikost a směr fázových posunů se v různou denní dobu liší, a to víceméně shodným způsobem u většiny organismů. Všeobecně tedy platí, že světelný pulz během subjektivního dne nevyvolá žádný posun fáze rytmu, světelný pulz v první polovině subjektivní noci způsobí fázové zpoždění, světelný pulz ve druhé polovině subjektivní noci naopak fázové předběhnutí (Daan et Pittendrigh, 1976). V přírodě však organismy nejsou synchronizovány jedním světelným pulzem. Pro živočichy noční je zásadní úsvit a soumrak, pro denní celá světlá část dne neboli fotoperioda.

Zajímavé je srovnání citlivosti ke světlu cirkadiánního systému a systému zrakového. Pro odpověď cirkadiánního systému (posun fáze) je totiž nutná daleko vyšší světelná intenzita než ta, která je potřeba pro zprostředkování zrakového vjemu. To je důležité proto, aby k fázovým posunům nedocházelo i v důsledku slabých přírodních světelných zdrojů, např. měsíčního světla (Nelson et Takahashi, 1991).



Obr. 3: Fázově responzní křivka (PRC) znázorňující vliv světelného pulzu aplikovaného v určitou dobu (osa x) na velikost fázového posunu (osa y). Fázová předběhnutí jsou vynesena jako kladné a fázová zpoždění jako záporné hodnoty (upraveno podle Illnerová, 1988).

2.4.2. Světlem ovlivněná indukce hodinových genů

Informace o světelném stimulu zachycená retinou putuje retinohypotalamickým a genikulohypotalamickým traktem do SCN, kde způsobí vybití glutamátu (Meijer et Schwartz, 2003). Signalizační dráhy dalšího přenosu této informace se však liší v závislosti na době, kdy ke stimulu došlo. Po světelném pulzu v první polovině noci, který vyvolává fázové zpoždění, aktivuje glutamát N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory. Současně se uvolňuje PACAP, který aktivuje VPAC₂ receptory spřažené s G-proteiny. Následkem toho dochází k uvolnění vápníku přes tzv. ryanodinové receptory, aktivaci calmodulinu a MAP kinázy. Ta fosforyluje CREB (cAMP response element-vazebný protein), který vstupuje do jádra, váže se do oblasti CRE v promotoru genů a tím aktivuje jejich transkripci (Ding *et al.*, 1998).

V případě světelného pulzu ve druhé polovině noci, který způsobuje fázové předběhnutí, dochází k aktivaci NO syntázy a zvýšené produkci oxidu dusného (NO). Ten stimuluje guanylyl cyklázu, což zvýší hladinu cGMP, který aktivuje cGMP-dependentní proteinkinázy. Ty stejně jako v předchozím případě fosforylují CREB, který poté v jádře zahajuje expresi genů (Ding *et al.*, 1998).

Právě popsané signální dráhy mohou díky oblasti CRE v promotoru genů Per1 a Per2 indukovat jejich transkripci (regulační oblast genu Per3 CRE neobsahuje). Tento mechanismus zapříčiněný světelným pulzem během subjektivní noci může být nezávislý na CLOCK/BMAL1 aktivaci (Trávníčková-Bendová *et al.*, 2002). Dochází k němu především ve ventrolaterální části SCN a je spjat s fázovým posunem rytmu. Vliv světelného pulzu na gen Per1 a Per2 se však liší. Indukce genu Per1 je pravděpodobně spojena spíše s fázovým předběhnutím, indukce genu Per2 především s fázovým zpožděním. Osvit v první polovině subjektivní noci aktivuje transkripci genu Per1 i Per2. Hladina Per1 mRNA začíná stoupat ve velmi krátké době, asi po 10 – 30 minutách, zatímco hladina Per2 mRNA až asi po 75 – 180 minutách. Po světelném pulzu ve druhé polovině subjektivní noci dochází k vzestupu pouze Per1 mRNA a to po asi 30 – 60 minutách.

V nedávné době byla vedle CREB zprostředkované odpovědi popsána ještě další, protein kinasa C α (PRKCA) dependentní signální dráha přivádějící informaci o světelném pulzu na úroveň molekulárního oscilátoru. Zatímco CREB ovlivňuje transkripci hodinových genů, PRKCA se účastní regulace molekulárního oscilátoru až na úrovni posttranslační. V důsledku světelného pulzu v první polovině noci dochází k vazbě PRKCA na PER2 protein, čímž dochází jednak k jeho přechodné stabilizaci a jednak k jeho zadržování v cytoplasmě. To má za následek prodloužení negativní smyčky centrálního oscilátoru, opoždění reaktivace smyčky pozitivní a tím pádem fázové zpoždění cirkadiánního oscilátoru (Jakubcakova *et al.*, 2007).

Dříve se předpokládalo, že geny Per1 a Per2 jsou při synchronizaci pacemakeru světelnými pulzy nezbytným prvkem. Další pokusy však ukázaly, že mutanti s cílenou delecí genů Per1 nebo Per2 nemají schopnost synchronizace nijak ovlivněnou. Proto lze předpokládat, že mechanismů světelné synchronizace je více a že některé jsou založené na indukci genů Per1 a Per2 a některé využívají jiné cesty (Bae et Weaver, 2003).

2.4.3. Vliv fotoperiody na cirkadiánní systém

2.4.3.1. Synchronizace fotoperiodou

Jak už bylo řečeno, světlá část dne, fotoperioda, je nejdůležitějším synchronizátorem cirkadiánních rytmů. Její délka se mění v závislosti na ročním období a zeměpisné šířce. V našich polohách (50° s.š.) trvá v době okolo letního slunovratu

(21.-22.6.) přibližně 16 hodin, zatímco v době zimního slunovratu (21.-22.12.) pouze okolo 8 hodin. Organismy zaznamenávají nejen její délku pro každodenní synchronizaci se 24hodinovou periodou, ale zároveň i to, zda dochází k jejímu prodlužování nebo zkracování. To jim slouží jako ukazatel ročního období, podle kterého dokáží regulovat své fyziologické procesy. Zkracování či prodlužování fotoperiody tak například vede ke změnám sexuální aktivity, hmotnosti nebo zbarvení (Follett et Milette, 1982).

Nejvýznamnější roli při přenosu informace o délce fotoperiody do organismu má hormon melatonin. Fotoperioda totiž skrze SCN ovlivňuje mimojiné činnost epifýzy. V ní dochází k noradrenalinem zprostředkovanému zvýšení hladiny cAMP. Ten aktivuje proteinkinázy, které fosforylují protein CREB (cAMP response element-vazebný protein). Jeho fosforylovaná forma vstupuje do jádra, kde se váže do oblasti CRE v promotoru genů, čímž zahajuje jejich transkripci. Mezi geny takto aktivované patří i gen pro AA-NAT, klíčový enzym v dráze tvorby melatoninu (Baler *et al.*, 1997). Ten je v organismu produkován během noci. Délka jeho zvýšené hladiny je závislá právě na délce aktivity AA-NAT. Ta trvá déle na krátké fotoperiodě (LD 8:16), která zhruba odpovídá krátkým zimním dnům, než na dlouhé (LD 16:8), která naopak odpovídá dlouhým letním dnům (Illnerová et Vaněček, 1980). Dlouhá doba vysoké hladiny melatoninu pak například inhibuje vývoj reprodukčních orgánů u hlodavců (Goldman *et al.*, 1984).

Rytmus v tvorbě melatoninu (aktivitě AA-NAT) patří mezi výstupní rytmy cirkadiálního oscilátoru. Dlouho však nebylo jasné, zda fotoperioda ovlivňuje i rytmicitu vlastního pacemakeru. Že tomu tak je, se podařilo dokázat pomocí sledování rytmu ve světelné indukci okamžitého raného genu c-Fos (Sumová *et al.*, 1995a). Interval, kdy je možné světelným pulzem indukovat jeho transkripci, je na krátké fotoperiodě delší než na dlouhé. Dojde-li k náhlé změně fotoperiody z dlouhé (LD 16:8) na krátkou (LD 8:16), trvá přizpůsobení cirkadiálního systému zhruba dva týdny – interval, kdy lze indukovat expresi c-Fos se prodlužuje pozvolna. Naopak jedná-li se o změnu fotoperiody krátké na dlouhou, přizpůsobení pacemakeru je velmi rychlé, nastává během tří dnů (Sumová *et al.*, 1995b).

Fotoperioda tedy ovlivňuje vnitřní rytmicitu centrálního pacemakeru, například rytmus v elektrické aktivitě neuronů SCN, rytmus v expresi arginin vasopresinu i expresi některých hodinových genů. To poté vyvolává změny v regulaci výstupních rytmů, například aktivitě AA-NAT (Sumová *et al.*, 2004).

2.4.3.2. *Vliv fotoperiody na expresi hodinových genů*

Délka dne se v přírodě v průběhu roku mění a organismy jsou nuceny těmto změnám přizpůsobit své chování. Jak již bylo zmíněno, fotoperioda má vliv přímo na centrální oscilátor. Její délka ovlivňuje jak fázi, tak tvar křivky i amplitudu rytmické exprese hodinových genů. Nejlépe je prozkoumán vliv na geny *Per*. Předpokládá se, že světlo přímo reguluje jejich expresi a tím je světelná informace přenášena na molekulární úroveň.

Již první studie prováděné na zlatých resp. džungarských křečcích prokázaly, že délka fotoperiody má zásadní vliv na profily jak *Per1* mRNA (Messenger *et al.*, 1999), tak i *PER1* proteinů (Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000). Vzestup hladiny *Per1* mRNA je vázán na ranní úsvit, na delší fotoperiodě tedy začíná stoupat dříve. Večerní pokles je na délce fotoperiody víceméně nezávislý. Vysoká hladina *Per1* mRNA přetrvává déle na dlouhé fotoperiodě (LD 16:8) než na krátké (LD 8:16) (Sumová *et al.*, 2003). Podobně je vysoká hladina proteinu *PER1* delší na fotoperiodě dlouhé (Sumová *et al.*, 2002). Délka fotoperiody však ovlivňuje i amplitudu rytmu hladiny mRNA. Na krátké fotoperiodě je ve srovnání s dlouhou fotoperiodou větší (Steinlechner *et al.*, 2002; Sumová *et al.*, 2003).

Obdobný vliv má fotoperioda i na expresi genu *Per2* (Tournier *et al.*, 2003).

Bylo prokázáno, že fotoperioda nepůsobí pouze na expresi genů světlem přímo ovlivnitelných (*Per1*, *Per2*), ale má vliv i na hodinové geny, které nejsou světlem přímo indukovatelné (*Cry1*, *Bmal1*, *Clock*) (Sumová *et al.*, 2003).

Exprese genu *Cry1* není, na rozdíl od exprese *Per* genů, na dlouhé fotoperiodě delší. V tomto případě je totiž posunut nejen vzestup hladiny mRNA spojený s ranním úsvitem, ale i její večerní pokles. Fotoperioda tedy neovlivňuje interval vysoké exprese *Cry1*, nýbrž na dlouhé fotoperiodě je celá křivka posunuta o 4 hodiny vpřed oproti profilu exprese na fotoperiodě krátké (Sumová *et al.*, 2003). Z výše uvedeného je zřejmé, že fotoperioda působí na rytmus v hladině exprese *Per1* a *Cry1* mRNA rozdílně. Tím pádem se nabízí otázka, jak je to se současnou dostupností jejich proteinů. Ta je totiž předpokladem pro tvorbu heterodimerů, které působí v cirkadiánním oscilátoru jako negativní regulátor. Zdá se proto pravděpodobné, že za dlouhých dnů je interval, v němž dochází k současné tvorbě proteinu *PER1* i *CRY1*, zkrácen a to díky dřívějšímu poklesu transkripce *Cry1* mRNA. Amplituda rytmu *Cry1* mRNA je (stejně jako u *Per1*) na krátké fotoperiodě větší. Lze pouze předpokládat, že snížená amplituda na dlouhé fotoperiodě je důsledkem právě nestejně fáze produkce proteinů *PER* a *CRY* (Sumová *et al.*, 2004).

I u genu *Bmal1* je fotoperiodou ovlivněná změna exprese vázána na ranní úsvit, v tomto případě se však jedná o pokles hladiny mRNA z vysokých nočních hodnot. Na krátké fotoperiodě (LD 8:16) k němu dochází později než na dlouhé. Vysoká noční hladina *Bmal1* mRNA tedy trvá déle na krátké fotoperiodě. Podobně jako u genů *Per* a *Cry*, i zde je fotoperiodou ovlivněna také amplituda rytmu – v podmínkách krátkého dne je větší než v podmínkách dne dlouhého (Sumová *et al.*, 2003). Na obou fotoperiodách je rytmus v hladině *Bmal1* mRNA v protifázi s *Per* a *Cry* mRNA.

Expresce genu *Clock* je všeobecně považována za nerytmickou, nebo jen velmi slabě (Reppert et Weaver, 2001). Přesto byl na krátké fotoperiodě (LD 8:16) rytmus zaznamenán a to s dlouhým intervalem vysoké hladiny mRNA. Na dlouhé fotoperiodě zjištěn nebyl. To pravděpodobně odráží fakt, že na krátké fotoperiodě dochází u ostatních hodinových genů ke zvětšení amplitudy rytmu. Tato skutečnost by mohla být způsobena větším poklesem hladiny jednotlivých mRNA na krátké fotoperiodě ve srovnání s dlouhou (Sumová *et al.*, 2003).

Subjektivní noc je charakterizována vzestupem exprese genu *Bmal1*, subjektivní den pak vzestupem exprese genů *Per* a *Cry*. Z výše uvedeného vyplývá, že subjektivní noc trvá déle za krátkých (zimních) dnů než za dlouhých (letních). Dále je zřejmé, že informace o délce fotoperiody je zakódována přímo v centrálním oscilátoru. Možnost předvídat délku denního světla poskytuje nočním živočichům (na kterých byla většina pokusů prováděna) bezesporu velkou výhodu. Umožňuje jim jednak správně načasovat dobu probuzení, resp. aktivity a jednak informuje o nadcházejícím ročním období (Sumová *et al.*, 2004).

2.4.3.3. Odlišný vliv fotoperiody na expresi hodinových genů v různých částech SCN

Délka fotoperiody výrazně ovlivňuje expresi hodinových genů v centrálním oscilátoru. Ukazuje se však, že ne ve všech částech suprachiasmatických jader stejným způsobem. Při porovnání exprese myších hodinových genů *Per2*, *Rev-Erba* a hodinami konrolovaného genu *DBP* v rostrální a kaudální části SCN na krátké fotoperiodě, nebyl zaznamenán žádný podstatný rozdíl. Avšak při porovnání jejich exprese na dlouhé fotoperiodě bylo zjištěno, že vrchol exprese mRNA je v kaudální části SCN fázově předběhnout oproti vrcholu exprese v rostrální části. Tato různorodá odpověď jednotlivých částí SCN na délku dne by mohla u živočichů sloužit jako ukazatel ročního období (Hazlerigg *et al.*, 2005). Na základě dalších výzkumů na myších byl navržen model dvou oddělených, ale vzájemně propojených cirkadiálních oscilátorů, které řídí na délce

fotoperiody (tedy době stmívání a úsvitu) závislou aktivitu nočních živočichů. Večerní (E, evening) oscilátor uložený v rostrální části SCN zodpovědný za začátek aktivity a ranní (M, morning) oscilátor uložený v kaudální části SCN zodpovědný za konec aktivity (Johnston, 2005). Pokusy na transgenních myších nesoucích Per1-luciferase reportérský gen potvrdily existenci samostatně oscilujících skupin buněk v rámci suprachiasmatických jader. Oscilace těchto jednotlivých skupin buněk jsou spjaty buď s počátkem nebo koncem aktivity a jejich fázový vztah se mění v závislosti na délce fotoperiody (Inagaki *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2008).

Synchronizace cirkadiálního systému na měnící se délku dne v průběhu roku – fotoperiodu – tedy pravděpodobně úzce souvisí s rozdílnou fází rytmu exprese hodinových genů v různých částech SCN.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

Pro pokusy byly používáni samci myši inbredního kmene C57BL/6J (Velaz, Praha). Zvířata byla krmena standartní laboratorní krmnou směsí a přístup k vodě měla *ad libitum*. Teplota ve zvěřinci byla udržována na 23°C ±2°C. Denní světlo bylo zajištěno 40W zářivkami, intenzita osvětlení se pohybovala mezi 150 a 250 lux, podle umístění chovných klecí. Definovaný světelný režim byl pod kontrolou automatických spínacích hodin. Synchronizace myší na danou fotoperiodu trvala minimálně 4 týdny.

3.2. USPOŘÁDÁNÍ JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ

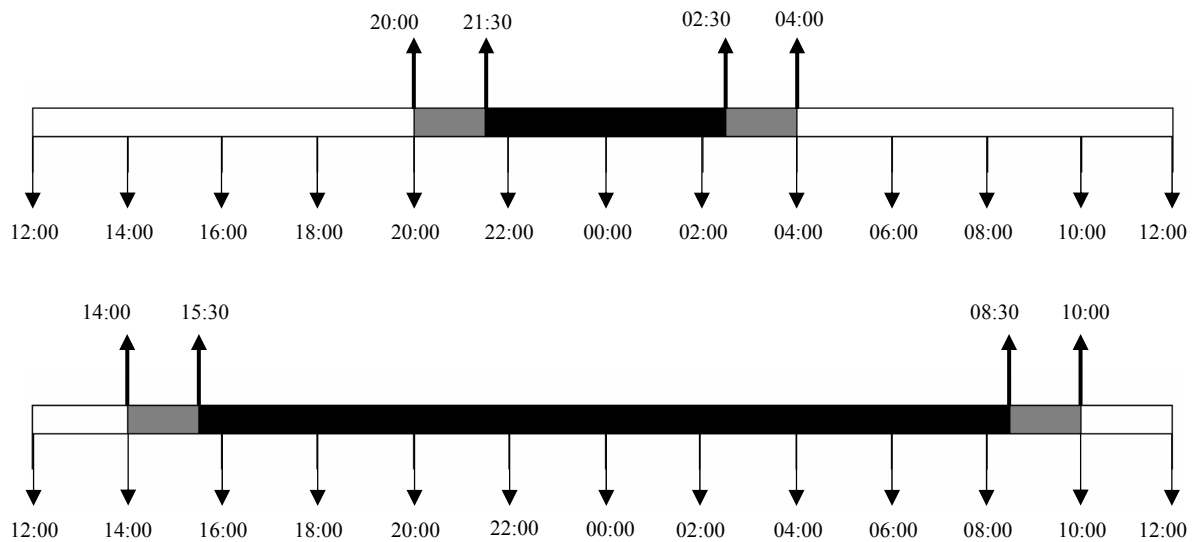
3.2.1. Vliv dlouhé a krátké fotoperiody s náhlým (rectangular) přechodem světlo/tma na tvorbu Per1 a Per2 mRNA a PER1 a PER2 proteinů v SCN

Zvířata byla po dobu 4 týdnů vystavena buď dlouhé fotoperiodě – to znamená 18 hodin světla a 6 hodin tmy (L 18:6) nebo krátké fotoperiodě – 6 hodin světla a 18 hodin tmy (S 6:18). Tma byla na dlouhé fotoperiodě od 21:00 hodin do 3:00, na krátké fotoperiodě od 15:00 do 9:00. V den pokusu byla zvířata vypuštěna do stálé tmy, to znamená, že jim v obvyklý čas nebylo rozsvíceno. V průběhu celého dne byla ve dvouhodinovém intervalu usmrčována.

3.2.2 Vliv dlouhé a krátké fotoperiody s pozvolným (twilight) přechodem světlo/tma na tvorbu Per1 a Per2 mRNA a PER1 a PER2 proteinů v SCN

Postupné stmívání a rozednívání bylo zajištěno pomocí zařízení ACIS (Spoelstra and Daan, 2008) a trvalo 1,5 hodiny. Během této doby intenzita světla stoupala či klesala exponenciálně po 0,01 lx každé 2 min. Jedna skupina zvířat byla po dobu 4 týdnů chována na dlouhé fotoperiodě – 16 hodin světlo, 1,5 hodiny pozvolné stmívání, 5 hodin tma a 1,5 hodiny pozvolné rozsvícení. Večerní stmívání začínalo ve 20:00 a do 21:30 plynule přecházelo až do úplné tmy, ranní rozsvícení začínalo ve 2:30 a ve 4:00 dosáhlo plného

denního světla. Druhá skupina zvířat byla po 4 týdny chována na krátké fotoperiodě – 4 hodiny světlo, 1,5 hodiny pozvolné zhasínání, 17 hodin tma a 1,5 hodiny pozvolné rozsvěcení. Od 14:00 do 15:30 docházelo k postupnému zhasínání a od 8:30 do 10:00 k postupnému rozsvěcení. V den pokusu byla zvířata vypuštěna do stálé tmy. Po 24 hodin byla zvířata v intervalu 2 hodin usmrcována.



Obr. 4: Schéma k pokusu sledování vlivu dlouhé (první osa) a krátké (druhá osa) fotoperiody s pozvolným přechodem světlo/tma na tvorbu Per1 a Per2 mRNA a jejich proteinů v SCN. Bílé obdélníky odpovídají světlé části dne, šedivé označují interval pozvolného stmívání/rozsvěcení (šipky nahoru) a černé označují tmu. Šipky směrem dolů značí odběry každé 2 hodiny.

3.2.3. Detekce exprese hodinových genů v játrech na dlouhé a krátké fotoperiodě

Myši byly po dobu 4 týdnů vystaveny fotoperiodě buď dlouhé, s 18ti hodinami světla a 6ti hodinami tmy (L 18:6), nebo krátké, s 6ti hodinami světla a 18ti hodinami tmy (S 6:18). Tma byla opět od 21:00 do 3:00, respektive od 15:00 do 9:00. V den pokusu byly myši vypuštěny do stálé tmy a po dobu 24 hodin ve dvouhodinovém intervalu usmrcovány.

