

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie

Katedra fyziologie živočichů



Hana Kyclerová

**Cirkadiánní systém v čichových lalocích**  
**Circadian system in bulbus olfactorius**

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2015

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za její motivující přístup, nesmírnou ochotu, trpělivost, cenné rady i nápady. Vážím si také jejího času stráveného nad pročitáním mé utvářející se bakalářské práce. Velké díky patří také mé rodině, mému příteli i přátelskému kolektivu laboratoře biorytmů na katedře fyziologie PřFUK za jejich pozitivní naladění a obrovskou oporu.

**Prohlášení:**

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

V Praze, 6. 5. 2015

.....

Podpis

## ABSTRAKT

Savčí cirkadiánní systém je složený z hlavního cirkadiánního pacemakeru uloženého v suprachiasmatických jádrech hypotalamu a z periferních cirkadiánních oscilátorů. Cirkadiánní rytmy jsou výsledkem molekulárního mechanismu propojených transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček, který je vlastností každého cirkadiánního oscilátoru. Periferní oscilátory v ostatních částech mozku a v orgánech jsou řízeny signály ze suprachiasmatických jader. Existují však některé struktury, které jsou schopny pracovat autonomně, nezávisle na hlavním cirkadiánním oscilátoru. Nejznámější takový oscilátor je v savčí sítnici oka. Cirkadiánní oscilátor v sítnici reguluje mimo jiné lokální rytmickou syntézu melatoninu, pH sítnice nebo životaschopnost fotoreceptorů. V poslední době se objevují práce, které prokazují existenci nezávislého cirkadiánního oscilátoru také v čichových lalocích savců. Cirkadiánní oscilátor v čichových lalocích například řídí čichovou citlivost během dne. Práce zabývající se vývojem savčího cirkadiánního systému ukázaly, že cirkadiánní oscilátor v čichových lalocích dozrává dříve než hlavní cirkadiánní pacemaker a v období časného vývoje zastupuje jeho funkci.

**Klíčová slova:** cirkadiánní, suprachiasmatické jádro, čichový systém, čichové laloky, hodinové geny

## ABSTRACT

The mammalian circadian system is composed of major circadian pacemaker located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei and peripheral circadian oscillators. Molecular mechanism of interlocked transcription-translation feedback loops, as a characteristic of each circadian oscillator, results in circadian rhythms. Peripheral oscillators in other brain parts and body organs are driven by the signals from the suprachiasmatic nuclei. Some structures however generate oscillations independently from the major circadian pacemaker. The best described of them resides in the mammalian retina. The retinal circadian oscillator regulates local rhythmic synthesis of melatonin, retinal pH and photoreceptors viability. Recently, some studies occur charactering the existence of such an independent circadian oscillator also in bulbus olfactorius. For example, the olfactory bulb circadian oscillator drives olfactory sensitivity during the day. Studies about development of the mamalian circadian system have shown that the olfactory bulb circadian oscillator matures earlier than the major circadian pacemaker and represents its function during early development.

Key words: circadian, suprachiasmatic nucleus, olfactory system, bulbus olfactorius, clock genes

## OBSAH

1	Úvod.....	1
	Cíle práce.....	1
2	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM.....	2
2.1	Hlavní cirkadiánní hodiny.....	2
2.1.1	Molekulární mechanismus hodin.....	3
2.1.2	Synchronizace.....	4
2.2	Periferní cirkadiánní hodiny.....	6
2.3	Autonomní cirkadiánní oscilátory .....	6
3	ČICHOVÝ SYSTÉM.....	8
3.1	Morfologie čichového systému .....	8
3.2	Transdukce čichové informace.....	10
3.2.1	cAMP signalizační dráha .....	11
3.2.2	Dráha fosfolipázy C.....	11
3.2.3	Dráha guanylátcyklázy.....	11
3.3	Čichová dráha.....	12
4	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM V ČICHOVÝCH LALOCÍCH .....	13
4.1	Důkazy přítomnosti cirkadiánního pacemakeru v čichových lalocích .....	13
4.2	Vývoj cirkadiánního systému v čichových lalocích .....	15
4.3	Výstupní rytmy.....	16
4.4	Synchronizátory .....	17
5	Závěr .....	18
6	Přehled použité literatury .....	20

## Seznam použitých zkratek

**AANAT** - arylalkylamin N-acetyltransferáza

**AC1** - adenylátcykláza 1

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol-propionát

**AONpE** - *nucleus olfactorius anterior, pars externa*

**AVP** - arginin vazopresin

**Bmal1** - brain and muscle Arnt-like protein 1

**CaMKII/ IV** -  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin- dependentní proteinkináza typu II a IV

**cAMP** - cyklický adenosin-3',5'-monofosfát

**c-FOS** – buněčný FOS protein

**cGMP** - cyklický guanosin-3',5'-monofosfát

**CK1 $\epsilon$ / $\delta$**  - kasein kináza 1 epsilon/ delta

**Clock** - circadian locomotor output cycles kaput

**CRE** -  $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP responsní prvky

**CREB** - protein vázající  $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP responsní prvky

**Cry** - cryptochrome

**DAG** - diacylglycerol

**DM-SCN** - dorsomediální suprachiasmatická jádra

**GABA** -  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

**GC-D** - guanylátcykláza D

**GRP** - gastrin-uvolňující peptid

**IP<sub>3</sub>** - inositol 1,4,5-trisfosfát

**2MB2** - 2-metylbut-2-enal

**NMDA** - N-metyl D-aspartát

**Npas2** - neuronal PAS domain-containing protein 2

**PACAP** – hypofyzární polypeptid aktivující adenylátcyklázu

**Per** - period

**PKA** – proteinkináza A

**PLC** - fosfolipáza C

**RHT** - retinohypotalamická dráha

**Rora** - retinoic acid-related orphan receptor alfa

**SCN** - suprachiasmatická jádra

**VIP** - vazoaktivní intestinální peptid

**VL-SCN** - ventrolaterální suprachiasmatická jádra

**VPAC<sub>1</sub>/ VPAC<sub>2</sub>** - VIP/PACAP receptor podtypu 1 a 2

**ZT** – Zeitgeber time (denní doba, kdy byl aplikován Zeitgeber- vnější synchronizátor)

# 1 ÚVOD

Působením periodicky se měnících vlivů prostředí, jako je cyklus světla a tmy nebo teplotní cyklus, se během evoluce vyvinul fyziologický mechanismus, který umožňuje organismům přizpůsobovat se těmto cyklickým změnám, tzv. cirkadiánní hodiny. Vnitřní časovací mechanismus cirkadiánních hodin pomáhá organismům předvídat změny v prostředí a vypořádat se s nimi tak, aby jejich aktivita a fyziologické funkce, jako jsou tělesná teplota, srdeční frekvence, krevní tlak, koncentrace hormonů nebo imunitní funkce byly synchronizované s prostředím. Cirkadiánní rytmy se opakují s 24hodinovou periodou, která se v konstantních podmínkách může mírně odchylovat, proto latinské pojmenování *circa* - přibližně a *diem* - den. Cirkadiánní rytmy jsou vrozené, pokračují tzv. „volným během“ i v neměnných podmínkách bez vnějších podnětů. Jsou tedy vytvářeny endogenně.

Skoro každá buňka našeho těla má vlastní cirkadiánní oscilátor. Všechny oscilátory jsou sladěné hlavními hodinami, uloženými v suprachiasmatických jádrech hypothalamu. Hlavní hodiny se synchronizují s okolním prostředím vnějšími synchronizátory (z němčiny *Zeitgeber*), aby se organismy s periodou kratší nebo delší než 24 hodin nedostaly po několika cyklech do protifáze s okolním prostředím. Jako *Zeitgeber* slouží zejména světlo, ale také teplota, časově omezený přísun potravy, nebo sociální interakce.