3.3. STANOVENÍ DENNÍHO PROFILU HLADIN Per1 A Per2 mRNA POMOCÍ IN SITU HYBRIDIZACE

PŘÍSTROJE:

- Cryocut Leica CM 1850
- pH metr Denver Instruments BASIC
- termoblok Biometra TB1
- vodní lázně Julaba, Memmert
- horizontální elektroforéza Sigma
- spektrofotometr Eppendorf
- stereomikroskop Olympus SZX9

CHEMIKÁLIE:

- $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP (1250 mCi/mmol; 10 mCi/ml) (Lacomed)
- thiopental (ICN) – rozpustit v 10 ml dH₂O (destilovaná H₂O)
- DEPC H₂O – 1 ml diethylpyrokarbonátu (Sigma) na 1 litr dH₂O
- acetát amonný (NH₄-acetát) (Sigma)
- kyselina trichloroctová (TCA) (P-lab)
- naftalen (Fluka)
- 2,5-difenyloxazol (PPO) (Lachema)
- metanol (Lachema)
- etylenglykol (Fluka)
- dioxan (Fluka)
- trietanolamin (TEA) (Sigma)
- fenol (Fluka)
- chloroform (Lachema)
- izoamylalkohol (Sigma)
- chlorid sodný (Sigma)
- dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄) (Sigma)
- hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄) (Sigma)
- paraformaldehyd (Fluka)
- kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta)
- trietanolamin (Sigma)

- acetanhydrid (Sigma)
- 96% etanol (Tamda)
- kvasinková tRNA (Sigma)
- agaróza (Seakem)
- etidiumbromid (Sigma)
- formamid (Sigma)
- mixed-bed resine (Bio-Rad)
- etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Ficoll-400 (Sigma)
- PVP-360 (Sigma)
- sodium dodecylsulfát (SDS) (Sigma)
- pyrofosforečnan sodný (NaPPi) (Sigma)
- dithiotreitol (DTT) (Sigma)
- Denhardtův roztok (Sigma) (1x Denhardt's obsahuje 0,02% BSA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll)
- dextran sulfát (Sigma)
- Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (Stratagene)
- citrát sodný (Sigma)
- trizma base (Sigma)
- tri(hydroxymetyl)aminoetan (TRIS) (Sigma)
- Rnáza A (Sigma)
- octan amonný (Sigma)
- vývojka LQN (Sigma)
- ustalovač FOMAFIX (Foma)
- cresyl violet' (Sigma)
- histologický balzám DPX (Fluka)
- speciální vysoce citlivá emulze pro mikroautoradiografii (Amersham Biosciences)

3.3.1. Pracovní roztoky

Linearizace plazmidů, radioaktivní značení cRNA sond

- chloroform/izoamylalkohol (IC): chloroform a izoamylalkohol v poměru 49:1
- fenol/chloroform/izoamylalkohol (PIC): smíchat chloroform a IC v poměru 1:1
- 75% EtOH: 37,5 ml 96% EtOH + DEPC H₂O
- 7,5M NH₄-acetát: 57,81 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr
- 5M NH₄-acetát: 38,54 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr
- 10% TCA: 20% TCA a DEPC H₂O v poměru 1:1
- scintilační roztok: 60 g naftalen
 - 4 g PPO
 - 0,2 g POPOP
 - 100 ml metanol
 - 20 ml etylenglykol
 - doplnit do 1000 ml dioxanem

Prehybridizace:

- DEPC-PBS: 8,77 g NaCl + 0,36 g Na₂HPO₄ v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 7,4
- 4% PFA: 20 g paraformaldehydu v 500 ml DEPC H₂O, rozpuštěno zahřátím na 65°C, pH upraveno na 7,4; vždy čerstvý roztok
- 0,2N HCl: 16,67 ml HCl (12N, 36,97%) v 1 litru DEPC H₂O
- 0,1M TEA: 18,57 g trietanolaminu v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 8,0; vždy čerstvý roztok
pro acetylaci použít 1 ml acet anhydridu na 400 ml TEA
- 70% EtOH: 350 ml 96% EtOH + 130 ml DEPC H₂O

Hybridizace:

- deionozovaný formamid: 50 ml formamidu + 2,5 g mixed bed resine (Bio-Rad), 30 minut míchat, filtrace přes 0,22 µm filtr, uchovávat v -20°C
- 20x SSPE: 40 ml DEPC H₂O + 12,62 g NaCl + 1,66 g NaH₂PO₄ + 2,4 ml EDTA (0,5M, pH 8,0), promíchat, doplnit DEPC H₂O na 60 ml
- 100x Denhardt's: 200 mg BSA + 200 mg Ficoll-400 + 200 mg PVP-360 + 10 ml DEPC H₂O

- kvasinková tRNA: 25 mg tRNA + 1 ml DEPC H₂O
- 10% SDS: 10 g SDS + 100 ml DEPC H₂O, rozpustit zahřátím na 50°C
- 5% NaPPi: 2,5 g pyrofosforečnanu sodného + 50 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr
- 0,5M DTT: 0,1542 g DTT + 2 ml DEPC H₂O
- hybridizační pufr (HP):
25 ml deionizovaný formamid (výsledná koncentrace 10%)
5 g dextran sulfát (v.k. 10%)
12,5 ml 20x SSPE (v.k. 0,9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA)
1 ml 100x Denhardt's (v.k. 0,4% BSA, 0,4% Ficoll, 0,4% PVP)
1 ml kvasinkové tRNA (25 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
2,5 ml Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
0,5 ml 10% SDS (v.k. 0,1%)
1 ml 5% NaPPi (v.k. 0,1%)
doplnit DEPC H₂O do objemu 50 ml

Promývání:

- 20x SSC: 175,3 g NaCl + 88,2 g citrát sodný v 1 litru dH₂O, pH upravit na 7,0
- 2x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 200 ml 20x SSC + 20 ml 5% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1776 ml dH₂O
- 0,1x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 10 ml 20x SSC + 20 ml 0,05% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1996 ml dH₂O
- 1M Tris-HCl: 60,55 g Trizma base + 400 ml dH₂O + 21 ml HCl, pH upravit na 8,0, doplnit dH₂O do 500 ml
- RNázový pufr: 29,2 g NaCl + 990 ml dH₂O + 10 ml tris-HCl (pH 8,0)
- RNáza A (20 mg/ml): 20 mg lyofilizovaná RNáza + 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), povaření zbaví RNázu stopové DNázové aktivity
- 96% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 400 ml 96% EtOH
- 70% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 292 ml 96% EtOH + 108 ml dH₂O

KITY:

- MaxiScript in vitro transkripční kit SP6/T7 nebo T7/T3 (Ambion):
 - RNA polymeráza T3 (30 U/μl)
T7 (15 U/μl)
SP6 (20 U/μl)
 - 10x transkripční pufr
 - ATP, GTP, CTP, UTP (10mM)
 - DNáza I (bez RNáz)
 - nanášecí pufr II pro elektroforézu
 - H₂O (bez RNáz)
 - myší pTRI-aktin (0,5 mg/ml)

3.3.2. Postup

3.3.2.1. Odběr mozků a příprava řezů

1. Myši byly dekapitovány (při slabém červeném světle, jehož intenzita nepřesahovala 1 lux), ihned poté následovalo vyjmutí mozku, zamražení v suchém ledu a skladování v -80°C.
2. Příprava 15 μm koronálních řezů v oblasti SCN na mrazícím mikrotomu Cryocut při -20°C; přenesení řezů na podložní skla SuperFrost Plus, po zaschnutí skladováno v -80°C.

3.3.2.2. Příprava značené cRNA sondy

Pro detekci Per1 a Per2 mRNA v SCN byly použity radioaktivně značené antisense cRNA sondy. Jako radioaktivní značka bylo v těchto ribopróbách použito ³⁵S-UTP (1250 mCi/mmol, 10 mCi/ml). Potkaní rPer1 a rPer2 cDNA fragmenty vložené do vektorů pGem-T Easy a sloužící jako templáty při in vitro transkripci při přípravě sond byly laskavě darovány profesorem H. Okamura. Délka antisense cRNA prób a jejich hybridizační teploty jsou uvedeny v tabulce 1:

Gen	Délka próby (bp)	Enzymy pro linearizaci a in vitro transkripci	Teplota hybridizace (°C)
Per1	980	Sal1, T7	60
Per2	1512	Sal1, T7	61

Tab.1

1. **Linearizace plazmidu (bulk linearizace)** pro přípravu antisense cRNA sondy:

Do reakce napipetovat:

plazmid 30 µg

restrikční pufr 25 µl

restrikční endonukleáza 10 µl

celou reakci doplnit ddH₂O do výsledného objemu 250 µl

Inkubace přes noc při 37°C v termobloku.

2. Analýza na 1% agarózovém gelu.

3. **Purifikace** linearizovaných plazmidů:

K 250 µl reakci přidat 250 µl PIC, vortex, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4°C).

4. K horní vodné fázi přidat 250 µl PIC, vortex, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4°C).

5. K horní vodné fázi přidat 250 µl IC, vortex, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4°C).

6. K horní vodné fázi přidat 75 µl 10M NH₄-acetátu (výsledná koncentrace 2,5M) a 650 µl 96% EtOH (-20°C), vortex.

7. Precipitace 40 minut v -80°C, centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C).

8. Promytí pelety 700 µl 75% EtOH (-20°C), centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C).

9. Vysušení pelety 15 minut při RT a rozpuštění ve 30 µl DEPC H₂O.

10. Kontrola purifikovaného plazmidu elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a spektrofotometricky.

11. Zkušební **in vitro transkripce**: postup viz 12. bez použití radioaktivně značeného UTP.

12. **Radioaktivní značení sondy pomocí in vitro transkripce** – reakce namíchána při pokojové teplotě.

Do sterilní 1,5 ml zkumavky napipetovat:

DEPC H₂O 4 µl

plazmid 3 µl

10x transkripční pufr	2 μ l
10mM ATP	1 μ l
10mM CTP	1 μ l
10mM GTP	1 μ l
neznačené UTP (200 μ M)	1 μ l
³⁵ S-UTP (1250mCi/mmol)	5 μ l
RNA polymeráza (SP6/T7/T3)	2 μ l

Inkubace 60 minut při 37°C v termobloku.

13. Přidat 1 μ l DNázy I a 1,5 μ l tRNA (10 mg/ml v DEPC H₂O), inkubace 20 minut při 37°C v termobloku.
14. Stop reakce: přidat 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0).
15. **Purifikace radioaktivně značené sondy:** pomocí kolonek Clontech (Chromaspin), centrifugace 5 min.
16. **Stanovení inkorporace (TCA precipitace):** k 1 μ l značené ribopróby přidat 19 μ l DEPC H₂O.
17. Připravit Whatman GF/A filtry (Sigma) různého tvaru, 4 ks pro každou ribopróbu.
18. Na každý filtr napipetovat 5 μ l ředěné próby, po zaschnutí 2 filtry vložit do scintilační zkumavky s 10 ml scintilačního roztoku BRAY (= total).
19. Zbývající filtry – odmytí volných NTPs: promytí 10% TCA (4°C), 3x 5 minut, 20 ml.
20. Promytí 96% EtOH (4°C), 5 minut, 20 ml.
21. Vysušení filtrů, vložení do 10 ml Brayova scintilačního roztoku (= wash).
22. Analýza vzorků pomocí scintilačního počítače. Poměr wash cpm / total cpm udává procenta inkorporace ³⁵S-UTP do cRNA sondy.

3.3.2.3. *Prehybridizace* (příprava řezů na hybridizaci)

1. Skla s mozkovými řezy vyjmuta z -80°C, sušena 20 minut při RT a naskládána do sterilních stojanů. Celý postup probíhá při RT, stojany se skly přemísťovány do kyvet se 400 ml příslušného roztoku.
2. Fixace: 4% PFA v DEPC-PBS, 40 minut.
3. 2x promytí v DEPC-PBS po 5 minutách.
4. Deproteinace: 0,2N HCl, 5 minut.
5. Promytí v DEPC-PBS, 5 minut.
6. Inkubace v 0,1M TEA, 2 minuty, třepat.
7. Acetylace: 0,25% acet anhydrid v TEA, 10 minut, třepat.

8. Promytí v DEPC-PBS, 5 minut.
9. Dehydratace: 70% EtOH, 5 minut; 96% EtOH, 5 minut.

3.3.2.4. Hybridizace

1. K 1 ml HP (hybridizační pufr) přidat 100 μ l 0,5M DTT, vortex.
2. Přidat značenou sondu (množství sondy tak, aby výsledná aktivita byla $2,5 \cdot 10^7$ cpm na 1 ml HP).
3. Denaturace 5 minut při 85°C.
4. Předehřátí HP na hybridizační teplotu: Per1 60°C
Per2 61°C
5. 70 μ l HP se sondou nanést na krycí sklíčko, přiložit podložní sklo s řezy.
6. Hybridizace v hybridizačním boxu (vlhčený dvěma uzávěry scintilačních lahvíček naplněnými PBS) zabaleném do alobalu 22 hodin při 60°C Per1
61°C Per2

3.3.2.5. Promývání a autoradiografie

1. Skla vyjmuta z hybridizačního boxu, zbavena krycího sklíčka odmytím v 2x SSC a vyskládána do stojanu.
2. 2x SSC, 30 minut, RT.
3. RNáza A v pufru (10 μ g/ml), 60 minut, 37°C, vodní lázeň.
4. 2x SSC, 30 minut, RT.
5. 0,1x SSC, 2x 30 minut, odmývací teplota dle teploty hybridizace.
6. 0,1x SSC, 2x 20 minut, RT.
7. 70% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT.
8. 96% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT.
9. Osušená skla vyskládána do autoradiografické kazety, přiložen vysokocitlivý film Kodak BioMax MR. Expozice 10 dní při -20°C.
10. Vyvolání filmu: 5 minut vývojka LQN (Foma), 10 minut ustalovač FOMAFIX (Foma).
11. Pro kontrolu správné lokalizace neuronálních struktur řezy podbarveny kresyl-violetí.
Skla s řezy inkubována v kyvetách s roztoky:

xylen	5 minut
95% EtOH	2x 3 minuty
70% EtOH	3 minuty

dH ₂ O	1 minuta
0,25% kresyl-violet	45 sekund
dH ₂ O	2x 15 sekund
CV diferenciál	1 minuta
70% EtOH	30 sekund
95% EtOH	2x 30 sekund
xylén	2x 30 sekund

Skla zakápnuta DPX histologickým balzámem a překryta krycím sklíčkem.

3.3.2.6. Analýza hybridizačního signálu

Z každého mozku byly vybrány tři reprezentativní řezy – jeden z rostrální, jeden z mediální a jeden z kaudální části SCN, které byly vyhodnoceny pomocí digitální analýzy obrazu (program MicroImage, Olympus). Nejprve byly řezy nasnímány černobílou kamerou Sony připojenou na stereomikroskop a poté byla změřena intenzita signálu jako relativní optická denzita (OD). Kromě OD SCN byla vždy změřena i OD pozadí, která pak byla od hodnot OD SCN odečtena. Výsledné hodnoty jsou průměrem OD levého a pravého SCN. Každý časový bod je pak průměrem ze 4 zvířat.

3.4. IMUNOCYTOCHEMICKÉ STANOVENÍ DENNÍHO PROFILU HLADIN PROTEINŮ PER1 A PER2

PŘÍSTROJE:

- Cryocut Leica CM 1850
- pH metr Denver Instruments BASIC
- mikroskop Olympus CX40
- mikroskop Olympus AX70 s připojenou barevnou CCD kamerou Sony a PC

CHEMIKÁLIE:

- dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát ($M_r= 156,01$) (Lachema)
- hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát ($M_r= 358,14$) (Penta)
- hydrogenfosforečnan sodný, bezvodý ($M_r= 141,96$) (Sigma)
- thiopental (ICN) – rozpustit v 10 ml dH₂O

- heparin (Léčiva)
- chlorid draselný (Lachema)
- chlorid sodný (Sigma)
- paraformaldehyd (Fluka)
- polyvinylpyrrolidon (PVP) ($M_r = 360\,000$) (Sigma)
- etylenglykol (Fluka)
- sacharóza (Lachema)
- azid sodný (Lachema)
- diaminobenzidin (DAB) (Sigma)
- etanol (Tamda)
- histologický balzám DPX (Fluka)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- peroxid vodíku (Chemické závody Sokolov)
- Triton X-100 (Sigma)
- xylén (Lachema)
- primární anti-mPer1 polyklonální protilátka (králičí) proti aminokyselinám 6 – 21 mPER1 polypeptidu; vyrobena v Massachusetts General Hospital Biopolymer Core Facility
- primární anti-mPer2 polyklonální protilátka získána od ADI (Greenwich, CT)
- Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratoires): součástí kitu je normální kozí sérum (NGS), sekundární králičí IgG s navázaným biotinem, avidin a biotin s navázanou křenovou peroxidázou H

3.4.1. Pracovní roztoky

- 0,2M Na_2HPO_4 : 71,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru dd H_2O
- 0,2M NaH_2PO_4 : 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru dd H_2O
- 0,01M PBS (fosfáty pufovaný fyziologický roztok):
3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8 g NaCl + 0,2 KCl
Rozpustit v 1 litru dd H_2O (redestilovaná H_2O); pH upravit na 7,2; přefiltrovat.
- 4% PFA (paraformaldehyd):
810 ml 0,2M Na_2HPO_4 + 190 ml 0,2M NaH_2PO_4 + 80 g paraformaldehyd

Zahřátím na 65°C rozpustit, přidat 1 l ddH₂O; přefiltrovat; pH upravit na 7,2; vždy čerstvý roztok.

- 20% sacharóza: 20 g sacharóza v 100 ml 0,01M PBS, vždy čerstvý roztok
- kryoprotektant:
0,28 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O (M_r= 156,01) + 0,51 g Na₂HPO₄ (M_r= 141,96) + 0,9 g NaCl + 30 g sacharóza + 1 g PVP + 30 ml etylenglykol
Rozpustit ve 100 ml ddH₂O; pH upravit na 7,2.
- inkubační pufr (IP): 1% BSA / 0,3% Triton X-100 / 0,01M PBS
2,5 g BSA + 700 µl Triton X-100 + 250 ml 0,01M PBS; vždy čerstvý roztok; 0,5 ml / 3 řezy
- promývací pufr (PP): 0,3% BSA / 0,3% Triton X-100 / 0,01M PBS
inkubační pufr naředěný 0,01M PBS v poměru 1:3; vždy čerstvý roztok; 0,5 ml / 3 řezy
- 0,5% peroxid vodíku: 250 µl 30% H₂O₂ + 15 ml 0,01M PBS; vždy čerstvý roztok; 0,5 ml / 3 řezy
- 2% normální kozí sérum (NGS): 200 µl NGS (Vectastain Elite ABC kit) + 10 ml IP; vždy čerstvý roztok; 0,3 ml / 3 řezy
- pracovní roztok primární protilátky:
výsledné ředění anti-mPER1 protilátky - 1:10 000: 10 µl anti-mPER1 protilátky (aliquot 1:10) + 10 ml IP; čerstvý roztok; 0,3 ml / 3 řezy
výsledné ředění anti-mPER2 protilátky - 1:500: 200 µl anti-mPER1 protilátky (aliquot 1:10) + 10 ml IP; čerstvý roztok; 0,3 ml / 3 řezy
- pracovní roztok sekundární biotinylované protilátky:
výsledné ředění – 1:600 : 16,7 µl sekundární IgG (Vectastain Elite ABC kit) + 10 ml IP; vždy čerstvý roztok; 0,3 ml / 3 řezy
- roztok avidin / biotin / peroxidáza (ABC):
25 µl avidin (Vectastain Elite ABC kit) + 25 µl biotin s navázanou křenovou peroxidázou (Vectastain Elite ABC kit) + 10 ml IP; připravit 30 minut předem kvůli vytvoření komplexu avidin / biotin; 0,3 ml / 3 řezy
- roztok diaminobenzidinu: 0,05% DAB / 0,01% H₂O₂ / 0,01M PBS
10 mg diaminobenzidinu (1 tableta) + 7 µl 30% H₂O₂ + 20 ml 0,01M PBS; čerstvý roztok; 0,3 ml / 3 řezy

3.4.2. Postup

1. Anestezie zvířat ve dvouhodinových intervalech intraperitoneální aplikací thiopentalu.
2. Transkardiální perfuze: aplikace heparinu do levé srdeční komory pro zamezení srážení krve, zavedení kanyly do aorty ascendens – promytí oběhového systému 0,01M PBS (~ 3 minuty) a 4% PFA (~ 5 minut).
3. Vyjmutí mozků, postfixace ve 4% PFA (12 hod, 4°C); kryoprotekce ve 20% sacharóze (24 hod, 4°C).
4. Skladování mozků v -80°C.
5. Příprava 30 µm koronálních hypotalamických řezů pomocí mrazícího mikrotomu Cryocut při teplotě -20°C.
6. Řezy do doby imunocytochemického stanovení skladovány v kryoprotektantu (v -20°C).
7. Promytí řezů v 0,01M PBS (2x 5 minut).
8. Redukce endogenní peroxidázové aktivity: 0,5% H₂O₂ (10 minut).
9. Promytí v 0,01M PBS (2x 5 minut).
10. Redukce nescifického pozadí: 2% NGS (60 minut).
11. Inkubace s roztokem primární protilátky (anti-mPER1 nebo anti-mPER2), přes noc (min. 16 hod), 4°C.
12. Promytí v PP (3x 5 minut).
13. Inkubace s roztokem sekundární biotinylované protilátky (60 minut).
14. Promytí v PP (2x 5 minut).
15. Inkubace v ABC (60 minut).
16. Promytí v PP (5 minut).
17. Promytí v 0,01M PBS (2x 5 minut).
18. Detekce navázaných imunokomplexů s peroxidázou: roztok DAB (1 až 5 minut).
19. Zastavení barevné reakce: promytí v 0,01M PBS (3x 5 minut).
20. Přenesení řezů na želatinovaná podložní sklíčka pomocí jemného štětečku.
21. Odvodnění a fixace řezů:

dH ₂ O	1 minuta
70% etanol	5 minut
96% etanol	2x 5 minut
xylén	3x 5 minut

Zakápnutí histologickým balzámem DPX a překrytí krycím sklíčkem.

3.4.3. Počítání PER1 a PER2 imunopozitivních buněk v SCN

K vyhodnocení počtu imunopozitivních buněk byl na každém sklíčku z 12 řezů vybrán jeden z rostrální, jeden z mediální a jeden z kaudální části SCN, který nebyl poškozen. Počet PER1 a PER2 imunopozitivních buněk byl stanoven pomocí digitální analýzy obrazu (software MicroImage, Olympus) na světelném mikroskopu AX70. Výsledný počet buněk byl určen jako průměr z levého a pravého SCN, výsledné hodnoty v jednotlivých časových bodech jsou průměrem ze 3 zvířat.

3.5. DETEKCE mRNA HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH POMOCÍ KVANTITATIVNÍ REAL-TIME RT-PCR

PŘÍSTROJE

- homogenizátor Universal Laboratory Aid Type 309
- centrifuga Sigma 3K 18
- centrifuga Eppendorf Mini Spin plus
- vortex Scientific Industries
- LightCycler Roche
- termoblok Biometra TB1
- termoblok Major Science
- flow-box BIOAIR Instruments Aura mini
- spektrofotometr Eppendorf

CHEMIKÁLIE

- RNAlater (Qiagen)
- β -Mercaptoetanol
- 70% EtOH (Tamda)
- agaróza

KITY

- RNeasy Mini Kit (Qiagen):
 - pufr RLT
 - pufr RW1
 - pufr RPE
 - H₂O (bez RNáz)
 - RNeasy mini spin kolonky
- ImProm-II Reverse Transcription System (Promega):
 - reverzní transkriptáza
 - random primery (0,5 µg/µl)
 - směs dNTP (10mM)
 - reakční pufr 5X
 - MgCl₂, 25mM
 - RNasin (inhibitor ribonukleáz)
 - H₂O (bez nukleáz)
- QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen):
 - 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: HotStarTaq DNA polymeráza
QuantiTect SYBR Green PCR pufr
směs dNTP
fluorescenční barvivo SYBR
Green I a ROX
5 mM MgCl₂
 - H₂O (bez RNáz)

3.5.1. Postup

3.5.1.1. Odběr tkáně a izolace celkové RNA

1. Zvířata byla dekapitována (při slabém červeném světle, jehož intenzita nepřesahovala 1 lux). Ihned poté následovalo odebrání jaterní tkáně, vložení do stabilizačního činidla RNAlater a skladování v -80°C.
2. K izolaci celkové RNA použit RNeasy Mini Kit (Qiagen) – postup podle návodu výrobce (30mg jaterní tkáně homogenizováno pomocí rotor-stator homogenizátoru).

3. Množství a čistota RNA stanovena spektrofotometricky, kvalita ověřena na agarózové gelové elektroforéze. RNA do dalšího zpracování uložena v -80°C.

3.5.1.2. Syntéza cDNA

1. Získaná RNA naředěna na koncentraci 250 µg/ml.
2. Pro syntézu cDNA použit kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega).
3. Ke 2 µl RNA přidat 0,5 µl random primerů, inkubace 5 minut při 70°C, poté 5 minut na ledu, centrifugace.
4. Mezitím připravit reakční směs pro reverzní transkripci:

H ₂ O	2,25 µl
pufr	2 µl
Mg ²⁺	2 µl
dNTP	0,5 µl
RNasin	0,25 µl
reverzní transkriptáza	0,5 µl
5. Vortex, poté reakční směs smíchat s RNA a random primery. Reasociace 5 minut při RT.
6. Inkubace 60 minut při 42°C.
7. Závěrečná denaturace 15 minut při 70°C. Skladování cDNA v -20°C.

3.5.1.3. Kvantitativní real-time PCR

Pro stanovení hladin mRNA hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erb α , Bmal1, Cry1, hodinami kontrolovaného genu DBP a housekeeping genu β -2 mikroglobulinu (B2M) byly připraveny dvojice primerů – horní (forward, F) a dolní (reverse, R). Primery byly navrženy pomocí programu PrimerSelect (součást software Lasergene, DNASTar) a objednány u firmy Chemos Cz.

Použité primery:

Per1: (NCBI NM011065)

F 5' TCTGGCCTGGGCTCTGGGTCTGGTTC 3'

R 5' GCTGCGGGTGATGCTGGCTGAGGT 3'

Per2: (NCBI NM011066)

F 5' CCTCTGGCCCCCTGTGGATTG 3'

R 5' AGCTGGGCCCTTGGTGGATAG 3'

Rev-Erb α : (NCBI NM145434)

F 5' CCTTTGGCGGCTAGCGTCATAAT 3'

R 5' CCAGGTAGGCGGGTAGGAGGAAG 3'

Bmal1: (NCBI NM007489)

F 5' CAGAGCCGGAGCAGGAAAAATAGGT 3'

R 5' CAGGGGGACGCGTACTTGTGATGT 3'

Cry1: (NCBI NM007771)

F 5' GGTCTTCTCGCCTCGGTCCCTTCTAA 3'

R 5' CTCCATTCCCGCTGCTGCTACAACCTC 3'

DBP: (NCBI NM016974)

F 5' TTTTGGCGCCGCTGCTGTGGGAACG 3'

R 5' GGGGGAGGGCGCGGGAGTGC 3'

B2M: (NCBI NM009735)

F 5' TCTCACTGACCGGCCTGTATGCTATC 3'

R 5' AATGTGAGGCGGGTGGAAGTGTG 3'

1. cDNA naředěna v poměru 1:3
2. Do PCR kapilár napipetována PCR reakční směs (20 μ l):

SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l

PCR H₂O 6 μ l

Primery F+R (10 μ M) 2 μ l

cDNA 2 μ l

3. Amplifikační protokol: viz tabulka 2

	Počáteční denaturace	Amplifikace			Melting			Ochlazení
		Denaturace	Reasociace	Extenze				
Teplota (°C)	95	94	60 / 68*	72	95	70	95	42
Čas (s)	900	15	20	10	0	30	0	30
Ramping (°C/s)	20	20	20	20	20	20	0,1	20
Počet cyklů	1	50			1			1
Měření fluorescence		po každém cyklu			kontinuální			

* teplota 68°C platí pouze pro gen Per1

Tab. 2

Jako standard použita cDNA z posledního časového bodu (CT 24). Z ní připravena ředící řada pro stanovení kalibrační přímky: cDNA naředěna 3x, 10x, 30x, 100x. Jako negativní kontrola použita kompletní PCR reakční směs bez cDNA.

Crossing point byl určován metodou maxima druhé derivace. Pro zjištění případných primer-dimerů byla analyzována melting křivka. Konečné koncentrace byly získány jako poměr relativních koncentrací k housekeeping genu. Výsledná hodnota v určitý časový bod je průměrem ze 3 měření (3 zvířat).

3.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

Data byla vyhodnocena základními statistickými metodami:

aritmetický průměr: $\bar{x} = \sum x_i / n$

směrodatná odchylka: $SD = [(1/n - 1) * \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}$

střední chyba průměru: $SEM = SD/n^{1/2}$

Statistická významnost rozdílů v rytmech mezi odlišnými fotoperiodami byla analyzována pomocí dvojnásobné analýzy variance (ANOVA) s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

4. VÝSLEDKY

4.1. SROVNÁNÍ VLIVU DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S NÁHLÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENU *Per1* A *Per2* A HLADINY JEJICH PROTEINŮ V SCN

V této části diplomové práce byl sledován vliv extrémně dlouhé a extrémně krátké fotoperiody na centrální oscilátor v SCN. Extrémně dlouhá fotoperioda se vyznačovala 18-ti hodinami světla a 6-ti hodinami tmy (L 18:6; L z angl. long), naopak extrémně krátká fotoperioda 6-ti hodinami světla a 18-ti hodinami tmy (S 6:18; S z angl. short). Přechod mezi světlem a tmo byl realizován náhlým zhasnutím či rozsvícením. Hladina *Per1* a *Per2* mRNA byla analyzována pomocí *in situ* hybridizace, hladina PER1 a PER2 proteinů pomocí imunocytochemie. Denní profily hladin mRNA a proteinů byly sledovány zvláště v rostrální (R), mediální (M) a kaudální (C) části SCN.

4.1.1. Vliv na cirkadiánní profil exprese genu *Per1*

Při porovnání profilů hladin *Per1* mRNA na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času v R ($F = 67,8$; $p < 0,01$), M ($F = 69,4$; $p < 0,01$) i C ($F = 57,1$; $p < 0,01$) SCN. Kromě toho analýza prokázala významný rozdíl mezi profily na obou fotoperiodách, a to jak v R ($F = 151,2$; $p < 0,01$), M ($F = 160,9$; $p < 0,01$) i v C ($F = 101,3$; $p < 0,01$) SCN as tejně tak významný interakční efekt v R ($F = 17,1$; $p < 0,01$), M ($F = 9,5$; $p < 0,01$) i C ($F = 5,9$; $p < 0,01$) SCN.

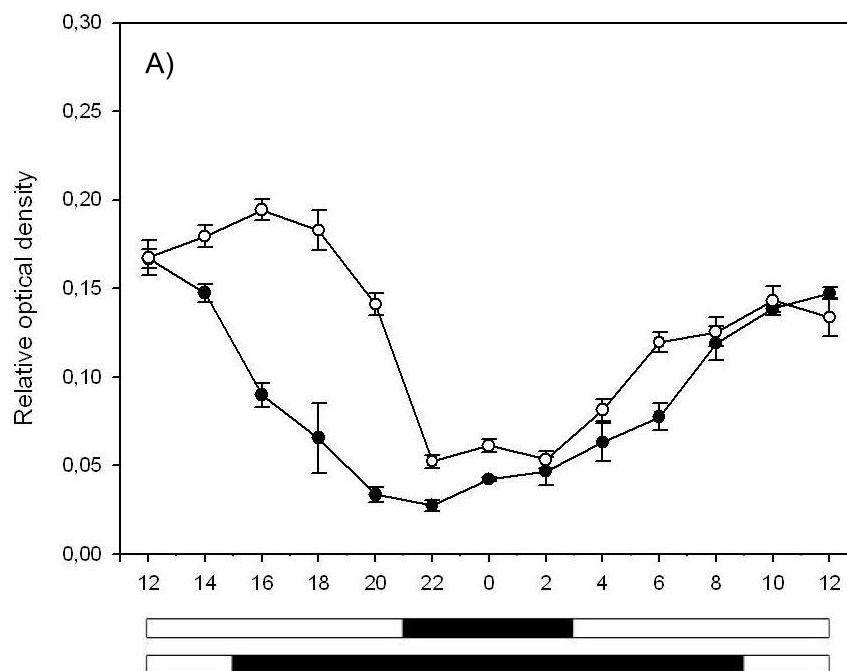
V R-SCN začaly na dlouhé fotoperiodě hladiny mRNA klesat z maximálních hodnot ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$), zatímco na krátké fotoperiodě již v 16:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). Minimálních hodnot dosahovaly hladiny *Per1* mRNA na dlouhé fotoperiodě mezi 22:00 – 4:00, na krátké fotoperiodě mezi 20:00 – 2:00. Nárůst *Per1* mRNA nastal dříve na fotoperiodě dlouhé (6:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) než na krátké (6:00 vs. 2:00, $p < 0,05$) (graf 1a).

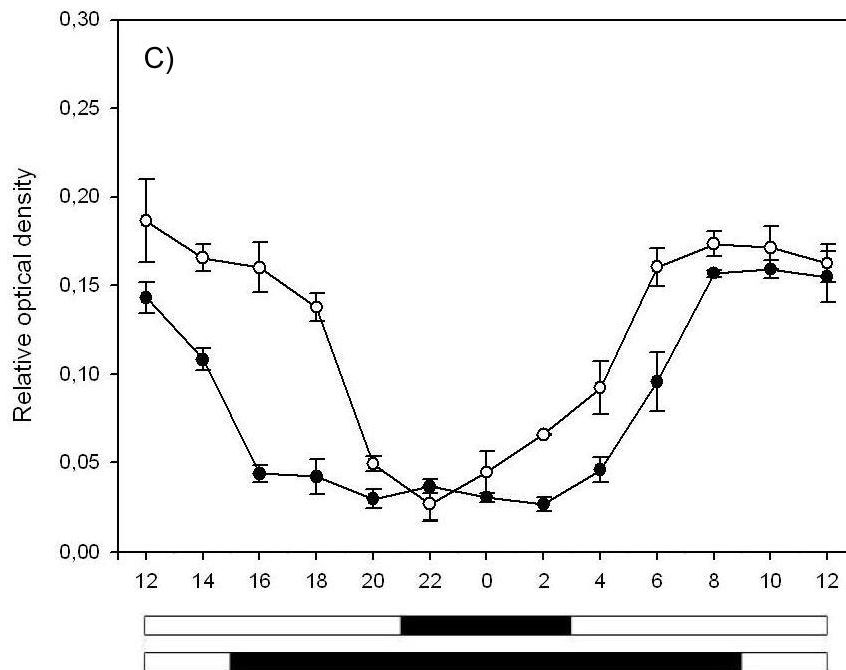
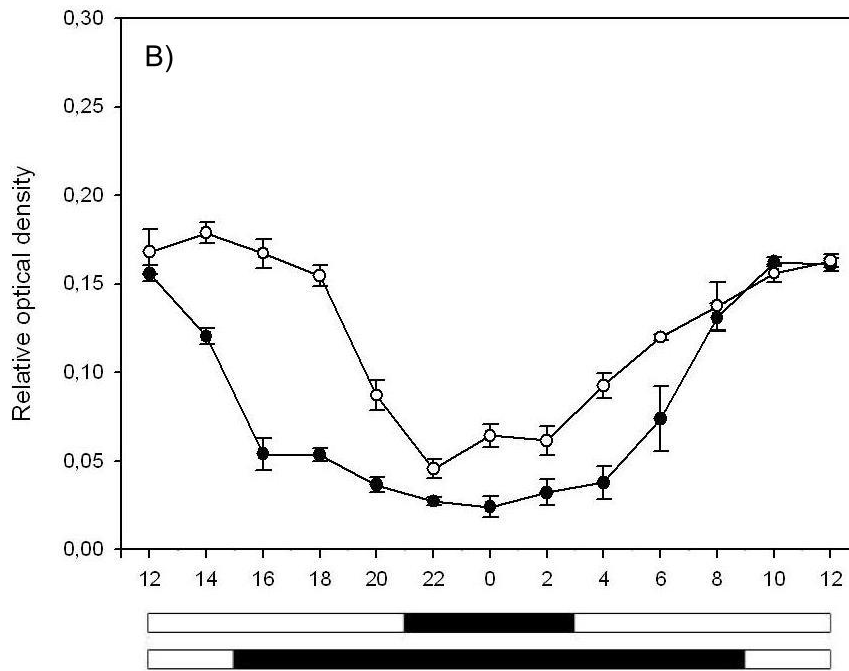
V M-SCN nastal na dlouhé fotoperiodě pokles hladiny mRNA z maximálních hodnot ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$), na krátké fotoperiodě již ve 14:00 (vs. 12:00, $p < 0,01$). Minimálních hodnot bylo dosaženo na dlouhé fotoperiodě mezi 22:00 – 2:00, zatímco na krátké mezi 16:00 do 4:00. Hladina *Per1* mRNA začala stoupat dříve

na dlouhé (ve 4:00 vs. 22:00, $p < 0,01$) než na krátké (v 6:00 vs. 4:00, $p < 0,05$) fotoperiodě (graf 1b).

V C-SCN začala hladina Per1 mRNA významně klesat později na dlouhé (v 18:00 vs. 14:00, $p < 0,01$) než na krátké (ve 14:00 vs. 12:00, $p < 0,01$) fotoperiodě. Minimálních hodnot dosahovaly hladiny Per1 mRNA na dlouhé fotoperiodě mezi 20:00 a 2:00, na krátké déle, a to mezi 16:00 a 4:00. Nárůst hladin mRNA nastal na dlouhé fotoperiodě dříve (4:00 vs 0:00, $p < 0,05$) než na krátké (6:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) (graf 1c).

Ve všech třech částech SCN tedy přetrvávala vysoká denní hladina Per1 mRNA déle na dlouhé než na krátké fotoperiodě, naopak interval s nízkými nočními hladinami byl výrazně delší na fotoperiodě krátké.





Graf 1: Denní profily hladin Per1 mRNA v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní optická denzita. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 4 zvířat \pm S.E.M.

4.1.2. Vliv na cirkadiánní profil exprese genu Per2

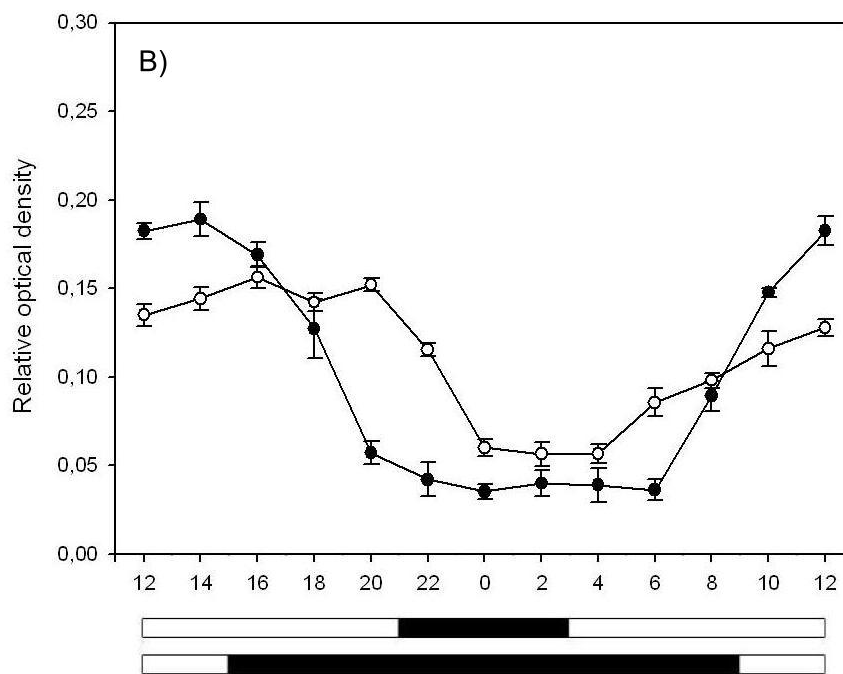
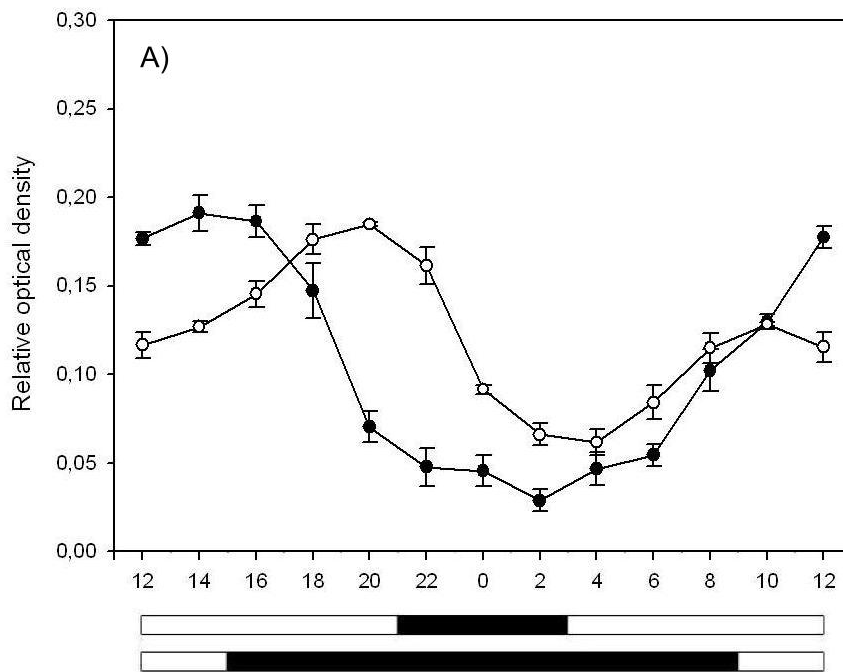
Při srovnání exprese genu Per2 na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času v R ($F = 53,7$; $p < 0,01$), M ($F = 69,9$; $p < 0,01$) i C ($F = 65,4$; $p < 0,01$) SCN. Analýza dále prokázala významný rozdíl mezi profily na dlouhé krátké fotoperiodě, a to jak v R ($F = 15,5$; $p < 0,01$), M ($F = 13,4$; $p < 0,01$) i v C ($F = 17,4$; $p < 0,01$) SCN a významný interakční efekt (R: $F = 25,4$; $p < 0,01$; M: $F = 23,8$; $p < 0,01$ a C: $F = 5,5$; $p < 0,01$).

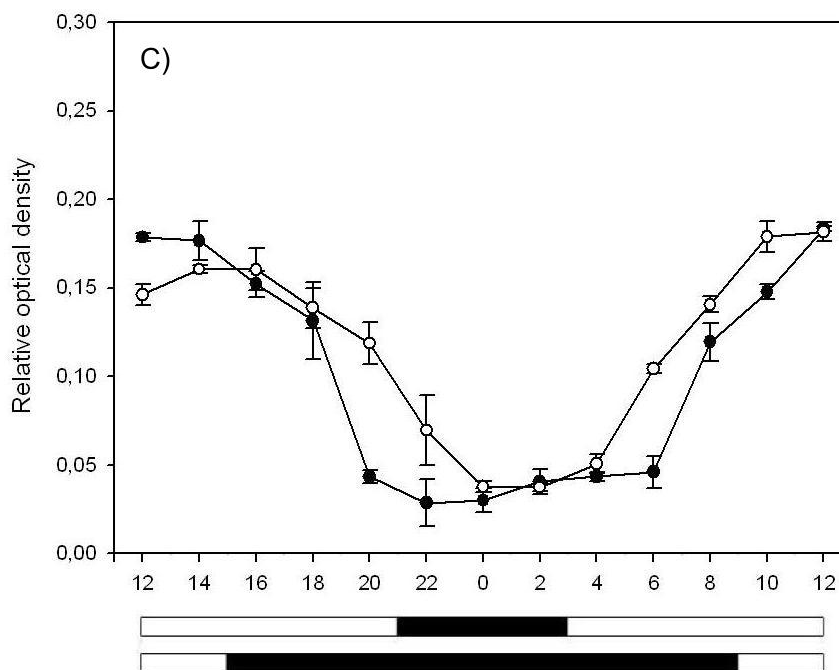
V R-SCN začala hladina Per2 mRNA na krátké fotoperiodě klesat z maximálních hodnot již v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$), zatímco na dlouhé fotoperiodě až v 0:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$). Minimálních hodnot dosahovaly hladiny Per2 mRNA na dlouhé fotoperiodě mezi 2:00 – 6:00, na krátké fotoperiodě mezi 22:00 – 6:00. K významnému nárůstu došlo na obou fotoperiodách v 8:00 (na dlouhé vs. 6:00, $p < 0,05$; na krátké vs. 6:00, $p < 0,01$) (graf 2a).

V M-SCN došlo k významnému poklesu hladiny Per2 mRNA z maximálních hodnot na dlouhé fotoperiodě ve 22:00 (vs. 20:00, $p < 0,05$), na krátké fotoperiodě již v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,01$). Minimálních hodnot dosahovaly hladiny mRNA na dlouhé fotoperiodě od 0:00, zatímco na krátké již od 20:00. Opětný vzestupu hladiny byl na dlouhé fotoperiodě významný v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,01$), na krátké až v 8:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$) (graf 2b).