Mechanismus endogenních cirkadiánních oscilací je založený na propojených transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách hodinových genů a jejich proteinů. Přestože je mechanismus hodin založený na biochemických reakcích, které jsou citlivé na teplotě, délka periody „volně běžícího“ rytmu se v závislosti na okolní teplotě nemění. Cirkadiánní systém je tzv. teplotně kompenzován.

Periferní cirkadiánní oscilátory v ostatních částech mozku a v orgánech generují rytmické oscilace nezávisle na hlavních hodinách, jejichž úlohou je sladit tyto oscilace do jednotného cirkadiánního rytmu. Cirkadiánní oscilátory ve většině periferních tkání utváří cirkadiánní rytmus, který je při absenci synchronizačních signálů z hlavních hodin postupně utlumen. Některé periferní oscilátory však pokračují v rytmické sjednocené oscilaci i bez přítomnosti hlavního oscilátoru. Tyto autonomní cirkadiánní oscilátory, např. v sítnici a čichových lalocích savců, jsou citlivé k *Zeitgeber*ům z vnějšího prostředí, a udržují si určitou nezávislost na podnětech z hlavních hodin.

## CÍLE PRÁCE

Pacemakerová vlastnost buněk čichových laloků byla objevena poměrně nedávno. Cílem mé práce je podat souhrnný přehled studií zabývajících se cirkadiánním systémem v čichových lalocích savců. Práce nejprve podává popis hierarchického uspořádání savčího cirkadiánního systému, molekulárního mechanismu a synchronizace biologických hodin. Třetí kapitola se zaměřuje na čichový systém a následující kapitola shrnuje dosavadní informace o cirkadiánním systému v čichových lalocích. Závěr práce nastiňuje možné budoucí směry výzkumu v této oblasti.

## 2 CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM

Cirkadiánní proměnné se periodicky opakují každých 24 hodin. Na jejich utváření se podílí molekulární mechanismus zpětnovazebných smyček speciálních transkripčních faktorů, tzv. hodinových genů. Tento mechanismus je základní vlastností každého cirkadiánního oscilátoru.

Cirkadiánní systém savců je utvářen z tkání s pacemakerovou funkcí – suprachiasmatických jader hypotalamu (SCN), sítnice a čichových laloků. Jejich cirkadiánní oscilátory pracují nezávisle na ostatních a mohou ovlivňovat rytmy jiných oscilátorů. Cirkadiánní pacemaker v SCN koordinuje lišící se fáze periferních oscilátorů v ostatních částech mozku a v periferních tkáních (Sakamoto et al., 1998), což naznačuje jeho pozici v nejvyšších příčkách savčího cirkadiánního systému. Cirkadiánní pacemaker v čichových lalocích řídí rytmus čichového vnímání v čichových lalocích, ale také v piriformní kůře (Granados-Fuentes et al., 2006).

### 2.1 HLAVNÍ CIRKADIÁNNÍ HODINY

Savčí biologické hodiny jsou uloženy v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, která leží po obou stranách třetí mozkové komory, těsně nad překřížením optických nervů. SCN obsahují okolo 20 000 neuronů (Van den Pol, 1980) a anatomicky jsou rozlišována na dorsomediální (DM-SCN) a ventrolaterální jádra (VL-SCN). Oblast DM-SCN se od VL-SCN odlišuje neurony obsahujícími arginin vazopresin (AVP), zatímco oblast VL-SCN ohraničují neurony syntetizující vazoaktivní intestinální peptid (VIP). DM-SCN dále zahrnují neurony syntetizující met-enkefalin a angiotensin II, oproti tomu oblast VL-SCN obsahuje neurony syntetizující gastrin-uvolňující peptid (GRP), neurotensin a kalretinin. Inhibiční neuropřenašeč GABA je obsažený v neuronech napříč celými SCN (Abrahamson and Moore, 2001).

Úloha SCN v cirkadiánním systému byla postupně odkrývána studii prováděnými již od 70. let 20. století. Odstranění SCN kompletně zrušilo cirkadiánní rytmy lokomoční aktivity u potkanů, což dokazuje, že SCN se podílí na kontrole některých behaviorálních rytmů savců (Stephan and Zucker, 1972). Zásadní důkazy dokládající funkci SCN jako hlavního cirkadiánního pacemakeru savců podaly studie s transplantací fetálních SCN a lézí SCN *in vivo*. Ralph s kolegy se pro otestování pacemakerové role SCN v savčím cirkadiánním systému rozhodli použít *tau* mutantní kmen křečků. *Tau* mutanti vykazují zkrácenou cirkadiánní periodu- v případě heterozygotních forem je „volně běžící“ perioda při konstantní tmě zkrácena na 22 hodin, u homozygotních forem na 20 hodin (Ralph and Menaker, 1988). Wild-type samečkům křečků vyjmuli SCN a poblíž této oblasti transplantovali fetální SCN mutantního křečka. Následně sledovali při tlumeném světle nebo konstantní tmě denní aktivitu křečků na „běhacím kole“ a zaznamenávali délku periody denního rytmu. Ralph s kolegy pozorovali, že křečci po vyjmutí SCN ztratili rytmicitu chování, avšak implantace fetálních SCN znovu obnovila cirkadiánní rytmus lokomoční aktivity, a tento rytmus probíhal s periodou dárce. Transplantovaná SCN od heterozygotního dárce si zachovala „volně běžící“ periodu blízkou 22 hodinám, zatímco perioda utvářená SCN od homozygotního dárce se blížila 20 hodinám. Genotyp



hostitele viditelně neovlivnil délku periody rytmů. U kontrolních křečků s implantovanou korovou tkání místo SCN nebyl nikdy obnoven cirkadiánní rytmus lokomoční aktivity. Tato zjištění dokazují, že neurony SCN odpovídají za utváření cirkadiánních rytmů lokomoční aktivity u křečků. Autoři dále použili imunocytochemickou analýzu k určení existence nově utvořených nervových spojení mezi hostitelským mozkem a implantátem. Implantovaná tkáň obsahovala i část mozkové tkáně vně SCN, avšak podařilo se jim identifikovat neuropeptid VIP ve výběžcích SCN neuronů, zatímco somata SCN neuronů obsahovala jak VIP, tak vazopresin. Výsledky imunocytochemické analýzy ukázaly, že došlo k vytvoření nervových spojení mezi transplantovanými SCN a mozkem hostitele. Společně výsledky studie potvrzují představu, že SCN zaujímají nejvyšší příčku hierarchického uspořádání cirkadiánního systému savců (Ralph et al., 1990).

Sakamoto s kolegy zkoumal, zda se hodinový gen *Period2* (*Per2*) podílí na utváření cirkadiánního rytmu lokomoční aktivity u potkanů. Ukázal, že léze SCN zrušila rytmickou expresi *Per2* mRNA v periferních tkáních potkanů; konkrétně srdci, plicích, slezině, játrech a ledvinách. Současně s tím potkani přestali vykazovat rytmickou lokomoční aktivitu, což naznačuje účast genu *Per2* na cirkadiánní kontrole lokomoční aktivity u savců. Studie přinesla důkaz, že SCN řídí cirkadiánní expresi *Per2* mRNA v periferních tkáních. Neboli hlavní cirkadiánní hodiny kontrolují periferní cirkadiánní oscilátory v tkáních (Sakamoto et al., 1998), a to prostřednictvím výstupních signálů, kterými jsou např. VIP, AVP nebo GABA (Kalsbeek et al., 2008; Abrahamson and Moore, 2001).