V C-SCN začala hladina mRNA klesat později na dlouhé fotoperiodě, tj. ve 20:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$), než na krátké fotoperiodě, tj. v 18:00 (vs. 14:00, $p < 0,05$). Minimálních hodnot dosahovaly hladiny Per2 mRNA na dlouhé fotoperiodě mezi 0:00 – 4:00, na krátké déle, a to mezi 20:00 – 6:00. Hladiny Per2 mRNA začaly stoupat dříve na dlouhé fotoperiodě (6:00 vs. 4:00, $p < 0,05$) než na krátké (8:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) (graf 2c).

Podobně jako u genu Per1, i u Per2 přetrvávala v rostrální, mediální i kaudální části SCN nízká noční exprese déle na krátké fotoperiodě než na dlouhé. Kromě rostrální části byl interval s vysokou denní hladinou exprese delší na dlouhé fotoperiodě než na krátké.





Graf 2: Denní profily hladin Per2 mRNA v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní optická denzita. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 4 zvířat \pm S.E.M.

4.1.3. Vliv fotoperiody na profil hladin proteinu PER1

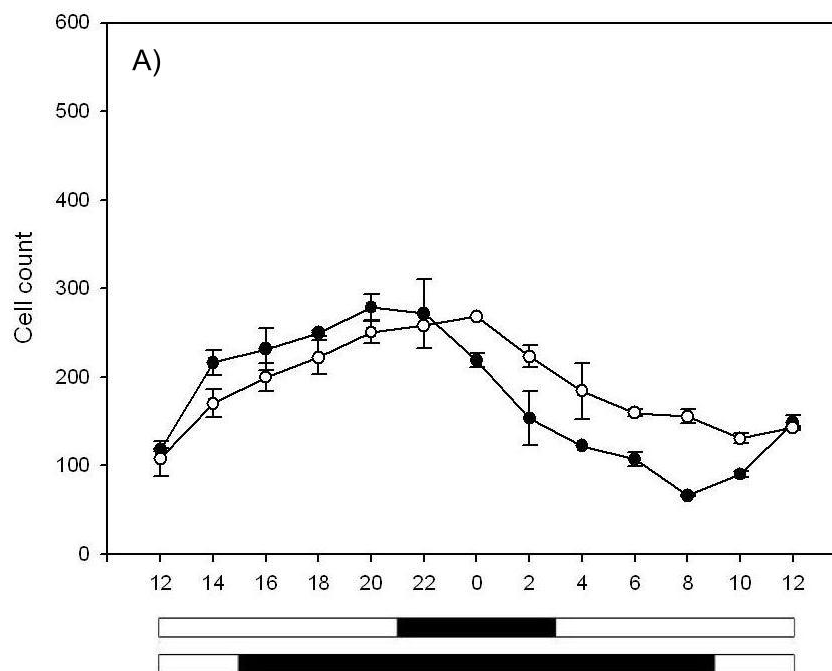
Při porovnání profilů hladin PER1 proteinů na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času v R ($F = 10,1$; $p < 0,01$), M ($F = 23,9$; $p < 0,01$) i C ($F = 6,7$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný v C-SCN ($F = 5,1$; $p < 0,05$), avšak ne v R-SCN ($F = 2,4$; $p = 0,13$) a v M-SCN ($F = 0,13$; $p = 0,72$). Významný interakční efekt ve všech částech SCN (R: $F = 3,1$; $p < 0,01$; M: $F = 6,6$; $p < 0,01$; C: $F = 2,6$; $p = 0,01$) naznačil, že se profily hladin PER1 proteinu na obou fotoperiodách významně liší.

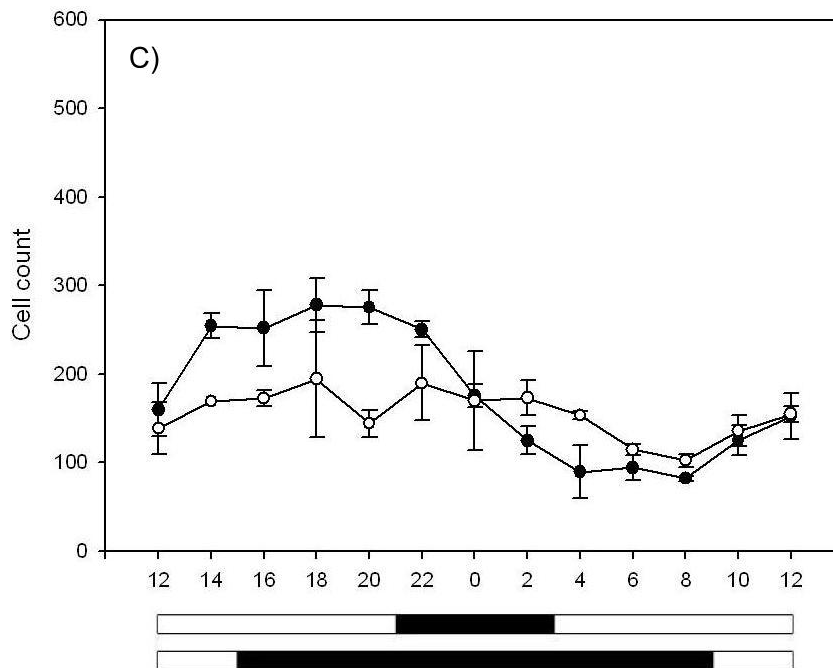
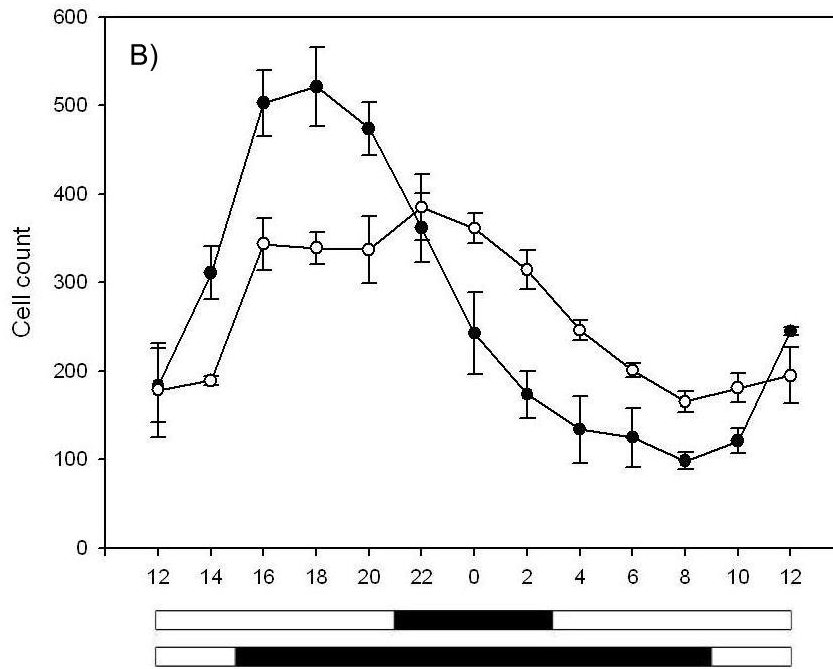
V R-SCN nastal na krátké fotoperiodě pokles hladiny PER1 proteinu v 6:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$) a nárůst byl významný ve 20:00 (vs. 8:00, $p < 0,01$). Na dlouhé fotoperiodě nebyly prokázány významné rozdíly mezi jednotlivými hodnotami (graf 3a).

V M-SCN nastal významný pokles hladin PER1 proteinu na dlouhé fotoperiodě v 6:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$), zatímco na krátké fotoperiodě ve 22:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$).

Hladina PER1 proteinu tak dosahovala maximálních hodnot na dlouhé fotoperiodě od 16:00 do 2:00, na krátké fotoperiodě pouze od 16:00 do 20:00 (graf 3b).

V C-SCN nastal na krátké fotoperiodě pokles v 0:00 (vs. 20:00, $p < 0,05$) a vzestup z nízkých nočních hladin ve 14:00 (vs. 12:00, $p < 0,05$). Na dlouhé fotoperiodě nebyl podobně jako v R-SCN nalezen významný rozdíl mezi hladinami PER1 proteinu, a proto nelze vzájemně porovnat dobu nárůstu a poklesu (graf 3c).





Graf 3: Denní profily hladin PER1 proteinů v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y počet PER1 imunopozitivních buněk. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat ± S.E.M.

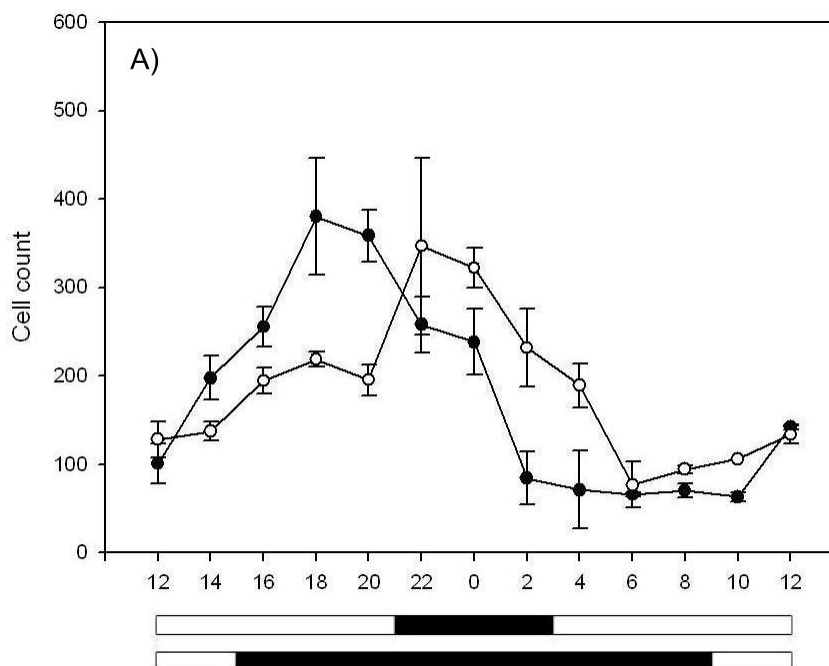
4.1.4. Vliv fotoperiody na profil hladin proteinu PER2

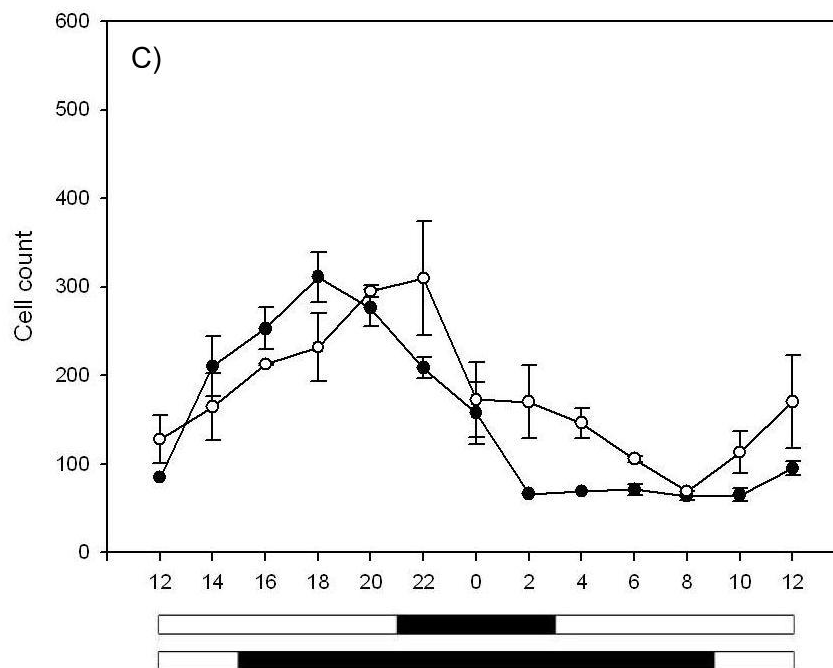
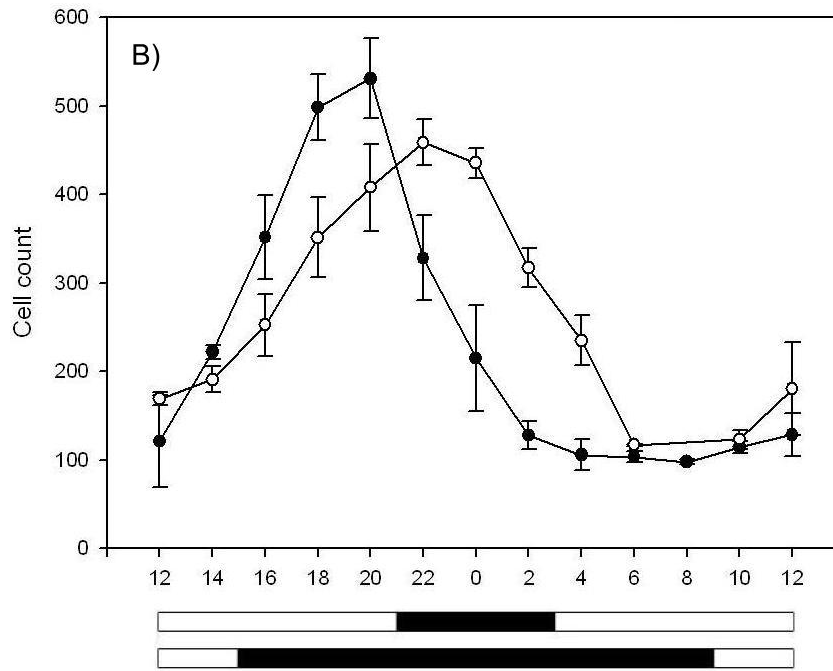
Při srovnání profilů hladin PER2 proteinů na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času v R ($F = 10,4$; $p < 0,01$), M ($F = 26,0$; $p < 0,01$) i C ($F = 9,0$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný pouze v M-SCN ($F = 5,0$; $p < 0,05$), zatímco v R ($F = 0,196$; $p = 0,7$) a C ($F = 1,9$; $p = 0,2$) SCN nikoliv. Interakční efekt byl významný v R ($F = 3,4$; $p < 0,01$) a M ($F = 6,0$; $p < 0,01$) SCN, avšak ne v C-SCN ($F = 1,2$; $p = 0,3$).

V R-SCN nastal na dlouhé fotoperiodě významný pokles hladiny PER2 proteinu v 6:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$), zatímco na krátké fotoperiodě již ve 2:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$). K nárůstu hladiny z nízkých hodnot došlo na dlouhé fotoperiodě ve 22:00 (vs. 8:00, $p < 0,01$), avšak na krátké fotoperiodě již v 18:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). Profil hladin PER2 proteinu byl tak na dlouhé fotoperiodě o 4 hodiny fázově předběhnut před profilem na krátké fotoperiodě (graf 4a).

V M-SCN začínaly hladiny PER2 klesat na dlouhé fotoperiodě ve 2:00 (vs. 22:00, $p < 0,05$), zatímco na krátké fotoperiodě již ve 22:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$). K nárůstu došlo na dlouhé fotoperiodě v 18:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$), na krátké v 16:00 (vs. 12:00, $p < 0,01$). Interval vysokých hladin PER2 proteinu byl delší na dlouhé než na krátké fotoperiodě (graf 4b).

V C-SCN se profily hladiny PER2 proteinu na dlouhé a krátké fotoperiodě významně nelišily (graf 4c).





Graf 4: Denní profily hladin PER2 proteinů v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y počet PER2 imunopozitivních buněk. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat ± S.E.M.

4.2. POROVNÁNÍ VLIVU DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S POZVOLNÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PROTEINŮ PER1 A PER2 V SCN

Cílem této části diplomové práce bylo zjistit, jak působí fotoperioda s pozvolným, a tedy přirozené světelné podmínky simulujícím, přechodem světlo/tma na centrální oscilátor v SCN. Expresie hodinových genů Per1 a Per2 a tvorba jejich proteinů byla analyzována jednak na extrémně dlouhé (L, 18:6) a jednak na extrémně krátké (S, 6:18) fotoperiodě, s pozvolným přechodem světlo/tma, kdy stmívání/rozsvěcení trvalo 1,5 hodiny (viz MATERIÁL a METODIKA). Profil hladiny mRNA byl stanoven pomocí *in situ* hybridizace, hladina proteinů pomocí imunocytochemie. Profily hladin mRNA a proteinů byly sledovány v R-, M- a C-SCN.

4.2.1. Vliv fotoperiody na cirkadiánní profil exprese genu Per1

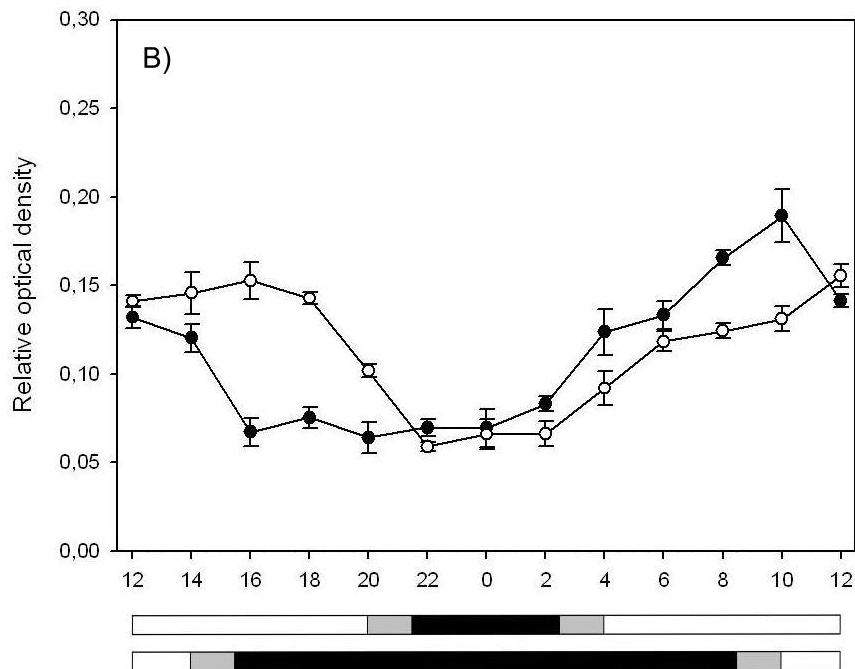
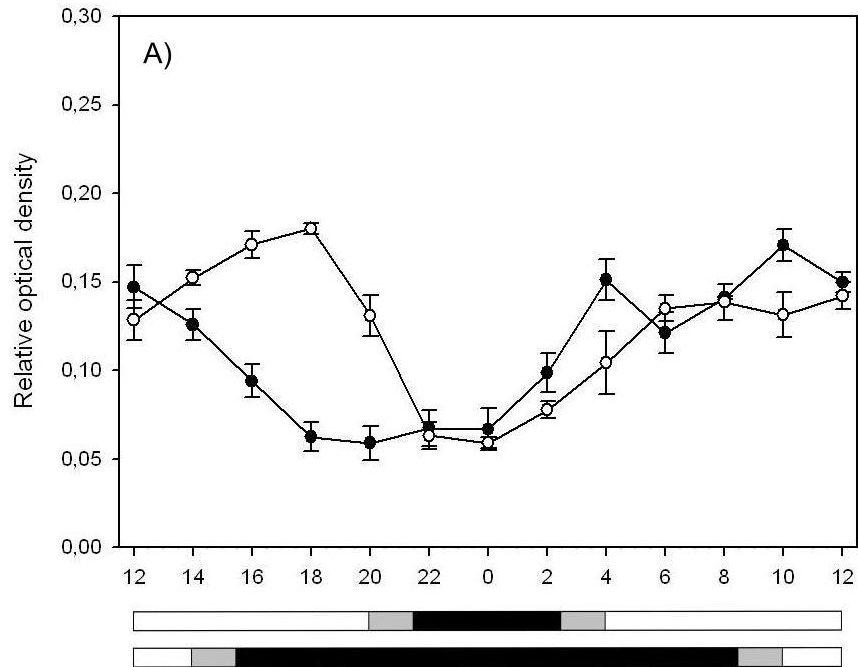
Porovnání exprese genu Per1 na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času v R ($F = 19,4$; $p < 0,01$), M ($F = 11,5$; $p < 0,01$) i C ($F = 18,8$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný v R ($F = 10,7$; $p < 0,01$) a C ($F = 6,1$; $p < 0,01$) SCN, nikoliv však v M-SCN ($F = 0,04$; $p = 0,85$), stejně tak i interakční efekt: R-SCN ($F = 13,3$; $p < 0,01$) a C-SCN ($F = 2,7$; $p < 0,01$).

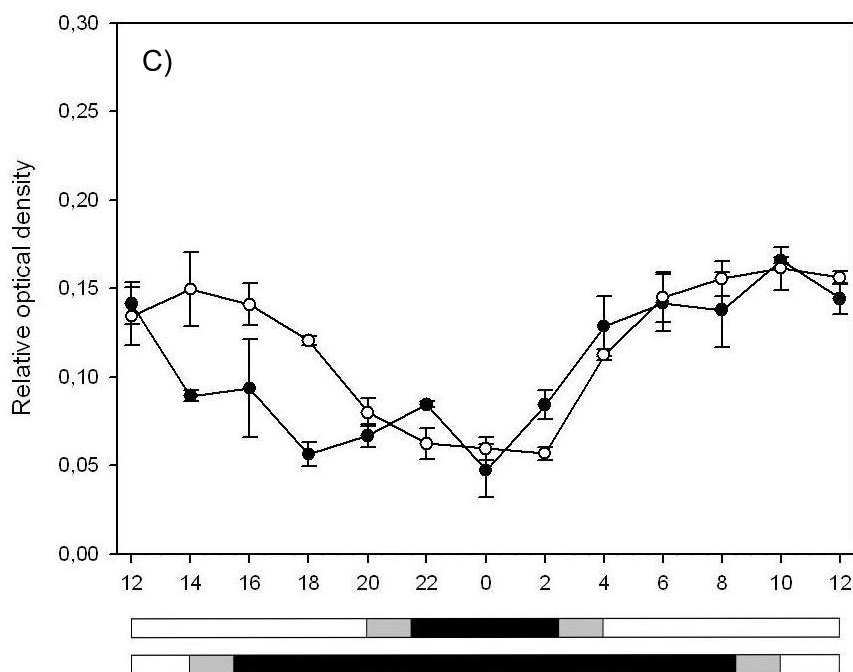
V R-SCN nastal statisticky významný pokles hladiny Per1 mRNA na dlouhé fotoperiodě ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$), zatímco na krátké fotoperiodě již ve 14:00 (vs. 10:00, $p < 0,05$). Minimálních hodnot dosahovala na dlouhé fotoperiodě mezi 22:00 – 2:00, na krátké fotoperiodě mezi 18:00 – 0:00. Hladiny Per1 mRNA začaly významně narůstat na dlouhé fotoperiodě ve 4:00 (vs. 0:00, $p < 0,01$), na krátké ve 2:00 (vs. 20:00, $p < 0,05$) (graf 5a).

V M-SCN sice došlo k poklesu hladiny Per1 mRNA později na dlouhé fotoperiodě (ve 20:00 vs. 18:00, $p < 0,05$) než na krátké (v 16:00 vs. 14:00, $p < 0,01$), avšak nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi oběma fotoperiodami (graf 5b).

V C-SCN nastal významný pokles hladiny mRNA později na dlouhé (ve 20:00 vs. 14:00, $p < 0,05$) než na krátké fotoperiodě (ve 14:00 vs. 10:00, $p < 0,01$). Minima hladiny dosáhly na dlouhé fotoperiodě ve 2:00, na krátké v 0:00. K významnému nárůstu Per1 mRNA došlo ve 4:00 na dlouhé fotoperiodě (vs. 2:00, $p < 0,05$) i na krátké (vs. 0:00, $p < 0,01$) (graf 5c).

V R- i C-SCN přetrvávaly vysoké denní hladiny Per1 mRNA déle na dlouhé než na krátké fotoperiodě.





Graf 5: Denní profily hladin Per1 mRNA v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní optická denzita. Černé úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne, šedivé pozvolné stmívání/rozsvětlení. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 4 zvířat \pm S.E.M.

4.2.2. Vliv fotoperiody na cirkadiánní profil exprese genu Per2

Při srovnání profilů hladin Per2 mRNA pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času v R ($F = 64,6$; $p < 0,01$), M ($F = 78,2$; $p < 0,01$) i C ($F = 74,2$; $p < 0,01$) SCN. Vliv fotoperiody byl také významný jak v R ($F = 18,0$; $p < 0,01$), tak v M ($F = 21,3$; $p < 0,01$) a C ($F = 23,7$; $p < 0,01$) SCN, stejně tak jako interakční efekt (R: $F = 28,6$; $p < 0,01$; M: $F = 35,1$; $p < 0,01$; C: $F = 7,4$; $p < 0,01$).

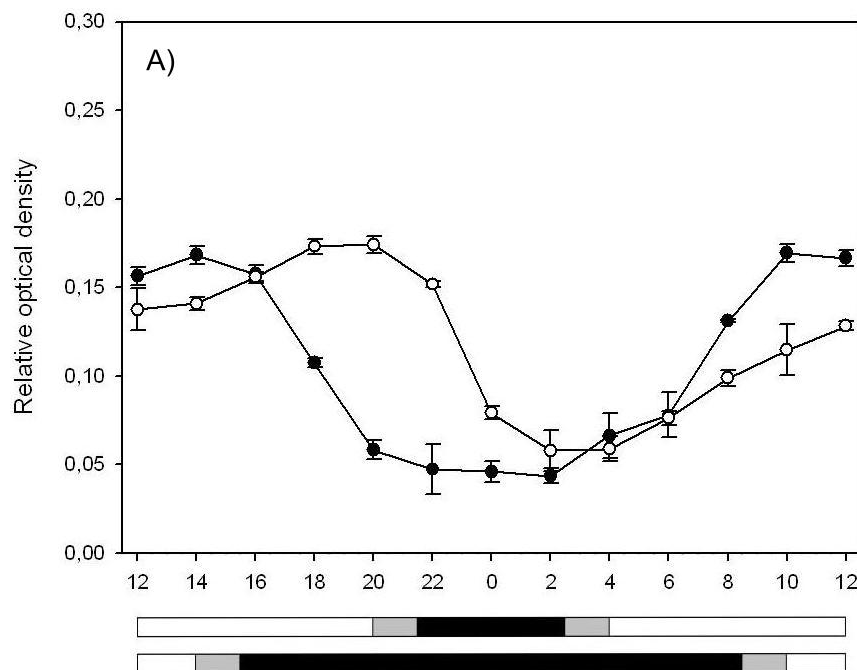
V R-SCN došlo k významnému poklesu hladiny Per2 mRNA na dlouhé fotoperiodě v 0:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$), zatímco na krátké fotoperiodě již v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,01$). Minima dosahovaly hladiny na dlouhé fotoperiodě mezi 2:00 – 6:00, zatímco na krátké již od 20:00 – 4:00. Vzestup hladiny Per2 mRNA byl pomalejší na dlouhé (v 8:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) než na krátké fotoperiodě (v 6:00 vs. 2:00, $p < 0,01$) (graf 6a).

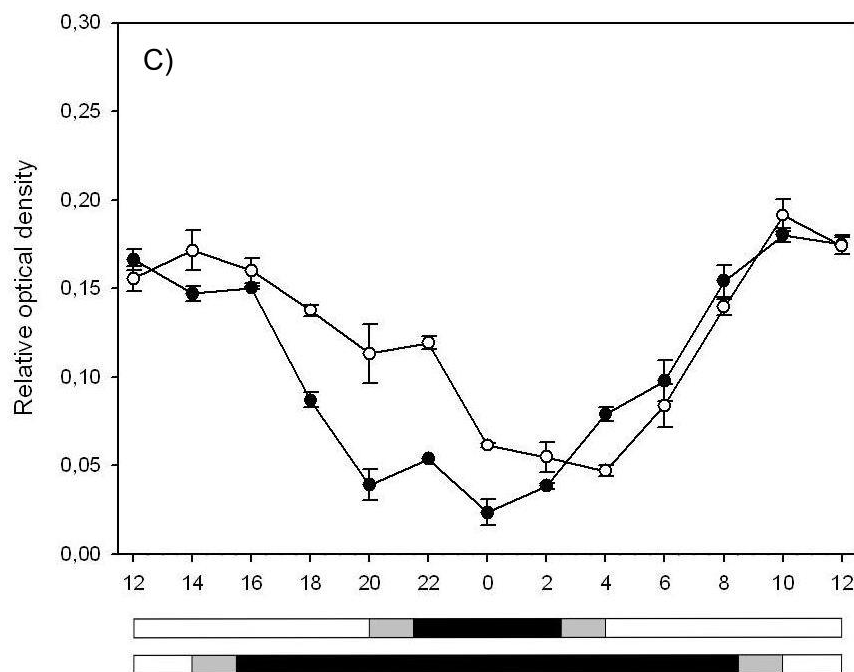
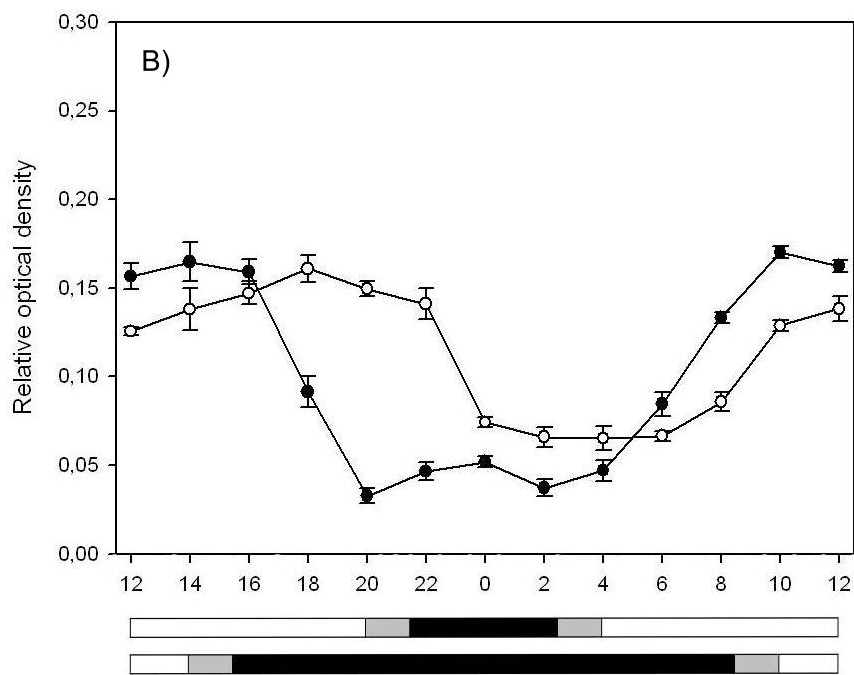
V M-SCN začaly hladiny Per2 mRNA na krátké fotoperiodě klesat již v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,01$), zatímco na dlouhé fotoperiodě až v 0:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$).

Minimálních hodnot dosahovaly hladiny Per2 mRNA na dlouhé fotoperiodě mezi 0:00 – 6:00, na krátké fotoperiodě mezi 20:00 – 4:00. Hladiny stoupaly opět pomaleji na dlouhé (v 10:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) než na krátké fotoperiodě (v 6:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) (graf 6b).

V C-SCN nastal první významný pokles hladiny mRNA na obou fotoperiodách v 18:00 (na dlouhé: vs. 10:00, $p < 0,01$; na krátké: vs. 16:00, $p < 0,01$). Na krátké fotoperiodě klesala hladina strměji. Stoupat začaly hladiny Per2 mRNA na dlouhé fotoperiodě v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,01$), na krátké ve 4:00 (vs. 2:00, $p < 0,05$) (graf 6c).

V R-, M-, i C-SCN nastal pokles i nárůst hladiny Per2 mRNA výrazně dříve na krátké fotoperiodě než na dlouhé.





Graf 6: Denní profily hladin Per2 mRNA v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní optická denzita. Černé úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne, šedivé pozvolné stmívání/rozsvícení. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 4 zvířat \pm S.E.M.

4.2.3. Vliv na cirkadiánní profil hladin PER1 proteinu

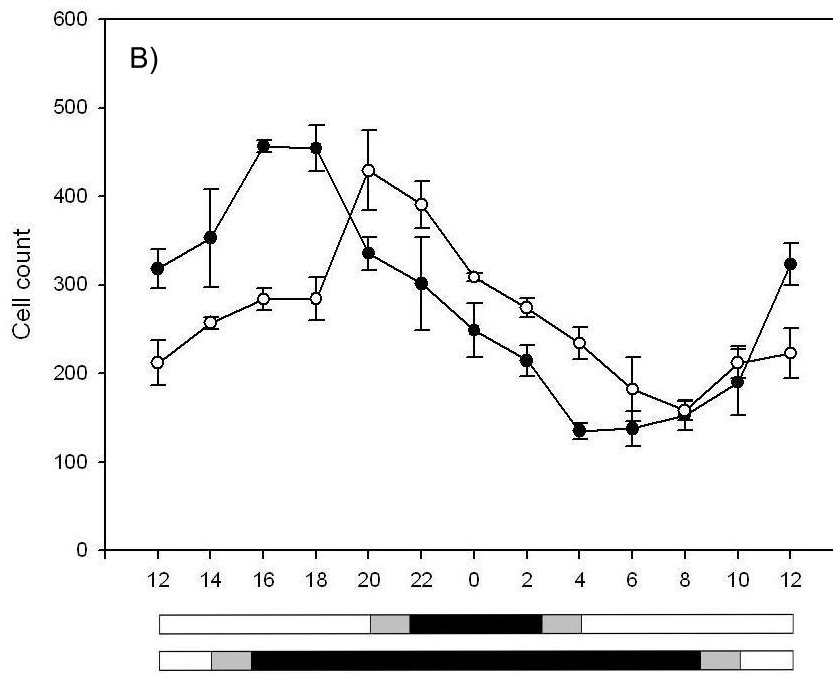
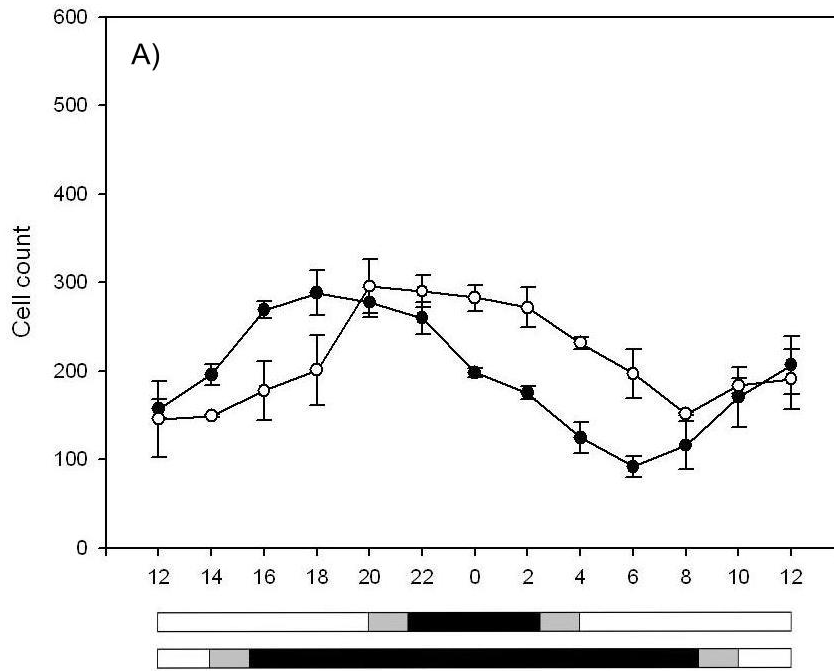
Srovnání profilů hladin PER1 proteinů na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo významný vliv času v R ($F = 8,6$; $p < 0,01$), M ($F = 14,7$; $p < 0,01$) i C ($F = 2,99$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný pouze v C-SCN ($F = 5,8$; $p < 0,05$), zatímco v R ($F = 3,7$; $p = 0,06$) a M ($F = 1,3$; $p = 0,26$) SCN nikoliv. Interakční efekt byl významný v R ($F = 4,2$; $p < 0,01$) a M ($F = 6,1$; $p < 0,01$) SCN, nikoliv však v C-SCN ($F = 1,7$; $p = 0,1$).

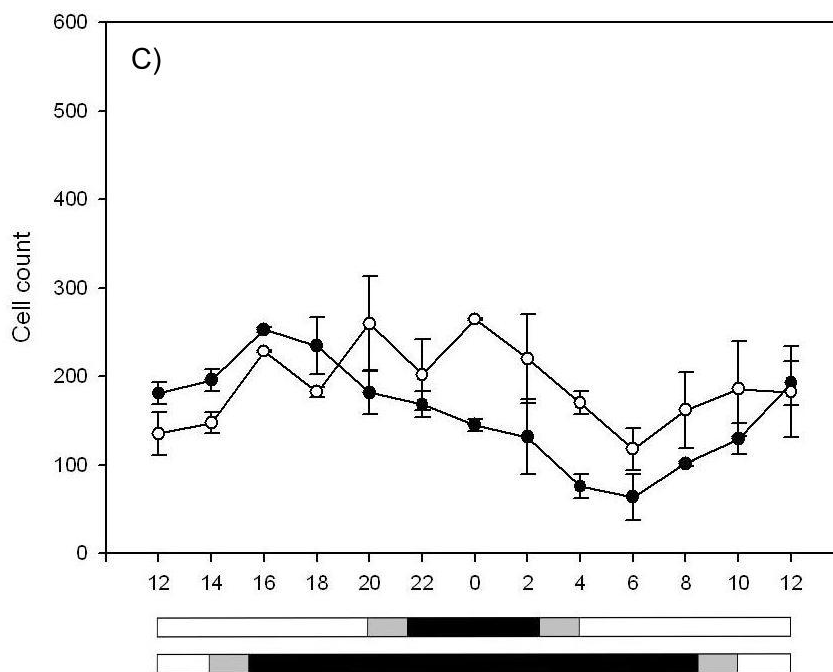
V R-SCN klesaly hladiny PER1 proteinu na dlouhé fotoperiodě mezi 2:00 – 8:00, na krátké již mezi 22:00 – 6:00. Vzestup hladin byl významný na dlouhé fotoperiodě ve 20:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$), na krátké v 16:00 (vs. 8:00, $p < 0,01$) (graf 7a).

V M-SCN hladiny PER1 proteinu na dlouhé fotoperiodě významně klesaly v 0:00 (vs. 20:00, $p < 0,05$), zatímco na krátké již ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,05$). Minima bylo dosaženo na dlouhé fotoperiodě v 8:00, na krátké již ve 4:00. Vzestup hladin byl významný na dlouhé fotoperiodě ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$), na krátké ve 12:00 (vs. 8:00, $p < 0,01$) (graf 7b).

V C-SCN nebyl mezi profily hladiny PER1 proteinu na dlouhé a krátké fotoperiodě významný rozdíl, pravděpodobně především kvůli velkým rozptylům hodnot na dlouhé fotoperiodě (graf 7c).

V R- a M-SCN byl profil rytmu hladiny PER1 proteinu na krátké fotoperiodě podobný tomu na dlouhé, na krátké však byl celý profil fázově posunut přibližně o 2 hodiny vpřed oproti fotoperiodě dlouhé.





Graf 7: Denní profily hladin PER1 proteinů v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y počet PER1 imunopozitivních buněk. Černé úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne, šedivé pozvolné stmívání/rozsvícení. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

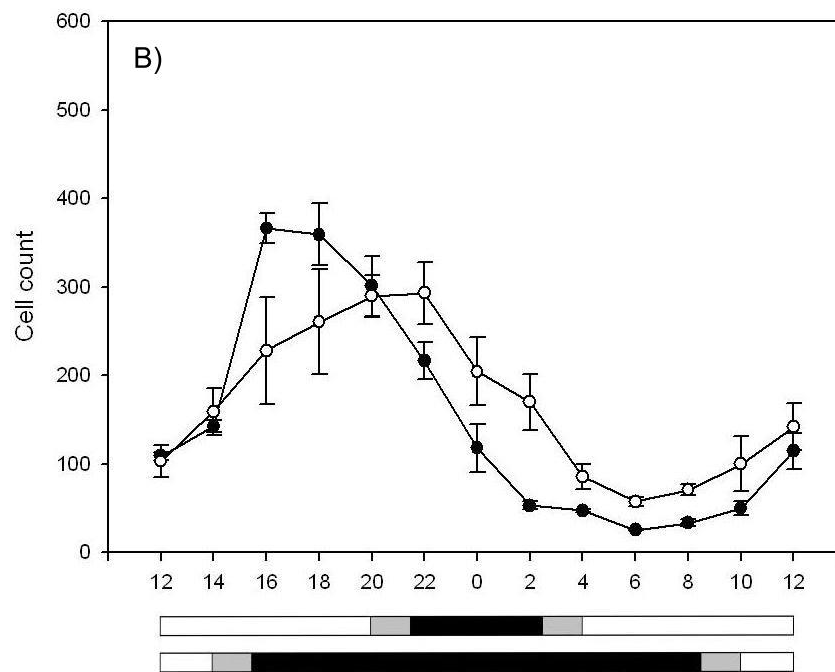
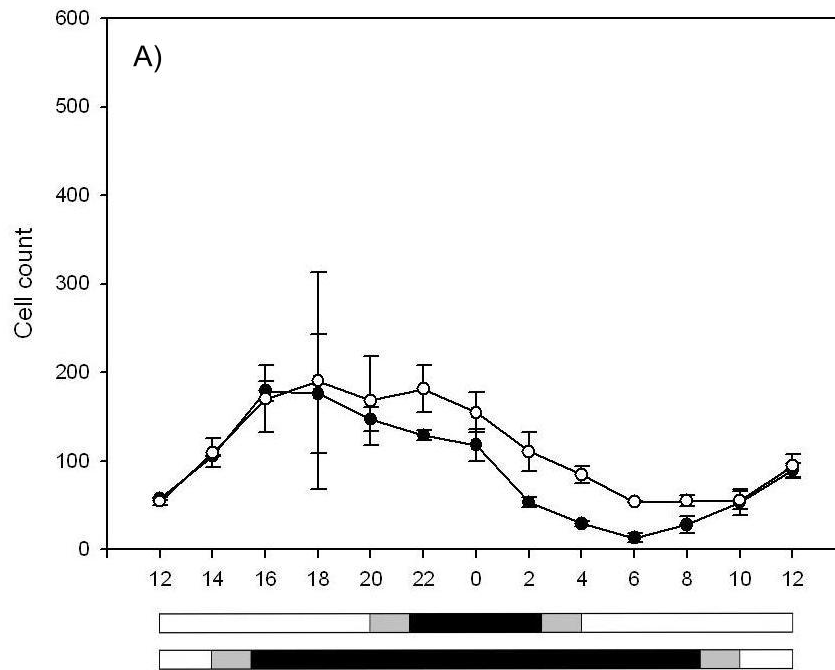
4.2.4. Vliv fotoperiody na cirkadiánní profil hladin PER2 proteinu

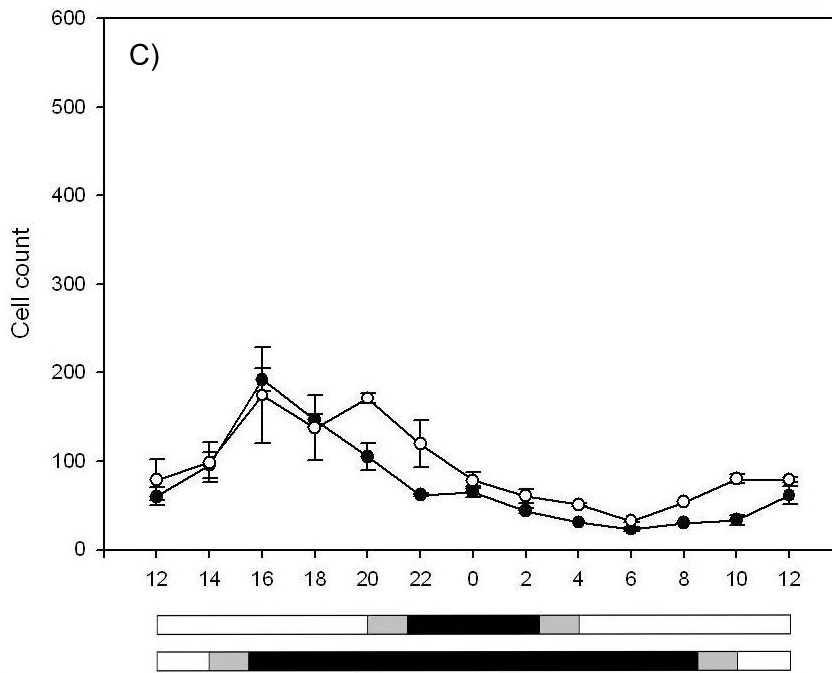
Při srovnání profilů hladin PER2 proteinů na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času v R ($F = 6,8$; $p < 0,01$), M ($F = 26,30$; $p < 0,01$) i C ($F = 98,8$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný v R ($F = 4,3$; $p < 0,05$) a C ($F = 4,8$; $p < 0,05$) SCN, nikoliv však v M-SCN ($F = 2,4$; $p = 0,13$). Interakční efekt byl významný pouze v M-SCN ($F = 3,2$; $p < 0,01$), ne však v R ($F = 0,37$; $p = 0,97$) a C ($F = 0,6$; $p = 0,83$) SCN.