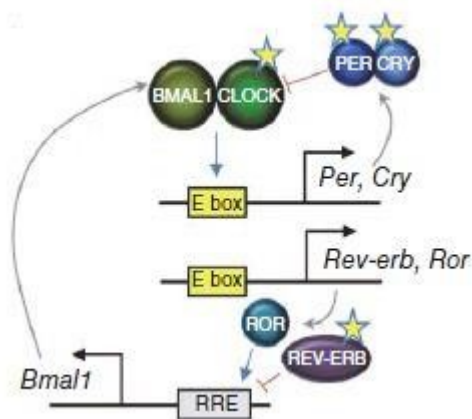
### 2.1.1 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS HODIN

Mechanismus utváření cirkadiánních rytmů tkví v periodických oscilacích genové exprese hodinových genů. Hodinové geny regulují cirkadiánní časování, protože řídí „volně běžící“ periodu. U savců bylo rozpoznáno mnoho hodinových genů: circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*), brain and muscle Arnt-like protein 1 (*Bmal1*), neuronal PAS domain-containing protein 2 (*Npas2*), period1/2 (*Per1*, *Per2*), cryptochrome1/2 (*Cry1*, *Cry2*), kasein kináza1 $\epsilon/\delta$  (*CKI $\epsilon$* , *CKI $\delta$* ), *Rev-erba* a retinoic acid-related orphan receptor  $\alpha$  (*Rora*) (přehled viz Ukai and Ueda, 2010).

Molekulární mechanismus hodin je založený na transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách hodinových genů a jejich proteinů (viz obrázek 1). Proteiny BMAL1 a CLOCK vytváří v cytoplasmě heterodimery, které následně v jádře spouští transkripci genů *Period*, *Cryptochrome*, *Rev-erba* a *Ror*, navázáním na E-boxy jejich promotorů pomocí bHLH motivu (basic helix-loop-helix) (Takeda et al., 2012; Gekakis et al., 1998; Kume et al., 1999; Preitner et al., 2002; Huang et al., 2012). Vytvořené proteiny PER a CRY utváří v cytoplasmě komplexy pomocí PAS domény (Period-Arnt-Single-minded) proteinů PERIOD (Albrecht et al., 1997; Takumi et al., 1998; Huang et al., 1993). Při určité prahové koncentraci a po fosforylaci PER proteinů CKI $\delta/\epsilon$  cestují multimerní komplexy PER, CRY proteinů a CKI $\epsilon$  do jádra, kde inhibují komplex CLOCK:BMAL1, a tím potlačují i svou vlastní transkripci (Eide et al., 2002; Yu et al., 2002; Lee et al., 2011). Inhibicí komplexu CLOCK:BMAL1 zároveň PER a CRY proteiny tlumí expresi *Rev-erba*, jehož proteinový produkt

soutěží s ROR proteiny o navázání na RORE sekvence promotorů genu *Bmal1* (Giguère et al., 1994; Preitner et al., 2002). Zatímco protein REV-ERB $\alpha$  tlumí transkripci genu *Bmal1*, ROR $\alpha/\beta$  proteiny působí jako transkripční aktivátory (Preitner et al., 2002; Guillaumond et al., 2005). PER a CRY proteiny tudíž aktivují transkripci genu *Bmal1* skrze ROR $\alpha/\beta$  proteiny. Degradace nadbytečných PER a CRY proteinů probíhá v proteasomu. PER proteiny jsou nejprve fosforylovány CKI $\epsilon/\delta$ , což podporuje jejich ubikvitinaci, která končí cílenou degradací v proteasomu. (Akashi et al., 2002; Eide et al., 2005; Busino et al., 2007; Siepka et al., 2007).

V nepřítomnosti CLOCK v SCN se transkripční faktor NPAS2 váže k BMAL1, utváří heterodimer, a tím udržuje chod cirkadiálního oscilátoru (DeBruyne et al., 2007). NPAS2 má totiž vysoce příbuznou primární aminokyselinovou sekvenci s *Clock*, avšak *Npas2* je primárně exprimován v savčím předním mozku (Garcia et al., 2000; Reick et al., 2001). NPAS2 je podobně jako BMAL1 regulován proteiny ROR $\alpha$  a REV-ERB $\alpha$  skrze RORE sekvence promotoru svého genu. Avšak afinita těchto proteinů k BMAL1 je značně vyšší. REV-ERB $\alpha$  nedokáže plně potlačit transkripci *Npas2*, avšak dokáže blokovat činnost ROR $\alpha$  jako transkripčního aktivátoru (Crumbley et al., 2010).



Obrázek 1: Schéma molekulárního mechanismu hodin (převzato a upraveno podle Lim and Allada, 2013). Heterodimery CLOCK:BMAL1 nasedají v jádře na E-boxy promotorů genů *Per*, *Cry*, *Rev-erba* a *Rora* a spouští jejich transkripci. Vytvořené PER a CRY se v cytoplasmě shlukují do komplexů, které vstupují do jádra a inhibují zde komplex CLOCK:BMAL1. Tím potlačují vlastní transkripci i transkripci *Rev-erba*, který dále nemůže kompetovat s *Rora* o navázání na RORE sekvence promotorů genu *Bmal1*, a tak dochází k transkripci *Bmal1*.

### 2.1.2 SYNCHRONIZACE

Cirkadiální oscilace hlavního cirkadiálního pacemakeru musí být každý den synchronizovány s vnějším prostředím. Zásadním Zeitgeberem savčích cirkadiálních hodin je světlo (Duffy and Czeisler, 2009). Světlo je přijímáno sítnicí, odkud vede přímá dráha do SCN v hypotalamu, tzv. retinohypotalamický trakt (RHT) (Moore et al., 1995). V závislosti na momentální, okamžité fázi cirkadiálního pacemakeru světelný puls vyvolá fázové posuny (předběhnutí, nebo zpoždění hodin), nebo fázi cirkadiálního pacemakeru nezmění (Czeisler et al., 1989).

### 2.1.2.1 Fázové posuny

Lidské cirkadiánní hodiny mohou odpovídat na tentýž světelný puls odlišně v závislosti na aktuálním vnitřním čase- fázi cirkadiánního pacemakeru. Načasování světelné expozice se odráží ve velikosti a směru fázového posunu cirkadiánního pacemakeru v odpovědi na světelný puls. Aplikace světelného pulsu uprostřed subjektivního dne vyvolá malý nebo žádný fázový posun. Největší fázové posuny cirkadiánní fáze jsou pozorovány během subjektivní noci. Světelný puls v pozdní subjektivní noci (v druhé polovině noci, zrána) způsobuje fázové předběhnutí vnitřních hodin, zatímco světelný puls aplikovaný v časně subjektivní noci (odpoledne až v první polovině noci) vede k fázovému zpoždění vnitřních hodin (Czeisler et al., 1989).

### 2.1.2.2 Retinohypotalamický trakt

Zjištění, že klasické fotoreceptory sítnice se podílí na světelné synchronizaci cirkadiánních rytmů pouze malou měrou, vyplynulo z experimentu s homozygotními myšmi mutanty s degenerovanou sítnicí bez fotoreceptorů. Tyto myši, přestože byly slepé, vykazovaly cirkadiánní odpověď na světlo (Foster et al., 1991). Další studie ukázaly, že gangliové buňky a malé množství amakrinních buněk sítnice exprimují nový typ opsinu, pojmenovaný melanopsin (Provencio et al., 2000). Melanopsin je zodpovědný za vnitřní světelnou citlivost podmnožiny gangliových buněk sítnice (Hattar et al., 2002). Experiment s myškami postrádajícími melanopsin i fotoreceptory ukázal, že se myši nedokáží synchronizovat s cyklem světla a tmy a pokračují ve „volném běhu“. Fotoreceptory gangliových buněk sítnice se tedy účastní světelné synchronizace cirkadiánních hodin (Panda et al., 2003).