V R-SCN nebyl na dlouhé ani krátké fotoperiodě prokázán významný pokles nebo nárůst v hladině PER2 proteinu (graf 8a).

V M-SCN nastal pokles hladin PER2 proteinu na dlouhé fotoperiodě ve 2:00 (vs. 22:00, $p < 0,05$), na krátké ve 22:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$). K významnému nárůstu došlo na dlouhé i krátké fotoperiodě v 16:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$) (graf 8b).

V C-SCN nebyl prokázán významný pokles a nárůst hladiny PER2 proteinu na dlouhé ani krátké fotoperiodě (graf 8c).





Graf 8: Denní profily hladin PER2 proteinů v R-SCN (A), M-SCN (B) a C-SCN (C) na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y počet PER2 imunopozitivních buněk. Černé úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne, šedivé pozvolné stmívání/rozsvěcení. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat ± S.E.M.

4.3. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA DLOUHÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY JEJICH PROTEINŮ

Dalším cílem diplomové práce bylo zjistit zda charakter přechodu mezi světlem a tmou na dlouhé fotoperiodě ovlivňuje centrální oscilátor v SCN. Proto byly v této části statisticky porovnávány profily hladin Per1 a Per2 mRNA a PER1 a PER2 proteinů na dlouhé fotoperiodě s okamžitým (RA, z angl. rectangular) a s pozvolným (TW, z angl. twilight) přechodem světlo/tma.

4.3.1. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per1 mRNA

Při porovnání profilů hladin Per1 mRNA na dlouhé fotoperiodě s RA a s TW přechodem světlo/tma pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času ve všech částech SCN (R: $F = 47,8$; $p < 0,01$; M: $F = 64,9$; $p < 0,01$; C: $F = 35,5$; $p < 0,01$). Rozdíl mezi fotoperiodou s RA a s TW nebyl významný v R ($F = 0,21$; $p = 0,65$), M ($F = 0,004$; $p = 1,0$) ani v C ($F = 1,1$; $p = 0,31$) SCN, ale významný interakční efekt v R ($F = 2,6$; $p < 0,01$) a C ($F = 2,4$; $p < 0,05$) SCN naznačil významný rozdíl v průběhu profilů na RA a TW v těchto částech SCN. V M-SCN nebyl interakční efekt významný ($F = 0,005$; $p = 1$).

V R-SCN nastal pokles hladiny mRNA na fotoperiodě s RA i TW shodně ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$). Nárůst nastal dříve na fotoperiodě s TW - ve 4:00 (vs. 0:00, $p < 0,01$) než s RA - v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,01$). Hladina Per1 mRNA tedy dosahovala minimálních hodnot déle na fotoperiodě s RA než s TW (viz graf 1a a 5a).

V C-SCN začala významně klesat hladina mRNA dříve na fotoperiodě s RA (v 18:00 vs. 14:00, $p < 0,01$) než s TW (ve 20:00 vs. 14:00, $p < 0,05$). Ke vzestupu došlo na RA i TW fotoperiodě ve 4:00 (RA: vs. 0:00, $p < 0,05$; TW: vs. 2:00, $p < 0,05$), maximálních hodnot dosáhla hladina na obou v 6:00 (viz graf 1c a 5c).

4.3.2. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per2 mRNA

Při srovnání exprese genu Per2 na fotoperiodě s RA a s TW pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času v R ($F = 61,7$; $p < 0,01$), M ($F = 62,1$; $p < 0,01$) i C ($F = 67,0$; $p < 0,01$) SCN. Vliv přechodu světlo/tma nebyl významný v žádné části SCN (R: $F = 0,5$; $p = 0,48$; M: $F = 0,14$; $p = 0,71$; C: $F = 3,27$;

$p = 0,08$). Významný interakční efekt v M ($F = 2,75$; $p < 0,01$) a C ($F = 2,23$; $p < 0,05$) SCN naznačil rozdíl v profilech s RA a s TW v těchto částech SCN, avšak ne v R-SCN ($F = 1,47$; $p = 0,16$).

V M-SCN došlo k významnému poklesu hladiny Per2 mRNA z maximálních hodnot na fotoperiodě s RA ve 22:00 (vs. 20:00, $p < 0,05$), zatímco s TW až v 0:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$). Vzestup hladiny nastal také dříve na fotoperiodě s RA (v 6:00 vs. 4:00, $p < 0,05$), než s TW (v 10:00 vs. 4:00, $p < 0,01$). Interval s nízkými hladinami mRNA byl delší na fotoperiodě s TW než s RA (viz graf 2b a 6b).

V C-SCN začaly hladiny mRNA klesat na fotoperiodě s RA ve 20:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$) a s TW v 18:00 (vs. 10:00, $p < 0,01$). Stoupat začaly hladiny Per2 mRNA na fotoperiodě s RA ve stejnou dobu s TW, tj. v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,01$) (viz graf 2c a 6c).

4.3.3. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER1 proteinu

Srovnání profilů hladin PER1 proteinů na dlouhé fotoperiodě s RA a s TW pomocí dvojné analýzy variance prokázalo významný vliv času v R ($F = 9,8$; $p < 0,01$) a M ($F = 15,6$; $p < 0,01$) SCN, nikoliv však v C-SCN ($F = 1,6$; $p = 0,14$). Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný v C-SCN ($F = 6,5$; $p < 0,05$), avšak v R ($F = 3,2$; $p = 0,08$) a v M ($F = 0,01$; $p = 0,94$) SCN nikoliv. Interakční efekt nebyl významný v žádné části SCN (R: $F = 1,36$; $p = 0,22$; M: $F = 1,6$; $p = 0,14$; C: $F = 0,68$; $p = 0,76$).

V C-SCN nebyl nalezen významný rytmus v hladině PER1 proteinu na fotoperiodě s RA ani s TW, a proto je nelze porovnat (viz graf 3c a 7c).

Profily hladin PER1 proteinů se tedy na dlouhé fotoperiodě s RA a s TW významně nelišily v žádné části SCN.

4.3.4. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER2 proteinu

Při srovnání profilů hladin PER2 proteinů na fotoperiodě s RA a s TW pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času ve všech částech SCN (R: $F = 5,4$; $p < 0,01$; M: $F = 17,5$; $p < 0,01$; C: $F = 4,6$; $p < 0,01$). Rozdíl mezi RA a TW byl statisticky významný v R ($F = 18,6$; $p < 0,01$), M ($F = 47,2$; $p < 0,01$)

i v C ($F = 31,8$; $p < 0,01$) SCN. Interakční efekt byl významný pouze v M-SCN ($F = 2,1$; $p < 0,05$), v R-SCN ($F = 1,0$; $p = 0,45$) a C-SCN nikoliv.

V R-SCN nastal na fotoperiodě s RA významný pokles hladiny PER2 proteinu v 6:00 (vs. 22:00, $p < 0,01$), k nárůstu hladiny z nízkých hodnot došlo ve 22:00 (vs. 8:00, $p < 0,01$). Na fotoperiodě s TW však nebyl významný pokles ani nárůst nalezen (viz graf 4a a 8a).

V M-SCN začala klesat hladina PER2 proteinu na fotoperiodě s RA i s TW ve stejnou dobu, a to ve 2:00 (vs. 22:00, $p < 0,05$). K nárůstu došlo dříve na fotoperiodě s TW (v 16:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) než s RA (v 18:00 vs. 14:00, $p < 0,01$) (viz graf 4b a 8b).

V C-SCN nebyl na fotoperiodě s TW nalezen v profilu hladiny PER2 proteinu významný rytmus, proto nebyla s RA porovnávána (viz graf 4c a 8c).

V R-, M- i C-SCN dosahoval rytmus v hladině PER2 proteinu na dlouhé fotoperiodě s TW výrazně nižší amplitudy než na dlouhé fotoperiodě s RA přechodem.

4.4. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA KRÁTKÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PER1 A PER2 PROTEINŮ

Dalším cílem bylo zjistit, zda charakter přechodu světlo/tma na krátké fotoperiodě ovlivňuje centrální oscilátor v SCN. Za tímto účelem byly statisticky porovnávány profily exprese Per1 a Per2 genů a jejich proteinů na krátké fotoperiodě s TW a s RA.

4.4.1. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per1 mRNA

Porovnání exprese genu Per1 pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času v R ($F = 45,9$; $p < 0,01$), M ($F = 62,3$; $p < 0,01$) i C ($F = 30,3$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi fotoperiodou s RA a s TW byl významný ve všech částech SCN (R: $F = 43,3$; $p < 0,01$; M: $F = 73,4$; $p < 0,01$; C: $F = 27,2$; $p < 0,01$), stejně jako interakční efekt (R: $F = 6,3$; $p < 0,01$; M: $F = 7,0$; $p < 0,01$; C: $F = 4,0$; $p < 0,01$).

V R-SCN nastal na fotoperiodě s TW statisticky významný pokles hladiny Per1 mRNA ve 14:00 (vs. 10:00, $p < 0,01$), zatímco s RA až v 16:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). Vzestup byl významný také dříve na fotoperiodě s TW (ve 2:00 vs. 20:00, $p < 0,05$) než s RA (ve 4:00 vs. 22:00, $p < 0,05$) (viz graf 1a a 5a).

V M-SCN začala hladina mRNA na fotoperiodě s TW klesat ve 12:00 (vs. 10:00, $p < 0,01$) a s RA až ve 14:00 (vs. 12:00, $p < 0,01$). Nárůst hladin nastal na fotoperiodě s TW ve 4:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$), s RA v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,05$) (viz graf 1b a 5b).

V C-SCN nastal pokles hladiny mRNA ve stejnou dobu na fotoperiodě s TW i s RA, tj. ve 14:00. Vzestup hladin byl na fotoperiodě s TW významný ve 4:00 (vs. 0:00, $p < 0,01$), s RA v 6:00 (vs. 4:00, $p < 0,01$) (viz graf 1c a 5c).

Výsledky tak prokázaly, že v R-, M- i C-SCN je profil exprese Per1 na krátké fotoperiodě s TW fázově předběhnut ve srovnání s profilem na RA přibližně o 2 hodiny.

4.4.2. Vliv přechodu světlo/tma na profily Per2 mRNA

Při srovnání profilů hladin Per2 mRNA pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času v R ($F = 95,7$; $p < 0,01$), M ($F = 118,3$; $p < 0,01$) i C ($F = 111,6$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi fotoperiodou s RA a s TW nebyl významný v žádné části SCN (R: $F = 0,04$; $p = 0,84$; M: $F = 1,2 \cdot 10^{-5}$; $p = 0,99$; C: $F = 0,0$; $p = 1$).

Významný interakční efekt v R ($F = 4,5$; $p < 0,01$) a M ($F = 6,8$; $p < 0,01$) SCN naznačil, že profily se v těchto částech SCN mohou na RA a TW lišit. V C-SCN nebyl interakční efekt významný ($F = 0,0$; $p = 1$).

V R-SCN byl pokles hladin Per2 mRNA významný na fotoperiodě s TW i s RA ve stejnou dobu, tj. v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,01$). Vzestup hladiny nastal dříve na fotoperiodě s TW (v 6:00 vs. 2:00, $p < 0,05$) než s RA (v 8:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) (viz graf 2a a 6a).

V M-SCN nastal pokles hladiny mRNA na fotoperiodě s TW i s RA shodně v 18:00 (vs. 16:00, $p < 0,01$). Hladiny však opět začaly narůstat dříve na fotoperiodě s TW (v 6:00 vs. 4:00, $p < 0,01$) než s RA (v 8:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) (viz graf 2b a 6b).

V R- a M-SCN nebyl pokles hladin Per2 mRNA na krátké fotoperiodě typem přechodu světlo/tma ovlivněn, vzestup hladin však nastal na fotoperiodě s TW o 2 hodiny dříve než s RA. V důsledku toho byl interval nízkých nočních hladin delší na fotoperiodě s RA než s TW.

4.4.3. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER1 proteinu

Srovnání profilů hladin PER1 proteinů na fotoperiodě s RA a s TW pomocí dvojné analýzy variance prokázalo významný vliv času v R ($F = 22,5$; $p < 0,01$), M ($F = 30,4$; $p < 0,01$) i C ($F = 13,4$; $p < 0,01$) SCN. Rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou byl významný v R ($F = 10,8$; $p < 0,01$) a C ($F = 4,2$; $p < 0,05$) SCN, nikoliv však v M-SCN ($F = 0,5$; $p = 0,46$). Interakční efekt byl významný v R ($F = 2,4$; $p < 0,05$) a M ($F = 2,4$; $p < 0,05$) SCN, nikoliv však v C-SCN ($F = 1,5$; $p = 0,16$).

V R-SCN začala hladina PER1 proteinu klesat na fotoperiodě s RA i s TW ve stejnou dobu, tj. ve 2:00 (RA vs. 20:00, $p < 0,05$; TW vs. 18:00, $p < 0,05$). Nárůst byl významný dříve na fotoperiodě s RA (ve 14:00 vs. 8:00, $p < 0,01$) než s TW (v 16:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) (viz graf 3a a 7a).

V M-SCN nastal na obou fotoperiodách pokles hladin PER1 proteinu ve stejnou dobu, tj. ve 22:00 (RA: vs. 20:00, $p < 0,05$; TW vs. 18:00, $p < 0,05$), stejně jako jejich vzestup (ve 12:00 vs. 8:00, TW: $p < 0,01$, RA: $p < 0,05$) (viz graf 3b a 7b).

V C-SCN sice nastal pokles hladiny PER1 proteinu na fotoperiodě s TW dříve než s RA, statisticky významný tento rozdíl však nebyl (viz graf 3c 7c).

4.4.4. Vliv přechodu světlo/tma na profily hladin PER2 proteinu

Při srovnání profilů hladin PER2 proteinů na krátké fotoperiodě s RA a s TW pomocí dvojné analýzy variance byl významný vliv času v R ($F = 17,0$; $p < 0,01$), M ($F = 39,7$; $p < 0,01$) i C ($F = 21,8$; $p < 0,01$) SCN. Statisticky významný rozdíl mezi RA a TW byl prokázán také ve všech částech SCN (R: $F = 57,7$; $p < 0,01$; M: $F = 42,5$; $p < 0,01$; C: $F = 82,8$; $p < 0,01$), stejně tak jako interakční efekt (R: $F = 2,5$; $p < 0,05$; M: $F = 2,1$; $p < 0,05$; C: $F = 3,7$; $p < 0,01$).

V R-SCN začaly hladiny PER2 proteinu významně klesat na fotoperiodě s RA ve 22:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$), na fotoperiodě s TW až ve 2:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$). Nárůst nastal na fotoperiodě s RA ve 14:00 (vs. 10:00, $p < 0,05$), s TW v 16:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$) (viz graf 4a a 8a).

V M-SCN byl pokles hladin PER2 proteinu významný na fotoperiodě s TW i s RA ve 22:00 (RA: vs. 20:00, $p < 0,01$; TW: vs. 18:00, $p < 0,01$). K významnému nárůstu došlo na fotoperiodě s RA i s TW také ve stejnou dobu, tj. v 16:00 (RA: vs. 12:00, $p < 0,01$; TW: vs. 6:00, $p < 0,01$) (viz graf 4b a 8b).

V C-SCN byl pokles hladin PER2 proteinu významný dříve na fotoperiodě s TW (ve 20:00 vs. 16:00, $p < 0,01$) než s RA (ve 22:00 vs. 18:00, $p < 0,01$). Nárůst byl rychlejší na fotoperiodě s RA, takže byl významný již ve 14:00 (vs. 12:00, $p < 0,01$), zatímco na fotoperiodě s TW až v 16:00 (vs. 12:00, $p < 0,01$) (viz graf 4c a 8c).

V R-, M- i C-SCN vykazoval rytmus v hladině PER2 proteinu výrazně větší amplitudu na krátké fotoperiodě s RA ve srovnání s TW.

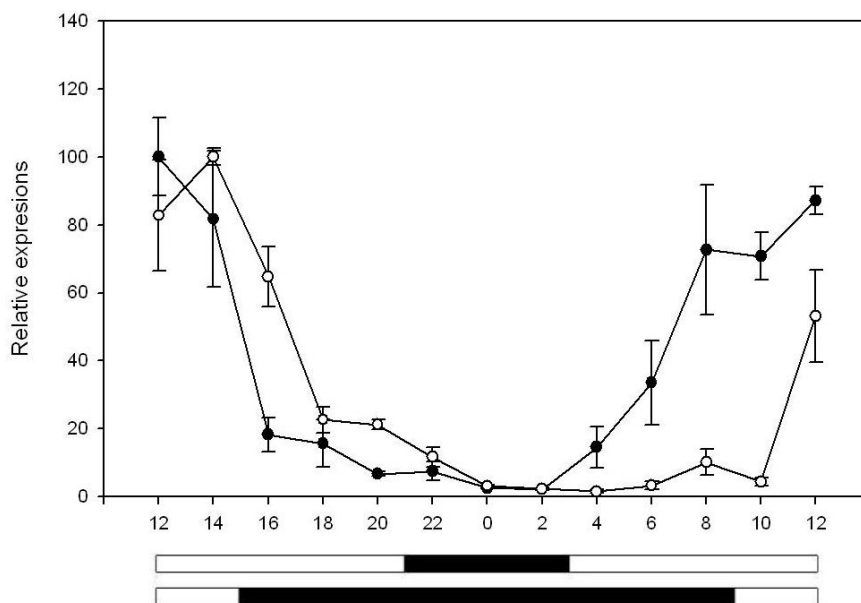
4.5. VLIV FOTOPERIODY NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH

Cílem této části diplomové práce bylo zjistit, zda délka fotoperiody ovlivňuje periferní cirkadiánní oscilátor v játrech. Byly proto sledovány denní profily exprese několika vybraných hodinových genů v játrech myší chovaných na dlouhé (L 18:6) a krátké (S 6:18) fotoperiodě a následně porovnávány. V tomto experimentu byl přechod mezi světlem a tmou u obou fotoperiod náhlý. Pomocí kvantitativní real-time PCR byla analyzována exprese hodinových genů *Rev-Erb α* , *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Cry1* a hodinami kontrolovaného genu *DBP*.

4.5.1. Exprese genu *Rev-Erb α*

Při srovnání profilů exprese *Rev-erb α* na dlouhé a krátké fotoperiodě odhalila dvojná analýza variance významný vliv času ($F = 29,4$; $p < 0,01$). Rozdíl mezi oběma skupinami byl též významný ($F = 5,8$; $p < 0,05$), stejně jako interakční efekt ($F = 7,4$; $p < 0,01$).

Na dlouhé fotoperiodě došlo k prvnímu významnému poklesu hladiny *Rev-Erb α* v 16:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$) a pokles pokračoval až do 18:00. Na krátké fotoperiodě začala hladina klesat také v 16:00 (vs. 14:00; $p < 0,01$). Hladina mRNA začala stoupat na dlouhé fotoperiodě ve 12:00 (vs. 10:00; $p < 0,01$), zatímco na krátké již v 8:00 (vs. 6:00; $p < 0,01$). Na dlouhé fotoperiodě byl tedy interval s nízkou hladinou *Rev-Erb α* mRNA výrazně delší než na fotoperiodě krátké. Kromě toho byl profil exprese *Rev-Erb α* na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn za profilem na krátké fotoperiodě (viz graf 9).

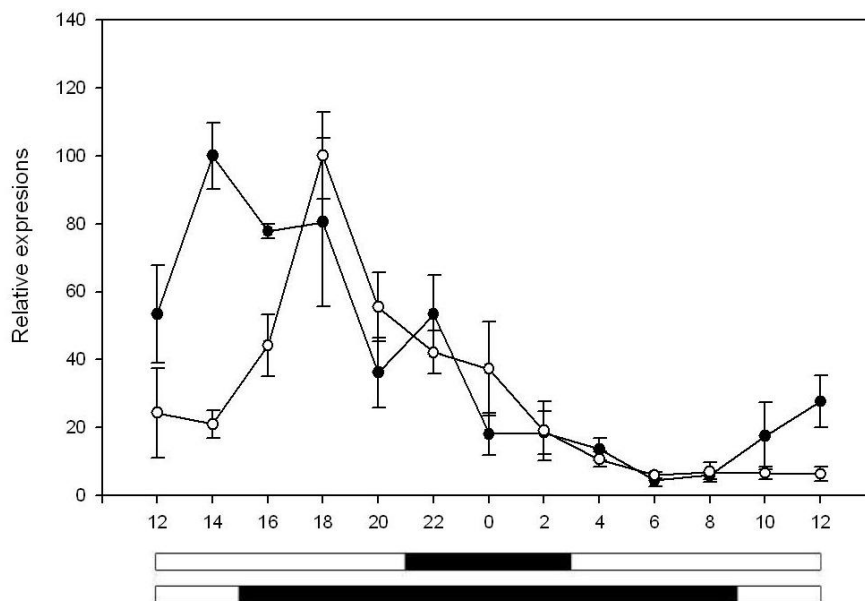


Graf 9: Denni profily exprese genu *Rev-Erb α* v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

4.5.2. Exprese genu Per1

Pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času ($F = 15,4$; $p < 0,01$), rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 5,4$; $p < 0,05$) i interakční efekt ($F = 4,2$; $p < 0,01$).

Na krátké fotoperiodě byl pokles hladiny Per1 mRNA významný na obou fotoperiodách ve stejnou dobu, tj. ve 20:00 (na krátké vs. 14:00, $p < 0,01$; na dlouhé vs. 18:00, $p < 0,01$). Nárůst hladiny z nízkých hodnot nastal na krátké fotoperiodě ve 12:00 (vs. 8:00, $p < 0,05$), zatímco na dlouhé až v 18:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). Na krátké fotoperiodě byl tak interval vysokých hladin Per1 mRNA v játrech delší než na dlouhé fotoperiodě. Kromě poklesu, který nastal ve stejný čas, byl profil hladin mRNA na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn za profilem na krátké fotoperiodě.