Fotosenzitivní gangliové buňky integrují vnitřní informaci o světle spolu s podněty z fotoreceptorů a vysílají jednotný světelný signál do SCN skrze retinohypotalamický trakt (Gooley et al., 2001; Gamlin et al., 2007; Moore et al., 1995). Ze zakončení RHT v retinorecipientních VL-SCN je uvolňován glutamát spolu polypeptidem PACAP (z angl. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Hannibal et al., 2000). Neuropeptid PACAP se může vázat na tři typy receptorů – na specifický receptor pro PACAP (PAC<sub>1</sub>) anebo na VIP/PACAP receptory podtypu 1 a 2 (VPAC<sub>1</sub> a VPAC<sub>2</sub>), které mohou být aktivovány PACAP nebo VIP (Shivers et al., 1991). V SCN hlodavců jsou exprimovány mRNA receptorů typu PAC<sub>1</sub> a VPAC<sub>2</sub> (Cagampang et al., 1998a, 1998b). PACAP působí v SCN převážně skrze specifické PAC<sub>1</sub> receptory (Kopp et al., 1999).

Aminokyselina glutamát je primární neuropřenašeč RHT (Ebling, 1996). Jeho uvolnění způsobí rychlou depolarizaci postsynaptické membrány SCN neuronu (Meijer et al., 1993). Tato depolarizace je řízena AMPA ( $\alpha$ -amino-hydroxy-metyl-isoxazol-propionátovými) receptory. Depolarizací se uvolní extracelulární Mg<sup>2+</sup> blokující NMDA (N-metyl D-aspartátový) receptor. Glutamát tedy může aktivovat NMDA receptor, což způsobí vtok Ca<sup>2+</sup> do buňky. Depolarizace membrány též umožní vtok Ca<sup>2+</sup> napěťově řízenými vápníkovými kanály typu L (Nahm et al., 2005).

Vápník aktivuje několik specifických kináz, například Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinázy typu II a IV (CaMKII a CaMKIV) nebo mitogenem-aktivovanou proteinkinázu (MAPK) (Gau et al.,

2002; Sun et al., 1994). Tyto kinázy zahajují signální kaskádu dějů vedoucích k fosforylaci proteinu CREB vázajícího se na  $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP responšní elementy (CRE) promotorů genů *Per1* a *Per2*, a tím spustí jejich transkripci (Trávníčková-Bendová et al., 2002).

Přes indukci transkripce hodinových genů *Per1* a *Per2* nastavuje světlo fázi hlavního cirkadiálního pacemakeru v SCN. Aplikace světelného pulsu během subjektivního dne nevyvolá expresi *Per1* a *Per2* mRNA ve VL-SCN neuronech, oproti tomu světelný puls v subjektivní noci indukuje významný nárůst exprese *Per1* mRNA a světelný puls v časně subjektivní noci indukuje také expresi *Per2* mRNA v této oblasti SCN (Hamada et al., 2001).

## 2.2 PERIFERNÍ CIRKADIÁNNÍ HODINY

Skoro každá buňka našeho těla obsahuje vlastní cirkadiální oscilátor. Aby byly oscilátory sladěné do jednotného rytmu a zefektivněly se fyziologické a metabolické procesy jednotlivých orgánů, koordinuje hlavní cirkadiální pacemaker periferní oscilátory. Cirkadiální organizace periferních oscilátorů je řízena kombinací autonomní inervace, endokrinní signalizace, teploty a místních signálů. (Kalsbeek et al., 2004, 2008). Periferní cirkadiální oscilátory utváří cirkadiální rytmy endogenním mechanismem, podobným jako u hlavního cirkadiálního pacemakeru v SCN. Avšak cirkadiální rytmus v kultivovaných periferních tkáních je postupně po několika cyklech utlučen, protože postrádá synchronizační signály z hlavního cirkadiálního pacemakeru (Yamazaki et al., 2000).

Periferní hodiny mají význam pro tkáňově specifické funkce, což dokazuje nález 8-10 % genů v periferních tkáních myší, jejichž exprese je pod cirkadiální kontrolou (Storch et al., 2002). Periferní oscilátory byly nalezeny například v rohovce, hypofýze, plicích, srdci, játrech, nadledvinkách, ledvinách, kosterním svalstvu, ale také ve fibroblastech (Balsalobre et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004; Storch et al., 2002).

Nejlépe prostudovaný mechanismus řízení periferních rytmů z SCN se týká regulace syntézy melatoninu v epifýze. Informace o cirkadiální fázi je z SCN je přenášena do epifýzy multisynaptickou drahou, zahrnující postupně paraventriculární jádro hypotalamu, intermediální jádro hrudní části míchy a horní krční ganglion, jehož sympatické neurony vedou své axony do epifýzy (Larsen et al., 1998). V noci se u hlodavců z axonálních zakončení sympatických neuronů uvolňuje noradrenalin, který se váže na membránové adrenergní receptory pinealocyty a spouští cAMP signální kaskádu končící transkripcí genu *aanat* (Baler et al., 1997). Gen *aanat* kóduje arylalkylamin N-acetyltransferázu (AANAT), klíčový enzym při syntéze melatoninu. SCN jeho prostřednictvím regulují tvorbu melatoninu tak, aby byla vysoká v noci a nízká ve dne.

## 2.3 AUTONOMNÍ CIRKADIÁNNÍ OSCILÁTORY

Od většiny periferních cirkadiálních oscilátorů se oddělují autonomní cirkadiální oscilátory obsažené v sítnici a čichových lalocích tím, že si udržují své oscilace i v případě, že je SCN zničeno lézí. Oba oscilátory mají podobné vlastnosti jako hlavní cirkadiální hodiny v SCN. Jednotlivé buňky

těchto autonomních oscilátorů obsahují samostatné oscilátory (Granados-Fuentes et al., 2004b; Ruan et al., 2006; Tosini et al., 2007), které pokračují v utváření cirkadiálních rytmů genové exprese bez vnějších podnětů (Granados-Fuentes et al., 2004a; Tosini et al., 2007). Cirkadiální pacemaker v čichových lalocích ovlivňuje cirkadiální oscilátor v piriformní kůře, a tak řídí tamní cirkadiální rytmus čichového vnímání (Granados-Fuentes et al., 2006).

Cirkadiální systém v savčí sítnici kontroluje mnoho funkcí v sítnici, například rytmickou syntézu melatoninu, cirkadiální rytmus obsahu a obratu dopaminu, denní rytmus v produkci i funkci neuropřenašeče GABA, nebo také pH sítnice (Tosini and Menaker, 1996; Dmitriev and Mangel, 2001; Jaliffa et al., 2001; Doyle et al., 2002; Sakamoto et al., 2006).

První studie z devadesátých let ukázaly, že savčí sítnice obsahuje cirkadiální oscilátor nezávislý na hlavních cirkadiálních hodinách. *In vitro* kultury sítnic křečků totiž vykazovaly cirkadiální rytmus syntézy melatoninu, který byl schopen synchronizace na daný cyklus světla a tmy. Za konstantní tmy tento rytmus přetrvával po dobu pěti až šesti dní i za snížené teploty na 27°C. Tyto výsledky prokázaly, že cirkadiální oscilátor v sítnici, je schopen synchronizace s prostředím, „volného běhu“ za konstantních podmínek, teplotní kompenzace a také nezávislosti na hlavních cirkadiálních hodinách v SCN (Tosini and Menaker, 1996). Další studie přinesly důkazy o rytmické expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba* a *Rora* ve fotoreceptorech, ve vnitřní jaderné a gangliové vrstvě sítnice a v retinálním pigmentovém epitelu, která je nezávislá na signálech z SCN (Ruan et al., 2006; Baba et al., 2010; Tosini et al., 2007). Je tedy pravděpodobné, že savčí sítnice obsahuje více hierarchicky uspořádaných cirkadiálních oscilátorů.

Cirkadiální rytmicita *in vitro*, v lidské buněčné linii, byla poprvé ukázána v pigmentovaných epiteliálních buňkách sítnice, které po aplikaci sérového šoku (Balsalobre et al., 1998) vykazovaly rytmickou expresi genů *Per1*, *Per2* a tří izoform adenylátcyklázy (AC5, AC6 a AC7) s periodou blízkou 24 hodinám (Pavan et al., 2006). V pigmentovaných epiteliálních buňkách myši sítnice *in vivo* byla lokalizovaná cirkadiální exprese *Per2* mRNA synchronizovaná s rytmem vnějšího prostředí. Autoři přišli s myšlenkou, že cirkadiální hodiny v pigmentovém epitelu sítnice se synchronizují se světelnými cykly prostředí skrze cirkadiální uvolňování dopaminu z dopaminergních neuronů vnitřní sítnice (Baba et al., 2010).

Hlavními neuropřenašeči a neuromodulátory v sítnici jsou melatonin, dopamin a GABA (Tosini and Menaker, 1996; Jaliffa et al., 2001; Doyle et al., 2002). Bylo ukázáno, že dopamin a GABA nastavují fázi a amplitudu cirkadiálního rytmu v sítnici měřeného na rytmu *PER2::luc* (Ruan et al., 2008). V sítnici makaka rhesus a člověka chybí enzym konečné reakce syntézy melatoninu, hydroxyindol O-metyltransferáza (HIOMT), z čehož vyplývá, že zde dochází pouze k tvorbě prekurzoru melatoninu, N-acetylserotoninu (Bernard et al., 1995; Coon et al., 2002). Enzym AANAT, utvářející ze serotoninu N-acetylserotonin, se zřejmě podílí na minimalizaci tvorby oxidačních forem serotoninu a dalších arylalkylaminů v sítnici makaka rhesus. Zastává tedy v sítnici antioxidační funkci (Coon et al., 2002).

Zatímco autonomní cirkadiánní systém sítnice je již poměrně dobře popsán, informace o cirkadiánních hodinách čichového systému jsou zatím neúplné.

### 3 ČICHOVÝ SYSTÉM

Čich je jeden z vývojově nejstarších smyslů. Pachové podněty jsou životně důležité pro neosrstěná, slepá mláďata většiny savců (Rosenblatt, 1983), která se pomocí čichu orientují v noře, rozeznávají sourozence, matku nebo nalézají bradavku při kojení (Doty, 1986; Hudson and Distel, 1986). V dospělosti čich pomáhá při výběru plnohodnotné potravy, ale i při volbě sexuálního partnera, odhaluje možná rizika v prostředí a může evokovat radostné pocity (Patel and Pinto, 2014).

Hlavní fyziologickou funkcí čichu je detekce přítomnosti daného odorantu (pachové substance) ve vzduchu, na níž se podílí sensorické neurony čichového epitelu nosní sliznice. Každý čichový sensorický neuron nese pouze jeden typ odorantového receptoru, avšak jednotlivé odorantové receptory mohou rozpoznat i více odorantů. Taktéž jeden odorant může být rozpoznán více odorantovými receptory, protože se na ně může vázat různými strukturami své molekuly. Hlavními kritérii pro navázání odorantu na příslušné odorantové receptory jsou délka uhlíkového řetězce a typ navázané funkční skupiny. Odlišné odoranty jsou tedy rozpoznávány odlišnými kombinacemi aktivovaných odorantových receptorů, a tudíž jsou v mozku vyhodnoceny jako jiný čichový vjem. Větší koncentrace odorantu vedou k zapojení i méně citlivých příslušných odorantových receptorů, a proto k jinému kombinačnímu kódování (Malnic et al., 1999; Leinders-Zufall et al., 2000).

Čichový systém rozpoznává také feromony- specializované pachy vylučované živočichy za účelem komunikace mezi jedinci téhož druhu. Na detekci se podílí vomeronasální orgán umístěný na bázi nosního septa, jehož sensorické neurony vedou své axony do přídatných čichových laloků (Horowitz et al., 1999). U lidí jsou vomeronasální sensorické neurony rozptýlené v čichové sliznici (Kouros-Mehr et al., 2001; Rodriguez et al., 2000). Vomeronasální sensorické neurony se různí svou citlivostí, některé jsou aktivovány i velmi nízkými ( $10^{-11}$  M) koncentracemi feromonů, což naznačuje jejich specifitu pro jednotlivé feromony (Leinders-Zufall et al., 2000). Některé feromony mohou být rozpoznány receptory hlavního čichového epitelu a následně zpracovány hlavním čichovým systémem (Charra et al., 2012). Příkladem je feromon 2-metylbut-2-enal obsažený v mateřském mléce králíků, který pomáhá novorozenému mláděti k nalezení matčiny bradavky (Schaal et al., 2003). Tento feromon působí jako synchronizační signál pro cirkadiánní pacemakery v SCN i v čichových lalocích novorozených králíků (Trejo-Muñoz et al., 2014).

#### 3.1 MORFOLOGIE ČICHOVÉHO SYSTÉMU

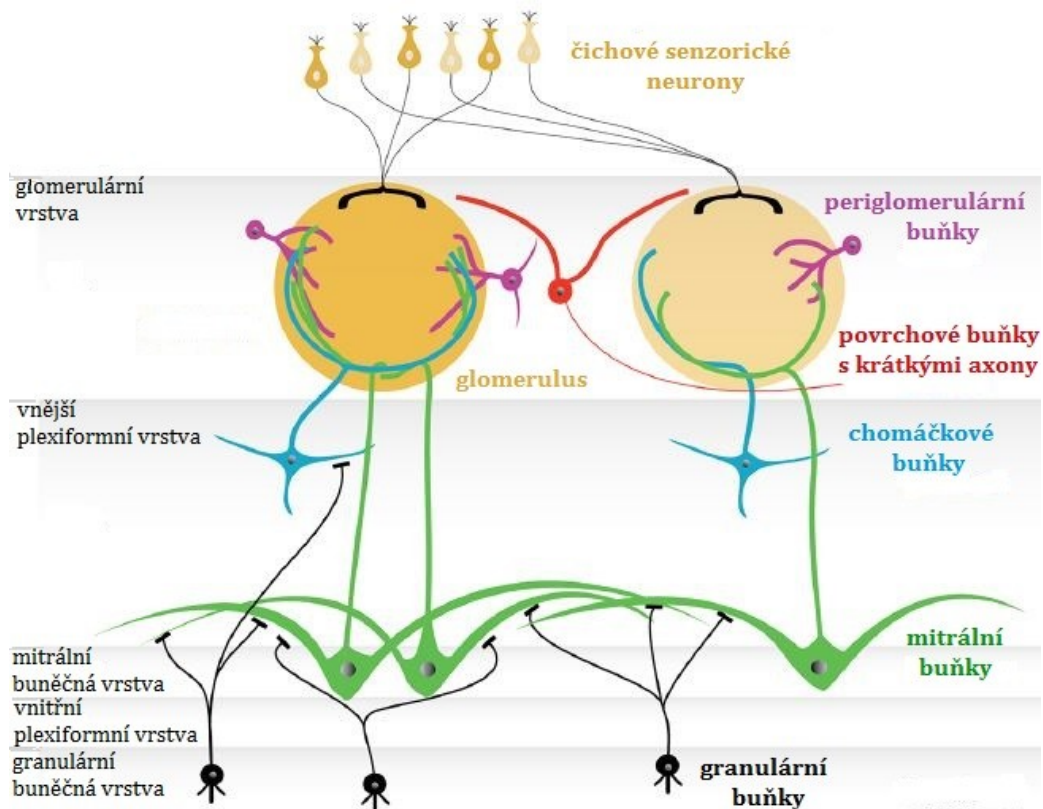
Čichové sensorické neurony se nachází v čichovém epitelu nosní sliznice. Jejich dendrity mají rozšířený povrch do tenkých cílů, které se zanořují do vrstvy hlenu na povrchu sliznice. Hlen

je vytvářen Bowmanovými žlázkami, které sousedí s čichovými buňkami. Neurity čichových sensorických neuronů prochází otvory *lamina cribrosa* čichové kosti a končí v čichových lalocích, ve spodině čelního laloku mozku (Čihák, 2004). Čichové laloky můžeme histologicky rozčlenit do pěti vrstev: glomerulární, vnější plexiformní, mitrální, vnitřní plexiformní a granulární, z nichž nejbliže k povrchu se nachází glomerulární vrstva (viz obrázek 2).