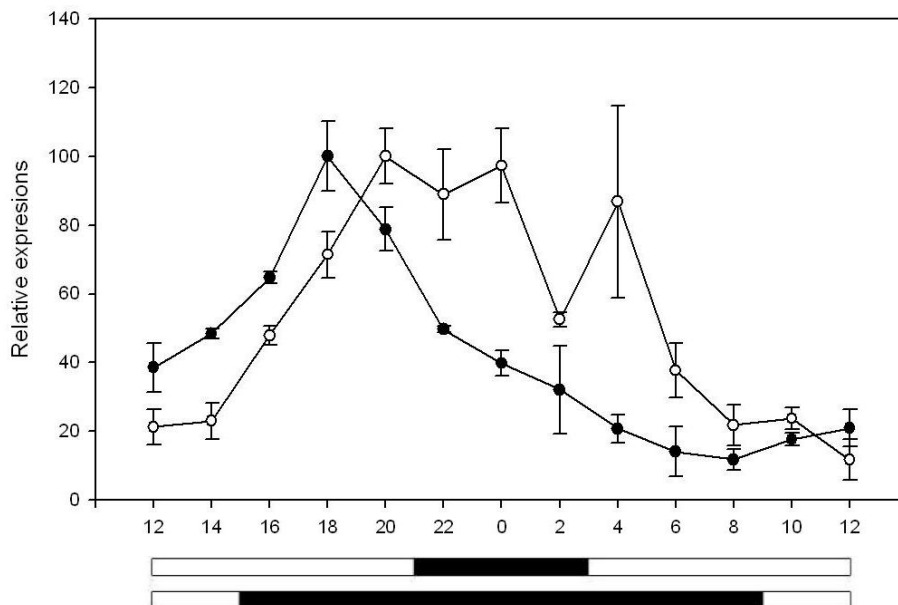


Graf 10: Denní profily exprese genu Per1 v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

4.5.3. Exprese genu Per2

Porovnání profilů exprese genu Per2 na dlouhé a krátké fotoperiodě pomocí dvojné analýzy variance odhalilo významný vliv času ($F = 19,7$; $p < 0,01$). Rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný ($F = 0,46$; $p = 0,5$), avšak významný interakční efekt ($F = 6,8$; $p < 0,01$) naznačil, že se oba profily významně liší svým průběhem.

Na krátké fotoperiodě nastal významný pokles hladiny Per2 mRNA ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,05$), zatímco na dlouhé fotoperiodě až ve 2:00 (vs. 20:00, $p < 0,01$). Na krátké fotoperiodě došlo k významnému vzestupu hladiny ve 14:00 (vs. 8:00, $p < 0,05$), na dlouhé až v 18:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). Na dlouhé fotoperiodě byl tedy celý profil hladiny Per2 mRNA v porovnání s krátkou fotoperiodou fázově opožděn.

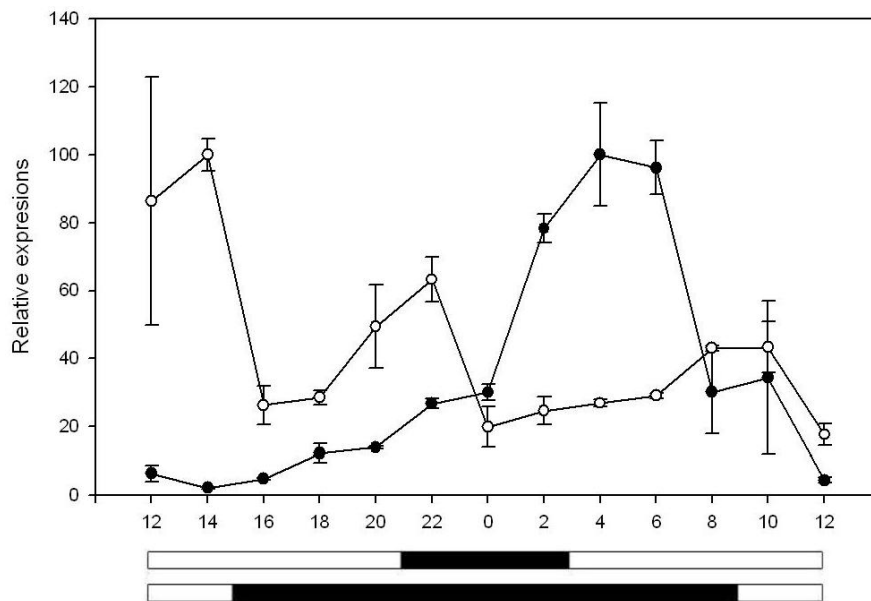


Graf 11: Denní profily exprese genu Per2 v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

4.5.4. Exprese genu Bmal1

Dvojná analýza variance odhalila významný vliv času ($F = 6,2$; $p < 0,01$). Ačkoliv rozdíl mezi skupinami významný nebyl ($F = 1,16$; $p = 0,29$), naznačil významný interakční efekt ($F = 13,4$; $p < 0,01$), že se profily exprese Bmal1 na dlouhé a krátké fotoperiodě významně lišily.

Na krátké fotoperiodě hladina Bmal1 mRNA významně klesla v 8:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$) a významný nárůst nastal až ve 2:00 (vs. 0:00, $p < 0,01$). Na fotoperiodě dlouhé došlo k poklesu v 16:00 (vs. 14:00, $p < 0,01$). K nárůstu hladin z nízkých hodnot došlo již ve 12:00, avšak statistické významnosti dosáhl teprve ve 14:00 (vs. 10:00, $p < 0,01$) pravděpodobně díky velkému rozptylu hodnot naměřených ve 12:00. Z výsledků je zřejmé, že profily Bmal1 mRNA jsou na dlouhé a krátké fotoperiodě téměř v antifázi.

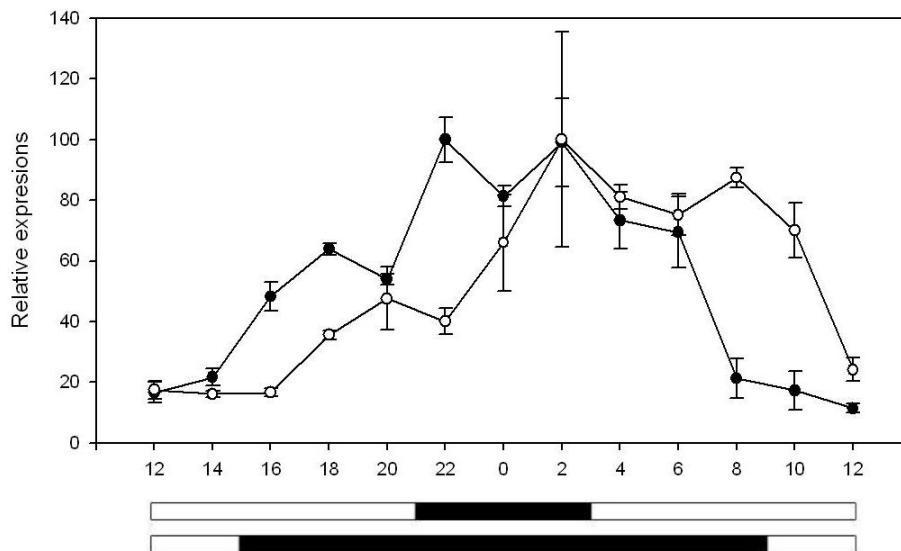


Graf 12: Denní profily exprese genu Bmal1 v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

4.5.5. Expres genu Cry1

Pomocí dvojné analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu Cry1 ($F = 16,8$; $p < 0,01$), rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou ($F = 24,1$; $p < 0,01$) a významný interakční efekt ($F = 7,4$; $p < 0,01$).

Na krátké fotoperiodě nastal významný pokles hladiny Cry1 mRNA v 8:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$), zatímco na dlouhé fotoperiodě až 12:00 (vs. 10:00, $p < 0,05$). Vzestup hladin byl na obou fotoperiodách pozvolný, na krátké fotoperiodě byl významný v 16:00 (vs. 14:00, $p < 0,05$), na dlouhé až v 0:00 (vs. 16:00, $p < 0,05$). Profil hladin Cry1 mRNA byl tedy na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn přibližně o 4 hodiny za profilem na krátké fotoperiodě.

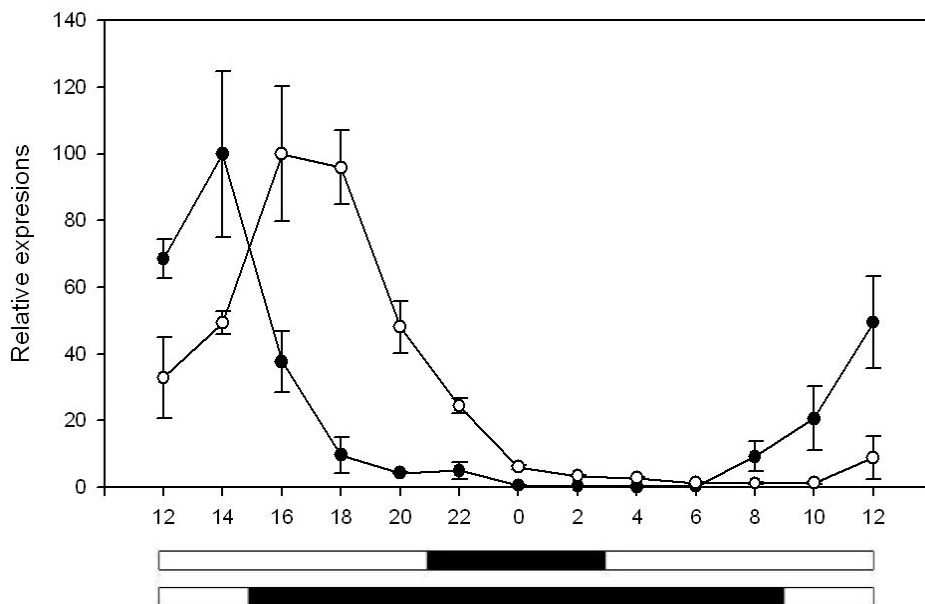


Graf 13: Denní profily exprese genu Cry1 v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

4.5.6. Exprese hodinami kontrolovaného genu DBP

Dvojná analýza variance odhalila významný vliv času na expresi hodinami kontrolovaného genu DBP ($F = 20,6$; $p < 0,01$), významný rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou ($F = 6,8$; $p < 0,01$) a významný interakční efekt ($F = 11,6$; $p < 0,01$).

Na krátké fotoperiodě došlo k poklesu hladin DBP mRNA v 16:00 (vs. 6:00, $p < 0,01$), na dlouhé fotoperiodě ve 20:00 (vs. 18:00, $p < 0,01$). K nárůstu došlo také dříve na krátké (ve 12:00 vs. 6:00, $p < 0,01$) než na dlouhé fotoperiodě (ve 14:00 vs. 10:00, $p < 0,01$). Profil rytmu hladiny DBP mRNA byl tak na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn přibližně o 2 hodiny oproti rytmu na krátké fotoperiodě.



Graf 14: Denní profily exprese hodinami kontrolovaného genu DBP v játrech na dlouhé fotoperiodě (L 18:6, prázdná kolečka) a krátké fotoperiodě (S 6:18, černá kolečka). Na ose x je vyznačen čas, na ose y relativní množství mRNA. Plné úsečky pod osou x znázorňují délku tmavé části dne. Data v každém časovém bodě představují průměr ze 3 zvířat \pm S.E.M.

5. DISKUZE

5.1. VLIV DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S NÁHLÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA CIRKADIÁNNÍ RYTMUS EXPRESE GENŮ *Per1* A *Per2* A HLADINY JEJICH PROTEINŮ V SCN

Skutečnost, že délka světlé části dne (fotoperioda) velmi výrazně ovlivňuje centrální molekulární oscilátor, je známá již poměrně dlouho. Přesto však mechanismus, pomocí něhož dochází k synchronizaci tohoto molekulárního oscilátoru s délkou fotoperiody, nebyl ještě zcela objasněn a přetrvává zde mnoho otázek. Naším cílem proto bylo detailně charakterizovat profil exprese *Per1* a *Per2* genů a hladiny jejich proteinů, a to jednak na fotoperiodě extrémně dlouhé, tj. s 18 hodinami světla, a jednak extrémně krátké, kdy světlá část dne trvala pouze 6 hodin. *Per1* a *Per2* geny totiž patří mezi základní geny zpětnovazebné smyčky. Navíc u nich bylo prokázáno, že jsou přímo ovlivnitelné světlem (Shigeyoshi *et al.*, 1997).

Výsledky předkládané diplomové práce prokázaly, že na extrémně dlouhé i krátké fotoperiodě vykazuje profil exprese *Per1* i *Per2* genů významný cirkadiánní rytmus, a to ve všech částech SCN, tj. v R-, M- i C-SCN. Jak u *Per1*, tak i u *Per2* mRNA byl ve všech uvedených částech SCN interval s nízkými hladinami delší na krátké fotoperiodě než na dlouhé. Naopak vysoké hladiny *Per1* a *Per2* mRNA (s výjimkou *Per2* mRNA v R-SCN) přetrvávaly déle na dlouhé než na krátké fotoperiodě. Rytmus hladiny *Per2* mRNA se navíc na dlouhé a krátké fotoperiodě lišil ještě jedním rysem, a to velikostí amplitudy. Amplituda byla na krátké fotoperiodě větší než na dlouhé, a to opět ve všech částech SCN.

Hladiny *Per1* mRNA v R-, M-, i C-SCN poměrně výrazně korelovaly s režimem světlo/tma. Na dlouhé fotoperiodě byl interval s nízkými hladinami *Per1* exprese totožný s délkou a fází tmavé části dne. Pokles hladiny *Per1* mRNA byl na obou fotoperiodách vždy významný již v bodě odběru zvířat před zhasnutím. Naopak pokles hladiny *Per2* mRNA nastal vždy (pouze s výjimkou v C-SCN na dlouhé fotoperiodě) až po zhasnutí. Profily *Per2* mRNA byly tak ve všech částech SCN na dlouhé i krátké fotoperiodě fázově opožděny za profily *Per1* mRNA, a to přibližně o 2 až 4 hodiny.

Srovnáme-li denní profily hladin mRNA v R-, M, a C-SCN, nalezneme další rozdíl mezi dlouhou a krátkou fotoperiodou. Pro hladiny *Per1* i *Per2* mRNA platí, že na krátké

fotoperiodě docházelo k poklesu i vzestupu hladin ve všech částech SCN zároveň. Avšak na dlouhé fotoperiodě nastal pokles hladin mRNA nejdříve v C-SCN, poté v M-SCN a až nejpozději v R-SCN. Totéž platilo pro dosažení minima, nárůst i dosažení maxima. V C-SCN tedy docházelo k expresi s výrazným předstihem před R-SCN.

Profily hladin PER1 proteinů se na dlouhé a krátké fotoperiodě významně lišily pouze v M-SCN, kdy interval s vysokou hladinou trval déle na dlouhé než na krátké fotoperiodě. Amplituda rytmu byla větší na krátké než na dlouhé fotoperiodě. V R- a C-SCN měly sice profily podobnou tendenci jako v M-SCN, avšak rozdíly zde nebyly významné. To může být z části způsobeno i skutečností, že v R- a C-SCN měly profily výrazně menší amplitudu než v M-SCN. Velmi podobný průběh měl i profil hladiny proteinu PER2. V M-SCN přetrvávaly vysoké hladiny proteinu déle na dlouhé fotoperiodě než na krátké. Větší amplituda rytmu byla opět na krátké fotoperiodě. Porovnání cirkadiálních profilů proteinů PER1 a PER2 v M-SCN ukázalo, že se nápadně shodují. A to navzdory rozdílům v profilech Per1 a Per2 mRNA (profil Per2 mRNA je fázově opožděn za profilem Per1 mRNA). Je tedy zřejmé, že translace Per1 mRNA je regulována odlišným způsobem než translace Per2 mRNA. Díky tomu je umožněna současná dostupnost jejich proteinů. Ta je ostatně nezbytným předpokladem pro jejich spojování ve funkční dimer.

Naše výsledky se do značné míry shodují s údaji v literatuře. Již dříve provedené studie prokázaly, že informace o délce fotoperiody je zakódována přímo v centrálním molekulárním oscilátoru. Delší interval s vysokými hladinami Per1 mRNA (Sumová *et al.*, 2003) i Per2 mRNA (Tournier *et al.*, 2003) byl prokázán u potkanů chovaných na dlouhé fotoperiodě s 16 hodinami světla v porovnání s krátkou fotoperiodou s 8 hodinami světla. U myši Steinlechner *et al.*, 2002 došel při porovnání profilů exprese Per1 a Per2 mRNA na dlouhé a krátké fotoperiodě ke stejnému závěru, pokusy však v tomto případě nebyly prováděny v podmínkách stále tmy při odběrech zvířat. Nebylo proto možné vyloučit přímý indukční efekt světla. U proteinů byly dosud popsány déle přetrvávající vysoké hladiny PER1 na dlouhé fotoperiodě s 16 hodinami světla ve srovnání s krátkou fotoperiodou s 8 hodinami světla pouze u potkanů (Sumová 2002).

Naše výsledky dále ukázaly, že na dlouhé fotoperiodě jsou profily hladin Per1 a Per2 mRNA v R-, M-, a C-SCN vzájemně fázově posunuty, zatímco na krátké fotoperiodě byl rytmus v expresi Per1 a Per2 synchronní ve všech částech SCN. Na dlouhé fotoperiodě byla genová exprese mezi jednotlivými částmi SCN výrazně fázově posunuta: nárůst exprese se objevoval nejdříve v C-SCN, naopak pokles nejpozději

v R-SCN. To potvrzuje domněnku, že i v tak malé struktuře jako je SCN jsou samostatně oscilující buňky organizovány do více skupin (Inagaki *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2008). Proto je třeba upustit od představy SCN jako jednotného útvaru centrálně generujícího rytmické oscilace a při charakterizaci genové exprese je třeba jasně rozlišovat o kterou konkrétní část se jedná. Naše výsledky však podporují pouze částečně teorii navrženou Johnstonem (2005), která předpokládá, že na dlouhé fotoperiodě je za začátek aktivity zodpovědná spíše R-SCN a za konec aktivity spíše C-SCN. V našich pokusech k poklesu Per1 mRNA docházelo téměř současně ve všech třech částech SCN, a to v době těsně před očekávaným zhasnutím a tím i nástupem pohybové aktivity. K potvrzení navržené teorie je tak zapotřebí ještě dalších studií. Zatím můžeme pouze uzavřít, že rozdílná fáze rytmu exprese hodinových genů v různých částech SCN pravděpodobně souvisí se synchronizací cirkadiánního systému na délku fotoperiody.

5.2. VLIV DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODY S POZVOLNÝM PŘECHODEM SVĚTLO/TMA NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PROTEINŮ PER1 A PER2 V SCN

Naprostá většina experimentů doposud se zabývajících vlivem fotoperiody na centrální oscilátor byla uskutečněna za umělých laboratorních podmínek, kde přechod světlo/tma byl náhlý – to znamená rozsvícení nebo zhasnutí nastalo okamžitě. V přirozeném prostředí jsou však organismy vystaveny poněkud odlišným podmínkám. Přechody světlo/tma, tedy úsvit a soumrak, jsou plynulé a intenzita světla se zvyšuje/snižuje pozvolně. Proto se nabízí zajímavá otázka, zda přirozené světelné podmínky nepůsobí na centrální molekulární oscilátor jiným způsobem než podmínky laboratorní. Rozhodli jsme se tedy nyní podrobně charakterizovat cirkadiánní profily exprese genů Per1 a Per2 a hladiny jejich proteinů v SCN u myší chovaných na extrémně dlouhé a krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma.

Profily hladin Per1 mRNA se na dlouhé a krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma lišily pouze v R- a C-SCN – v obou byl prokázán interval s vysokými hladinami déle na dlouhé fotoperiodě než na krátké. Profily hladiny Per2 mRNA se na dlouhé a krátké fotoperiodě také lišily. Ve všech třech částech SCN sice hladiny mRNA začaly klesat dříve na krátké fotoperiodě než na dlouhé, avšak dříve začaly také stoupat. I přes to však přetrvávaly nízké hladiny mRNA déle na krátké fotoperiodě než na dlouhé. Amplituda rytmu Per2 mRNA byla větší na krátké fotoperiodě

než na dlouhé, nikoliv však tak výrazně jako u fotoperiod s náhlým přechodem světlo/tma (kapitola 8.1.)

Stejně jako na obou fotoperiodách s náhlým přechodem světlo/tma, byly i na dlouhé a krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma profily hladin Per2 mRNA fázově opožděny za profily hladin Per1 mRNA.

Zaměříme-li se na srovnání profilů hladin mRNA v jednotlivých částech SCN, nenalezneme mezi R-, M- a C-SCN na krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma mezi profily Per1 ani Per2 mRNA žádné významnější rozdíly. Na dlouhé fotoperiodě však byl profil hladiny mRNA obou genů v R-SCN fázově opožděn za profilem v C-SCN. Rozdíl byl ale méně výrazný než u dlouhé fotoperiody s náhlým přechodem světlo/tma.

Profily hladin PER1 proteinů se na dlouhé a krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma lišily v R- a M- SCN především vzájemným fázovým posunem. Na dlouhé fotoperiodě byly profily přibližně o 4 hodiny fázově opožděny oproti profilům na fotoperiodě krátké. Porovnání profilů hladin PER2 proteinů na dlouhé a krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma ukázalo, že v M-SCN přetrvávaly vysoké hladiny proteinu déle na dlouhé a nízké naopak déle na krátké fotoperiodě.

Fotoperioda s pozvolným přechodem světlo/tma má tedy na centrální molekulární oscilátor podobný, ne-li téměř stejný vliv jako náhlý přechod světlo/tma. Tento závěr souhlasí s výsledky dřívější studie z naší laboratoře (Sumová *et al*, 2002), která se zabývala vlivem přirozené fotoperiody na cirkadiánní tvorbu proteinu PER1 v SCN potkana. V tomto experimentu však byli potkani chováni přímo na přirozené dlouhé letní a krátké zimní fotoperiodě.

5.3. SROVNÁNÍ VLIVU NÁHLÉHO A POZVOLNÉHO PŘECHODU SVĚTLO/TMA NA DLOUHÉ A KRÁTKÉ FOTOPERIODĚ NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ Per1 A Per2 A HLADINY PER1 A PER2 PROTEINŮ V SCN

Pro detailní srovnání profilů exprese Per1 a Per2 genů a hladin jejich proteinů na fotoperiodách s náhlým a pozvolným přechodem světlo/tma, jsme se rozhodli analyzovat rozdíly zvláště na dlouhé fotoperiodě a zvláště na krátké fotoperiodě.

Na dlouhé fotoperiodě byl interval s nízkými hladinami Per1 mRNA v R-SCN delší při náhlém přechodu světlo/tma než při přechodu pozvolném. V ostatních částech

SCN nebyl nalezen žádný rozdíl. Profily hladin Per2 mRNA se na fotoperiodě s náhlým a pozvolným přechodem světlo/tma lišily pouze v M-SCN, kde nízké hladiny mRNA přetrvaly déle na fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma. Profily hladin proteinů PER1, stejně tak jako proteinů PER2, se na fotoperiodě s náhlým a pozvolným přechodem světlo/tma významně nelišily v žádné části SCN. Profily hladin PER2 proteinů však dosahovaly v R-, M- i C-SCN na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma výrazně vyšší amplitudy než profily na fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma.