Glomerulární vrstva čichového laloku obsahuje kulovité synaptické sítě, zvané glomeruly, ve kterých se přepojují axony čichových sensorických buněk na dendrity projekčních neuronů. Glomeruly jsou obklopeny juxtaglomerulárními buňkami, rozlišovanými ve tři morfologicky odlišné buněčné typy: periglomerulární buňky, vnější chomáčkové buňky a povrchové buňky s krátkými axony (Pinching and Powell, 1971). Většina těchto buněk jsou interneurony. Část vnějších chomáčkových buněk dosahuje svými axony až do vnitřní plexiformní vrstvy téhož čichového laloku, kde se synapticky propojí s dendrity granulárních buněk (Liu and Shipley, 1994).

Do vnější plexiformní vrstvy zasahují převážně dendritická vlákna mitrálních a chomáčkových buněk a apikální dendrity granulárních buněk. Somata chomáčkových buněk jsou rozptýlená ve vnější plexiformní vrstvě, zatímco mitrální buňky se nachází v hlouběji umístěné mitrální buněčné vrstvě. Oba buněčné typy jsou projekčními neurony a jejich axony vybíhají do čichové kůry mozku, zatímco axony chomáčkových buněk zasahují jen do anteriorní oblasti čichové kůry (*nucleus olfactorius anterior, pars externa; nucleus olfactorius anterior, posteroventral pars; tuberculum olfactorium, anterolateral pars; cortex piriformis anterior, rostroventral pars*), axony mitrálních buněk vybíhají do všech oblastí čichové kůry (*nucleus olfactorius anterior, dorsal pars; tuberculum olfactorium, cortical pars; cortex piriformis anterior, dorsal pars; taenia tecta; cortex piriformis posterior; nucleus tractus olfactorius lateralis; nucleus cortex amygdaloideus anterior, nucleus cortex amygdaloideus posterior lateral; cortex entorhinalis lateralis*) (Igarashi et al., 2012).

Pod mitrální vrstvou se nachází vnitřní plexiformní vrstva, kterou probíhají axony mitrálních buněk a jednotlivé axony vnějších chomáčkových buněk, ale neobsahuje buněčná somata. Závěrečná granulární buněčná vrstva čichových laloků je tvořená převážně granulárními buňkami, které mají, podobně jako periglomerulární buňky, inhibiční funkci (Price and Powell, 1970).



Obrázek 2: Uspořádání savčích čichových laloků (převzato a upraveno podle Nagayama et al., 2014). Axony čichových senzoryckých neuronů vedou do glomerulů v čichových lalocích. Periglomerulární buňky, povrchové buňky s krátkými axony a vnější chomáčkové buňky se nachází v glomerulární vrstvě čichového laloku a slouží jako interneurony. Chomáčkové buňky a dendrity mitrálních buněk utváří vnější plexiformní vrstvu čichového laloku, pod níž se vyskytuje mitrální buněčná vrstva s mitrálními buňkami. Chomáčkové a mitrální buňky slouží jako projekční neurony, jejichž axony prochází následnou vnitřní plexiformní vrstvou a končí v čichové kůře. Granulózní buňky tvoří nejspodnější vrstvu čichového laloku, granulární buněčnou vrstvu, a slouží jako inhibiční interneurony projekčních neuronů.

### 3.2 TRANSDUKCE ČICHOVÉ INFORMACE

V hlenu pokrývajícím čichový epitel se rozpouští molekuly odorantů, na které se váží proteiny vázající odoranty (OBP). Tato vazba umožní vytvoření interakce s čichovými receptory spřaženými s trimerními G-proteiny (Buck and Axel, 1991). Navázání odorantů na příslušné receptory spouští transdukcí signálu řízenou G-proteiny vedoucí k depolarizaci membrány čichových senzoryckých neuronů. Čichový receptor může spouštět tři odlišné signalizační kaskády při navázání strukturně podobných ligandů: kanonickou cAMP signalizační dráhu, dráhu fosfolipázy C (PLC) nebo dráhu guanylátcyklázy (Yu et al., 2014).



### 3.2.1 *CAMP SIGNALIZAČNÍ DRÁHA*

Vazba odorantu na příslušný čichový receptor spřažený s G-proteinem aktivuje alfa podjednotku G-proteinu ( $G_{\text{olf}}$ ), která se oddělí od zbytku a naváže se na adenylátcyklázu typu III, aby ji uvedla v činnost. Adenylátcykláza typu III začne přeměňovat adenosintrifosfát (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), což způsobí nárůst vnitrobuněčné koncentrace cAMP (Bakalyar and Reed, 1990). Kanál řízený cyklickými nukleotidy umožní po navázání cAMP vtok kationtů, hlavně  $\text{Ca}^{2+}$ , do čichového sensorického neuronu (Brunet et al., 1996). Zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápníku stimuluje otevření chloridových kanálů řízených vápníkem a tok chloridových aniontů ven z buňky, a tudíž zesílení depolarizace membrány čichového sensorického neuronu (Kurahashi and Yau, 1993).

### 3.2.2 *DRÁHA FOSFOLIPÁZY C*

Čichové receptory spřažené s G-proteiny mohou po navázání odorantu aktivovat také fosfolipázu C (PLC), která hydrolyzuje membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $\text{PIP}_2$ ) na dvě signalizační molekuly, inositol-1,4,5-trisfosfát ( $\text{IP}_3$ ) a diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  se váže na vazebné místo  $\text{IP}_3$ -receptorů v membráně endoplasmatického retikula, jejichž součástí je také vápníkový kanál řízený  $\text{IP}_3$ , nacházející se na opačném konci proteinu než vazebná doména. Navázání  $\text{IP}_3$  změní konformaci receptoru vedoucí k otevření vápníkového kanálu a efluxu  $\text{Ca}^{2+}$  z vnitrobuněčných zásob endoplasmatického retikula do čichového sensorického neuronu (Mignery and Südhof, 1990; Streb et al., 1984). Zvýšené množství kationtů uvnitř neuronu vede k depolarizaci membránového potenciálu čichového sensorického neuronu (Boekhoff et al., 1990; Restrepo et al., 1992).

DAG-řízené kationtové kanály se účastní hlavní signalizační dráhy po feromonové stimulaci vomeronasálních sensorických neuronů v čichovém epitelu (Lucas et al., 2003).

### 3.2.3 *DRÁHA GUANYLÁTCYKLÁZY*

Podmnožina čichových sensorických neuronů exprimuje guanylátcyklázu D (GC-D) spojenou s membránou (Fülle et al., 1995). Tyto neurony rozpoznávají chemické podněty, které navázáním na katalytickou doménu GC-D aktivují její činnost. GC-D začne utvářet z guanosintrifosfátu (GTP) cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP), který stimuluje otevření kanálu řízeného cyklickými nukleotidy (konkrétně kanálu CNGA3) a vtok  $\text{Ca}^{2+}$  do čichového sensorického neuronu. Nárůst vnitrobuněčného  $\text{Ca}^{2+}$  vede k depolarizaci membrány neuronu a vzniku akčního potenciálu (Leinders-Zufall et al., 2007).

Tato podmnožina sensorických neuronů může sloužit k rozpoznání  $\text{CO}_2$ . Sensorické neurony exprimují karboanhydrázu II, enzym katalyzující přeměnu  $\text{CO}_2$  na hydrogenuhličitanový ion. Hydrogenuhličitanový ion přímo stimuluje cyklázovou doménu GC-D k tvorbě cGMP, které vyvolá otevření kanálu řízeného cyklickými nukleotidy a vtok kationtů do čichového sensorického neuronu (Hu et al., 2007; Sun et al., 2009).

Signální dráha guanylátcyklázy je aktivována také přítomností sirouhlíku (součást hlodavčího dechu), který se ve spojení s pachem potravy podílí na utváření sociálně předávané preference potravy mezi jedinci (Galef et al., 1988; Munger et al., 2010).

### 3.3 ČICHOVÁ DRÁHA

Odoranty se váží na příslušné receptory na výbězcích dendritů čichových sensorických neuronů rozmístěných po povrchu nosního epitelu. Každý čichový sensorický neuron exprimuje pouze jeden gen odorantového receptoru a axony čichových sensorických neuronů exprimujících tentýž odorantový receptor směřují do specifického páru glomerulů v čichovém laloku (Mombaerts et al., 1996). V glomerulech se axony čichových sensorických neuronů přepojují na dendrity projekčních neuronů – mitrálních a chomáčekových buněk, přičemž chomáčekové buňky odpovídají na širší rozsah odorantů než mitrální buňky (Nagayama et al., 2004). Projekční neurony promítají své axony do čichové kůry.

Piriformní kůra je největší kortikální oblast s přímým synaptickým vstupem z čichových laloků (Stettler and Axel, 2009). Anteriorní část piriformní kůry obsahuje více eferentních vláken z čichových laloků než posteriorní část (Zou et al., 2001). Axony pyramidálních buněk piriformní kůry utváří excitační synapse s proximálními dendrity granulárních buněk čichového laloku, jejichž prostřednictvím inhibují mitrální buňky přes dendrodendritické synapse. Touto cestou se piriformní kůra podílí na kódování čichové informace (Balu et al., 2007). Proximální vstupy z anteriorní části piriformní kůry mohou také poskytovat dlouhodobou potenciaci granulárních buněk, čímž se může podílet na čichovém učení (Shakhawat et al., 2014; Gao and Strowbridge, 2009).

*Nucleus olfactorius anterior, pars externa* (AONpE) slouží jako takzvaná spojka mezi kontralaterálními čichovými laloky. Projekční neurony daného glomerulu promítají své axony do ipsilaterálního AONpE, jehož místní neurony promítají výhradně do granulární vrstvy kontralaterálního čichového laloku, přímo pod glomerulus propojený se stejným typem odorantového receptoru. Tímto způsobem je přenášena čichová informace specifického odorantu mezi hemisférami. V AONpE může také docházet ke změnám specifické čichové informace, a tím k přenosu informace o určitém odorantu podle čichové paměti. Po odstranění AONpE obecně nedochází ke ztrátě čichu, ale k nedostatečnému přenosu čichové informace mezi hemisférami podle čichové paměti. AONpE je tedy kritickým místem pro oboustranný přenos čichové informace, avšak na přenosu čichové informace mezi hemisférami se podílí i další korové oblasti. (Yan et al., 2008).

Entorhinální kůra je oboustranně propojená axony s čichovými laloky i piriformní kůrou. Neurony povrchové vrstvy entorhinální kůry zprostředkovávají vedení čichové informace přijaté z piriformní kůry do hipokampu, odkud je zasilána zpětná vazba do entorhinální kůry (Dolorfo and Amaral, 1998; Mouly and Di Scala, 2006; Agster and Burwell, 2009). Spojení s hipokampem umožňuje účast entorhinální kůry na čichovém učení.

Odstranění čichových laloků ovlivňuje organizaci v primární čichové kůře. Dochází k atrofii dendritů neuronů piriformní kůry, pyramidálních neuronů v CA1 oblasti hipokampu i neuronů entorhinální kůry, což vede k poklesu vzrušivosti těchto neuronů (Morales-Medina et al., 2013b, 2013a). Remodelace neuronů piriformní a entorhinální kůry se zřejmě odráží v modifikaci neuronů CA1 oblasti hipokampu (Morales-Medina et al., 2013a). Společně s důkazem oboustranného propojení entorhinální kůry a hipokampu (Dolorfo and Amaral, 1998) tato zjištění potvrzují představu, že se entorhinální kůra spolu s hipokampem podílí na čichové paměti. Po odstranění čichových laloků ztratila entorhinální kůra vstupy z čichových laloků i piriformní kůry a dendrity hipokampálních neuronů se zkrátily, což se projevilo zhoršenou hipokampální prostorovou pamětí při pokusech v Morrisově vodním bludišti (Morales-Medina et al., 2013b).

Čichová informace se přenáší mezi neurony čichových laloků i v horizontálním směru pomocí sítě interneuronů glomerulární vrstvy- vnějších chomáčekových buněk, povrchových buněk s krátkými axony a také pomocí malého počtu axonů periglomerulárních buněk. Čichové senzorycké neurony předávají čichovou informaci na dendrity periglomerulárních buněk, vnějších chomáčekových buněk a mitrálních buněk. Periglomerulární buňky mohou přímo inhibovat mitrální buňky, zatímco vnější chomáčekové buňky aktivují povrchové buňky s krátkými axony, jež se nachází v meziglomerulárním prostoru, a excitují periglomerulární buňky sousedních glomerulů k inhibici mitrálních buněk. Vnější chomáčekové buňky spolu s povrchovými buňkami s krátkými axony utváří excitační síť, zatímco periglomerulární buňky mají tlumivý účinek na mitrální buňky (Hayar et al., 2004; Aungst et al., 2003).

## 4 CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM V ČICHOVÝCH LALOCÍCH

Čich jako smyslová modalita je významně ovlivněn cirkadiánním pacemakerem v čichových lalocích (Granados-Fuentes et al., 2011). Tento cirkadiánní systém má zřejmě významnou funkci již v časném vývoji mláďat savců, jež se řídí převážně čichem a u kterých cirkadiánní systém v SCN ještě plně nedozrál (Sládek et al., 2004; Montúfar-Chaveznavá et al., 2012; Granados-Fuentes et al., 2004b). Cirkadiánní pacemakery v čichových lalocích ukazují nezávislost na hlavních cirkadiánních hodinách, schopnost synchronizace s vnějšími teplotními cykly i vzájemné koordinace cirkadiánní rytmicity jednotlivých neuronů pomocí neuropeptidu VIP (Granados-Fuentes et al., 2004b; Miller et al., 2014). Tyto pacemakery se opírají o stejný molekulární základ jako hodiny v SCN, exprimují kanonické hodinové geny *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1*, *Clock* a *Npas2* (Shieh, 2003; Granados-Fuentes et al., 2011; Montúfar-Chaveznavá et al., 2012).

### 4.1 DŮKAZY PŘÍTOMNOSTI CIRKADIÁNNÍHO PACEMAKERU V ČICHOVÝCH LALOCÍCH

Studie zabývající se významem cirkadiánního systému v čichových lalocích ukázaly, že odstranění čichových laloků u myši a křečků vede k prodloužení „volně běžící“ periody lokomoční aktivity a

u myši také opoždí nástup aktivity (Pieper and Lobocki, 1991; Possidente et al., 1990). Pozdější studie na osmáčních degu odhalila významné prodloužení světelné synchronizace cirkadiálních rytmů lokomoční aktivity po fázovém posunu cyklu světla a tmy (Goel et al., 1998). Neboli bylo zjištěno, že čichové laloky ovlivňují účinek světelné informace na cirkadiální systém i jeho regulace rytmu v lokomoční aktivitě. Avšak teprve v nedávné době se začaly objevovat studie dokazující pacemakerovou vlastnost buněk čichových laloků.