Na krátké fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma byly profily hladin Per1 mRNA o 2 hodiny fázově opožděny za profily na fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma. O nárůstu hladin Per2 mRNA můžeme v R- a M-SCN říci to samé jako v případě Per1 mRNA – na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma byl fázově opožděn o 2 hodiny oproti fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma. K poklesu hladin však došlo zároveň. Z toho vyplývá, že interval s nízkými hladinami Per2 mRNA byl delší na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma. Profily proteinu PER1 se na fotoperiodě s náhlým a pozvolným přechodem světlo/tma ve všech částech SCN shodovaly, pouze s výjimkou nárůstu hladiny v rostrální části – na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma nastal dříve. Profily proteinu PER2 se v M-SCN na fotoperiodě s náhlým a pozvolným přechodem světlo/tma výrazně podobaly. V R-SCN byl profil na fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma fázově opožděn za profilem na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo tma, to samé platilo i pro nárůst hladiny v C-SCN.

Z našich výsledků je zřejmé, že náhlý přechod mezi světlem a tmou způsobuje na krátké fotoperiodě fázové opoždění profilu hladiny Per1 mRNA. Stejně fázové opoždění na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma jsme našli i u profilu hladiny Per2 mRNA, statisticky významný však byl pouze opožděný pokles, nikoliv nárůst hladiny. Můžeme tedy shrnout, že krátká fotoperioda s pozvolným přechodem světlo/tma má oproti fotoperiodě s náhlým přechodem odlišný vliv na profily hladin Per1 a Per2 mRNA, neovlivňuje však hladiny PER1 a PER2 proteinů.

Jak je patrné z předchozích kapitol, detailně jsme v předkládané práci porovnali působení pozvolného a náhlého přechodu mezi světlem a tmou na expresi stěžejních hodinových genů Per1 a Per2 a zároveň na hladiny PER1 a PER2 proteinů. Takto podrobná a komplexní analýza byla u myši (a savců vůbec) provedena poprvé, takže výsledky nemůžeme porovnat se studiemi z jiných laboratoří. Vliv fotoperiody s přirozeným přechodem světlo/tma byl zkoumán pouze na pohybové aktivitě zlatých

křečků (Boulos et Macchi, 2005). Oproti fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma byl zaznamenán dřívější počátek pohybové aktivity a jeho menší variabilita mezi jednotlivými dny. Dá se říci, že dřívější počátek pohybové aktivity křečka na krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma do jisté míry koreluje s naším nálezem dřívějšího nárůstu a poklesu Per1 mRNA v SCN myši. V budoucnu je však potřeba věnovat snaze lépe a detailněji pochopit, jakým způsobem centrální molekulární oscilátor reaguje na neustále se měnící délku fotoperiody, pozornost i nadále. Teprve až se podaří objasnit, jak centrální oscilátor zpracovává informaci o délce fotoperiody, ukáže se nám možná, jakým způsobem cirkadiánní hodiny, které měří denní dobu, dokáží fungovat také jako sezónní kalendář.

5.4. VLIV FOTOPERIODY NA EXPRESI HODINOVÝCH GENŮ V JÁTRECH

Již poměrně dlouho je známo, že hodinové geny jsou rytmicky exprimovány kromě centrálního oscilátoru v SCN také v periferních oscilátorech, mimojiné i v játrech. Synchronizace periferních oscilátorů je pod kontrolou centrálního oscilátoru, u mnoha z nich však hraje důležitou roli i doba příjmu potravy. Je proto zajímavou otázkou, zda se délka fotoperiody, která má na centrální oscilátor poměrně výrazný vliv, projevuje i na úrovni oscilátorů periferních. Rozhodli jsme se tedy analyzovat denní profily exprese několika vybraných hodinových genů v játrech a to jednak na krátké a jednak na dlouhé fotoperiodě.

Při porovnání profilů exprese genu Rev-erba na dlouhé a krátké fotoperiodě jsme mezi nimi našli významný rozdíl. Interval s nízkými hladinami Rev-erba mRNA trval na dlouhé fotoperiodě déle než na fotoperiodě krátké. Navíc byl na dlouhé fotoperiodě profil exprese Rev-erba fázově opožděn za profilem exprese na krátké fotoperiodě. Porovnání profilů hladin Per1 mRNA ukázalo delší interval s vysokými hladinami na krátké fotoperiodě než na dlouhé. Kromě poklesu, který nastal ve stejný čas (právě díky déle trvající vysoké hladině na krátké fotoperiodě), byl profil hladin mRNA na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn za profilem na krátké fotoperiodě. Podobně byl fázově opožděn i profil exprese genu Per2 a Cry1. Fotoperioda měla dramatický vliv na profil hladiny Bmal1 mRNA, který byl na dlouhé fotoperiodě téměř v opačné fázi než na krátké fotoperiodě. Kromě hodinových genů byl na dlouhé fotoperiodě fázově opožděn i denní profil exprese hodinami kontrolovaného genu DBP za profilem exprese na krátké fotoperiodě. Podařilo se nám tedy prokázat, že se cirkadiánní profily exprese všech genů,

jejichž profily jsme analyzovali na dlouhé a krátké fotoperiodě lišily. Můžeme učinit závěr, že délka fotoperiody periferní cirkadiánní oscilátor v játrech významně ovlivňuje. Dále je zřejmé, že u všech sledovaných genů byl mezi profily na dlouhé a krátké fotoperiodě výrazný fázový posun – profily na dlouhé fotoperiodě byly fázově opožděny za profily na krátké fotoperiodě.

Studiu periferních cirkadiánních hodin v játrech již byla věnována řada prací. Mechanismus tvorby cirkadiánních oscilací se v játrech pravděpodobně velmi podobá mechanismu jejich tvorby v centrálním oscilátoru v SCN (Peirson *et al.*, 2006). Proto se nabízí srovnání vlivu rozdílných fotoperiod na centrální a periferní oscilátor. Podrobná analýza hodinových genů v játrech myši chovaných za konstantních podmínek odhalila, že hladiny mRNA dosahují v játrech maximálních hodnot přibližně o 4 hodiny později než v centrálním oscilátoru (Yamamoto *et al.*, 2004). To můžeme u genu *Per1* a *Per2* na základě našich výsledků potvrdit. V játrech dosáhla hladina mRNA těchto genů maxima na dlouhé i krátké fotoperiodě se 4-hodinovým zpožděním za maximem v SCN. Vliv rozdílně dlouhých fotoperiod na periferní oscilátor v játrech myši byl testován v předkládané práci poprvé, nemůžeme proto zatím srovnávat s výsledky z jiných laboratoří. Byl však testován u ovcí, ovšem pouze u genů *Per2*, *Bmal1* a *Cry1*. Stejně jako v našem, i ve zmíněném experimentu dosáhla hladina *Per2* mRNA maxima dříve na krátké fotoperiodě než na dlouhé (Andersson *et al.*, 2005). Jinak se výsledky neshodují, což se vzhledem k takto odlišným živočišným druhům dalo předpokládat. Jiným způsobem se vliv fotoperiody projevuje také na molekulární oscilátory v srdci a plicích zlatého křečka (Carr *et al.*, 2003).

I přes to, že délka fotoperiody výrazně ovlivňuje jak centrální oscilátor v SCN, tak i periferní oscilátor v játrech, nenašli jsme při srovnání rozdílů mezi oběma fotoperiodami v SCN a v játrech žádný společný rys. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že zatímco centrální oscilátor v SCN je synchronizován především světlem (fotoperiodou), na synchronizaci periferního oscilátoru v játrech mají kromě fotoperiody vliv i další faktory – například doba příjmu potravy. Otázkou však zůstává, proč se v játrech exprese hodinových genů na dlouhé a krátké fotoperiodě liší fázovým posunem profilů exprese hodinových genů a jakou roli v tomto mechanismu hraje exprese *Bmal1*, která byla fotoperiodou ovlivněna ze všech sledovaných genů nejdramatičtěji. K nalezení odpovědi na tyto otázky je proto potřeba ještě dalšího výzkumu v této oblasti.

6. SOUHRN

1. Délka fotoperiody významně ovlivňuje expresi genů Per1 a Per2 v R-, M- i C-SCN. Na dlouhé (L 18:6) fotoperiodě je ve srovnání s krátkou (S 6:18) fotoperiodou interval s vysokými hladinami mRNA delší a interval s nízkými hladinami mRNA naopak kratší. Na krátké fotoperiodě je rytmus v expresi Per1 a Per2 genů ve všech částech SCN synchronní, zatímco na dlouhé fotoperiodě rytmy v hladinách Per1 a Per2 mRNA v C-SCN fázově předbíhají rytmy v R-SCN. Profily hladin PER1 a PER2 proteinů ovlivňuje délka fotoperiody významně pouze v M-SCN, na dlouhé fotoperiodě přetrvávají vysoké hladiny proteinů déle než na fotoperiodě krátké.
2. Na dlouhé fotoperiodě nejsou profily v expresi genů Per1 a Per2 typem přechodu světlo/tma významně ovlivněny. Na krátké fotoperiodě s pozvolným přechodem světlo/tma jsou profily exprese genů Per1 a Per2 fázově předběhnuty oproti profilům na fotoperiodě s náhlým přechodem světlo/tma. Hladiny proteinů PER1 a PER2 však nejsou na dlouhé ani krátké fotoperiodě typem přechodu světlo/tma ovlivněny.
3. Délka fotoperiody významně ovlivňuje periferní cirkadiální oscilátor v játrech. Profily exprese hodinových genů Rev-Erba, Per1, Per2, Cry1 a hodinami kontrolovaného genu DBP jsou na dlouhé fotoperiodě fázově opožděny za profily exprese na fotoperiodě krátké. Profil exprese genu Bmal1 je na dlouhé a krátké fotoperiodě téměř v antifázi.

SEZNAM LITERATURY

- Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Tanahashi, Y., Ikeda, M., Honma, K. (1998): Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett*, 258(2), 93-6
- Abrahamson, E.E., Moore R.Y. (2001): Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916, 172-191
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., Meijer, J.H. (2005): A GABAergic Mechanism Is Necessary for Coupling Dissociable Ventral and Dorsal Regional Oscillators within the Circadian Clock. *Current Biology*, 15, 886-893
- Andersson, H., Johnston, J.D., Messenger, S., Hazlerigg, D., Lincoln, D. (2005): Photoperiod regulates clock gene rhythms in the ovine liver. *Gen Comp Endocrinol*, 142(3), 357-63
- Aton, S.J., Herzog, E.D. (2005): Come Together, Right ...Now: Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock, *Neuron*, 48, 531-534
- Bae, K., Weaver, D.R. (2003): Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. *J Biol Rhythms*, 18(2), 123-33
- Baler, R., Covington, S., Klein D.C (1997): The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element –CCAAT complex. *J Biol Chem*, 272(11), 6979-85
- Barnes, J.W., Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Mitchell, J.W., Burgoon, P.W., Hickok, J.R., Gillette, M.U. (2003): Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science*, 302(5644), 439-42

- Boulos, Z., Macchi, M.M. (2005): Season- and latitude- dependent effects fo simulated twilights on circadian entrainment. *J Biol Rhythms*, 20(2), 132-44
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., takahashi, J.S., Bradfield, C.A. (2000): Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), 1009-17
- Carr, A.J., Johnston, J.D., Semikhodskii, A.G., Nolan, T., Caqampanq, F.R., Stirland, J.A., Loudon, A.S. (2003): Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr Biol*, 13(17), 1543-8
- Chen-Goodspeed, M., Lee, C.C. (2007): Tumor supression and circadian function. *J Biol Rhythms*, 22(4), 291-8
- Cheng, H.Y.M., Papp, J.W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J.P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., Obrietan, K. (2007): MicroRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, 54, 813-829
- Debruyne, J.P., Noton, E., Lambert, C.M., Maywood, E.S., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (2006): A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50(3), 465-77
- Debruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (2007): CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*, 10(5), 543-5
- Ding, J.M., Buchanan, G.F., Tischkau, S.A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L.E., Alster, J.M., McPherson, P.S., Campbell, K.P., Gillette, M.U. (1998): A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, 394(6691), 381-4
- Dunlap, J.C. (1999): Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 96, 271-290

- Follett, B.K., Milette, J.J. (1982): Photoperiodism in quail: testicular growth and maintenance under skeleton photoperiods. *J Endocrinol*, 93(1), 83-90
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., Weitz, C.J. (1998): Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280(5369), 1548-9
- Gery, S., Komatsu, N., Baldjyan, L., Yu, A., Koo, D., Koeffler, H.P. (2006): The circadian gene *Per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell*, 22(3), 375-82
- Godinho, S.I., Maywood, E.S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A.R., Busino, L., Pagano, M., Kendall R., Quwailid, M.M., Romero, M.R., O'Neill, J., Chesham, J.E., Brooker, D., Lallane, Z., Hastings, M.H., Nolan, P.M. (2007): The after-hours mutant reveals a role for *Fbx13* in determining mammalian circadian period. *Science*, 316, 897-900
- Goldman, B.D., Darrow, J.M., Yogev, L. (1984): Effects of timed melatonin infusions on reproductive development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology*, 114(6), 2074-83
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., Saper, C.B. (2001): Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature Neuroscience*, 4(12), 1165
- Gotter, A.L., Manganaro, T., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F. Jr., Possidente, B., Sriram, S., MacLaughlin, D.T., Reppert, S.M. (2000): A time-less function for mouse *timeless*, *Nat Neurosci*, 3(8), 755-6
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N. (2005): Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20(5), 391-403

Hamaguchi, H., Fijimoto, K., Kawamoto, T., Noshiro, M., Maemura, K., Takeda, N., Nagai, R., Furukawa, M., Honma, S., Honma, K., Kurihara, H., Kato, Y. (2004): Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J*, 382(Pt 1), 43-50

Hao, H., Allen, D.L., Hardin, P.E. (1997): A Circadian Enhancer Mediates PER-Dependent mRNA Cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 17(7), 3687-93

Harding, H.P., Lazar, M.A. (1993): The orphan receptor Rev-Erba alpha activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol*, 13(5), 3113-21

Hastings, M.H., Walker, A.P., Herbert, J. (1987): Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J Endocrinol*, 114(2), 221-9

Hastings, M.H. (1997): Central clocking. *Trends Neurosci*, 20(10), 459-64

Hastings, M.H. (1997): Circadian clocks. *Current Biology*, 7(11), R607-2

Hastings, M.H., Herzog, E.D. (2004): Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms*, 19(5), 400-13

Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J.P., Johnston, J.D. (2005): Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr Biol*, 15(12), R455-7

Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., Honma, K. (2002): Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 419(6909), 841-4

Huang, Z.J., Edery, I., Rosbash, M. (1993): PAS is a dimerization domain common to drosophila period and several transcription factors, *Nature*, 364(6434), 259-62

- Ianagaki, N., Honma, S., Ono, D., Tanahashi, Y., Honma, K. (2007): Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(18), 7664-9
- Illnerová, H., Vaněček, J. (1980): Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of year. *Neuroendocrinology*, 31(5), 321-6
- Illnerová, H., Hoffmann, K., Vaněček, J. (1984): Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology*, 38(3), 226-31
- Illnerová, H., Vaněček, J., (1985): Regulation of the circadian rhythm in pineal melatonin production. *Physiol Bohemoslov*, 34, 57-61
- Illnerová, H., Vaněček, J. (1988): Entrainment of rat pineal rhythm in melatonin production by light. *Reprod Nutr Dev*, 28(2B), 515-26
- Illnerová, H. (1994): Blížíme se k poznání podstaty biologických hodin?. *Vesmír* 73, 8, 425-426
- Illnerová, H. (1996): Melatonin a jeho působení. *Vesmír* 75, 5, 266-269
- Ingram, C.D., Ciobanu, R., Coculescu, I.L., Tanasescu, R., Coculescu, M., Mihai, R. (1998): Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*, 119, 351-64
- Jakubcaková, V., Oster, H., Tamanini, F., Cadenas, C., Leitges, M., van der Horst, G.T.J., Eichele, G. (2007): Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron*, 54, 831-843
- Johnston, J.D. (2005): Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J Neuroendocrinol*, 17(7), 459-65

King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W., Takahashi, J.S. (1997): Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 89(4), 641-53

Klein, D.C., Berg, G.R., Weller, J. (1970): Melatonin synthesis: adenosine - 3', 5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science*, 168(934), 979-80

Kume, K., Zylka, J.M., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. (1999): mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193-205

Lakin-Thomas, P.L. (2006): Transcriptional feedback oscillators: maybe, maybe not... *J Biol Rhythms*, 21(2), 83-92

Lavery, D.J., Lopez-Molina, L., Margueron, R., Fleury-Olela, F., Conquet, F., Schibler, U., Bonfils, C. (1999): Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol*, 19(10), 6488-99

Leak, R.K., Card J.P., Moore R.Y (1999): Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*, 819, 23-32

Li, Y., Song, X., Ma, Y., Liu, J., Yang, D., Yan, B. (2004): DNA binding, but not interaction with Bmal1, is responsible for DEC1-mediated transcription regulation of the circadian gene mPer1. *Biochem J*, 382(Pt 3), 895-904

Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H., Reppert, S.M. (1997): Cellular Construction of a Circadian Determination in the Suprachiasmatic Nuclei. *Cell*, 91, 855-860

- Liu, C., Reppert, S.M. 2000: GABA Synchronizes Clock Cells within the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*, 25, 125-128
- Meijer, J.H., Schwartz, W.J. (2003): In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, 18(3), 235-49
- Messenger, S., Ross, A.W., Barrett, P., Morgan, P.J. (1999): Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17), 9938-43
- Naito, E., Watanabe, T., Tei, H., Yoshimura, T., Ebihara, S. (2008): Reorganization of the suprachiasmatic nucleus coding for day length. *J Biol Rhythms*, 23(2), 140-9
- Naruse, Y., Oh-hashii, K., Iijima, N., Naruse, M., Yoshioka, H., Tanaka, M. (2004): Circadian and light-induced transcription of clock gene Per1 depends on histone acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*, 24(14), 6278-87
- Nelson, D.E., Takahashi, J.S. (1991): Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol*, 439, 115-45
- Nuesslein-Hildesheim, B., O'Brien, J.A., Ebling, F.J., Maywood, E.S., Hastings, M.H. (2000): The circadian cycle of mPer clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci*, 12(8), 2856-64
- Ohno, T., Onishi, Y., Ishida, N. (2007): The negative transcription factor E4BP4 is associated with circadian clock protein PERIOD2. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(4), 1010-1015
- Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K. (2002): Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*, 309, 47-56

- O'Neill, J.S., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Takahashi, J.S., Hastings, M.H. (2008): cAMP-dependent signalling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320(5878), 879-80
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Duffield, G.E., Takher, S., Sharma, P., Foster, R.G. (2006): Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 351(4), 800-7
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. (2002): The organ nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 251-60
- Ralph, M.R., Menaker, M. (1988): A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241(4870), 1225-7
- Reiter, R.J. (2003): Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17(2), 273-85
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Gitto, E., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Leon, J., Manchester, L.C., Vijayalaxmi, Kilic, E., Kilic, U. (2004): Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol*, 56(2), 159-70
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2001): Molecular Analysis of Mammalian Circadian Rhythms. *Annu. Rev. Physiol*, 63, 647-76
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., Hogenesch, J.B. (2004): A functional genomics strategy reveals Rora as an component of the mammalian circadian clock, *Neuron*, 43(4), 443-6
- Schibler, U. (2005): The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO*, 6, S9-S13

- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F. Jr, Reppert, S.M. (1997): Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261-9
- Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2000): Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 20(17), 6269-75
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Okamura, H. (1997): Light-induced resetting of mammalian circadian clock is associated with rapid induction of mPer1 transcript. *Cell*, 91, 1043-53
- Siepká, S.M., Yoo, S.H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., Takahashi, J.S. (2007): Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*, 129, 1011-1023
- Steinlechner, S., Jacobmeier, B., Scherbarth, F., Dernbach, H., Kruse, F., Albrecht, U. (2002): Robust circadian rhythmicity of per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *J Biol Rhythms*, 17(3), 202-9
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Peters, R., Schwartz, W.J., Illnerová, H. (1995): The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7754-8
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Illnerová, H. (1995): Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 200(3), 191-4
- Sumová, A., Maywood, E.S., Selvage, D., Ebling, F.J., Hastings, M.H. (1996): Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the syrian hamster. *Brain Research*, 709(1), 88-96

Sumová, A., Sládek, M., Jáč, M., Illnerová, H. (2002): The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res*, 947(2), 260-270

Sumová, A., Jáč, M., Sládek, M., Sauman, I., Illnerová, H. (2003): Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms*, 18(2), 134-44

Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., Kovačiková, Z., Illnerová, H. (2004): Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res*, 53(1), S167-76

Tataroglu, O., Davidson, A.J., Benvenuto, L.J., Menaker, M. (2006): The methamphetamine-sensitive circadian oscillator (MASCO) in mice. *J Biol Rhythms*, 21(3), 185-94

Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Lin, F.J., Myers, E.M., Barnes, J.W., Meyer-Bernstein, E.L., Hurst, W.J., Burgoon, P.W., Chen, D., Sehgal, A., Gillette, M.U. (1999): Oscillation and light induction of timeless mRNA in the mammalian circadian clock. *J Neurosci*, 19(12), RC15

Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptacek, L.J., Fu, Y.H. (2001): An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phased syndrome. *Science*, 291(5506), 1040-43

Tournier, B.B., Menet, J.S., Dardente, H., Poirel, V.J., Malan, A., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Vuillez, P. (2003): Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*, 118(2), 317-22

Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., Sassone-Corsi, P. (2002): Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7728-33

Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M.P., Safi, R., Takahashi, J.S., Delaunay, F., Laudet, V. (2004): The orphan receptor Rev-erb α is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol*, 33(3), 585-608

van den Pol, A.N. (1980): The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*, 191(4), 661-702

van den Pol, A.N., Dudek, F.E. (1993): Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 56(4), 793-811

Vaněček, J., Pavlík, A., Illnerová, H. (1987): Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*, 435(1-2), 359-62

Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H., Virshup, D.M. (2000): Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*, 20(13), 4888-99

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. (1995): Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms. *Neuron*, 14(4), 697-706

Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., Okamura, H. (2000): Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, 20(13), 4773-81

Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., Okamura, H. (2003): Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science*, 302(5649), 1408-1412

Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamime, T., Takumi, T. (2004): Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol*, 5, 18

Yamazaki, S., Numamo, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000): Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288, 682-685

Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Slepka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillation in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5339-46

Yu, W., Nomura, M., Ikeda, M. (2002): Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(3), 933-41