Studie Abe a kolegů měla za cíl určit rytmické vlastnosti diencefalonu, telencefalonu, mesencefalonu a rhombencefalonu, které se liší ontogenetickým původem. Telencefalické struktury exprimovaly hodinový gen *Per1*, ale pouze v čichových lalocích se jeho exprese opakovala s cirkadiální periodou. Výsledky naznačovaly, že v mozku je lokalizováno více cirkadiálních oscilátorů vně SCN, mezi něž patří i čichové laloky (Abe et al., 2002). K podobnému závěru došel i Shieh, který pozoroval vysokou úroveň exprese mRNA hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Clock* v piriformní kůře, *nucleus olfactorius anterior*, hipokampu, ale také v mitrální a vnitřní granulózní vrstvě hlavních čichových laloků potkanů. Jelikož lokalizoval nejsilnější expresi genu *Clock* v hipokampálním *gyrus dentatus* a v mozečku, zatímco nejsilnější expresi genů *Per1* a *Per2* vykazovala SCN, usuzoval, že odlišnosti v intenzitě exprese by mohly odrážet specifické funkce cirkadiálního systému v daných oblastech mozku (Shieh, 2003).

Granados-Fuentes s kolegy se rozhodli zjistit vliv konstantního osvětlení na rytmy v čichových lalocích a určit fázi synchronizace mezi SCN a čichovými laloky. Použili transgenní potkany s genem pro luciferázu zapojeným za promotor hodinového genu *Per1* (*Per1-luc*) a pozorovali, že konstantní osvětlení prodloužilo a následně zrušilo cirkadiální rytmy chování a exprese *Per1-luc* v potkaních SCN, zatímco cirkadiální rytmy exprese genu *Per1* v čichových lalocích přetrvávaly. Podobně odstranění SCN u potkanů zrušilo cirkadiální rytmy chování, ale neovlivnilo cirkadiální rytmy v čichových lalocích. Tato zjištění ukazují, že čichové laloky oscilují nezávisle na SCN a pro udržení místních cirkadiálních oscilací nevyžadují signály z SCN. Čichové laloky tedy obsahují autonomní cirkadiální pacemaker nezávislý na SCN (Granados-Fuentes et al., 2004a).

V další studii se Granados-Fuentovi a jeho kolegům podařilo lokalizovat cirkadiální pacemakery v čichových lalocích. Jednotlivé neurony čichových laloků, konkrétně mitrální a chomáčekové buňky, transgenních potkanů (*Per1-luc*) vykazovaly odlišné cirkadiální periody v expresi *Per1-luc* v rozmezí od 18,9 do 25,3 hodiny. Cirkadiální oscilace se zřejmě utváří uvnitř těchto neuronů (Granados-Fuentes et al., 2004b).

Až o deset let později bylo prokázáno, že mitrální a chomáčekové buňky čichových laloků exprimují neuropeptid VIP a jeho receptor VPAC<sub>2</sub> (kódovaný genem *Vipr2*), které slouží k synchronizaci jejich cirkadiálních oscilací. Miller s kolegy pozoroval přetrvávající cirkadiální rytmy exprese PER2 v čichových lalocích *in vivo* při konstantní tmě u wild-type myši, zatímco VIP-deficientní myši vykazovaly za obdobných podmínek postupnou arytmiicitu PER2 exprese. VIP tedy synchronizoval cirkadiální rytmy exprese PER2 v čichových lalocích *in vivo*. Taktéž při konstantní tmě zkoumali vliv

VIP na cirkadiánní rytmus čichového vnímání. U VIP/*Vipr2*-deficientních myší nezaznamenali významné denní změny ve výkonnosti čichového vnímání oproti wild-type myším. VIP se zřejmě podílí na regulaci čichového chování a jeho cirkadiánní uvolňování pravděpodobně reguluje citlivost projekčních buněk na pachové podněty, s maximální výkonností související s aktivitou zvířat (Miller et al., 2014).

## 4.2 VÝVOJ CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU V ČICHOVÝCH LALOCÍCH

Cirkadiánní rytmy exprese hodinového genu *Per1* v čichových lalocích byly zjištěny již u devatenáctidenních embryí potkanů. V porovnání s genovou expresí *Per1* v čichových lalocích u jednodenních potkanů a týdenních potkanů byly pozorovány odlišnosti ve fázi jejich cirkadiánních rytmů. Vrchol exprese genu *Per1* u devatenáctidenních embryí nastal v pozdně subjektivní noci (okolo ZT21), v případě jednodenních potkanů v poledne (okolo ZT6) a u týdenních potkanů se blížil nástupu subjektivního soumraku (okolo ZT12). Pozorování demonstrují, že cirkadiánní rytmy v čichových lalocích jsou utvářeny již v časném stádiu vývoje potkanů. Jejich fáze se v průběhu vývoje mění a u týdenních potkanů dosahuje vrcholu, pozorovaného u fáze cirkadiánního rytmu dospělých jedinců (Abe et al., 2002; Granados-Fuentes et al., 2004b). Studie, zabývající se vývojem molekulárního mechanismu v SCN, ukázala expresi mRNA hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock* v SCN devatenáctidenních embryí potkanů, avšak bez zjevného cirkadiánního rytmu (Sládek et al., 2004). Ze srovnání těchto dat vyplývá, že cirkadiánní systém v čichových lalocích dozrává dříve než v SCN.

Kultury čichových laloků jednodenních a devatenáctidenních potkanů synchronizovaly svůj rytmus genové exprese *Per1* s teplotním cyklem (ZT0 až ZT12 36,8°C; ZT12 až ZT24 35,3°C). První den kultury dosahovaly vrcholu exprese *Per1* v ZT12,3 a po dobu následujících sedmi dní opakovaně těsně před přechodem z 36,8°C na 35,3°C s přibližně 24hodinovou periodou. Výsledky ukazují, že již první den po narození byly čichové laloky potkanů schopné synchronizace s fyziologickými oscilacemi teplot, a tato schopnost synchronizace se u nich vyvíjí časně v ontogenezi čichových laloků (Granados-Fuentes et al., 2004b).

V nedávné době byl zkoumán vývoj cirkadiánního systému v SCN a čichových lalocích u týdenních novorozených králíků a byla porovnávána jejich rytmická exprese hodinových genů s expresí pozorovanou u pětačtyřicetidenních králíků. Již u týdenních novorozených králíků byla patrná cirkadiánní exprese hodinových genů *Per1* a *Bmal1* v SCN, zatímco exprese genu *Cry1* se v SCN opakovala s periodou přibližně patnáct hodin. V periglomerulárních buňkách a v mitrální a vnitřní granulózní vrstvě čichových laloků novorozených i pětačtyřicetidenních králíků byl pozorován cirkadiánní rytmus exprese *Per1*, *Cry1* a *Bmal1* mRNA, přičemž obě věkové kategorie ukazovaly podobnou fázi a amplitudu 24hodinové exprese hodinových genů. Nástup exprese hodinových genů *Per1* a *Cry1* v čichových lalocích nastal v podobnou denní dobu, nejvyšší exprese genu *Per1* byla pozorována 12 hodin po nástupu světla. Výsledky naznačují, že cirkadiánní oscilátor

v čichových lalocích dozrává u slepých novorozených králíků, podobně jako u potkanů, dříve než v SCN a že cirkadiánní systém u novorozených králíků může být pravděpodobně synchronizován nesvětelnými čichovými podněty (Montúfar-Chaveznava et al., 2012).

Možný vztah cirkadiánních pacemakerů v čichovém systému a v SCN naznačily další zajímavé studie. U novorozených králíků byla zjištěna synchronizace cirkadiánních rytmů exprese PER1, CRY1 a BMAL1 v hlavních čichových lalocích, ale také v SCN, feromonem 2-metylbut-2-enal (2MB2) obsaženým v mateřském mléce (Schaal et al., 2003; Charra et al., 2012; Trejo-Muñoz et al., 2014). Pozorování odhalila, že SCN jsou citlivá na čichové podněty pouze v době od ZT0 do ZT18. Teprve ve věku, ve kterém mládě opouští noru a je vystaveno cyklu světla a tmy, začíná převládat světelná synchronizace jeho cirkadiánního systému přes SCN. Hlavní čichové laloky tudíž v časném období vývoje králíků zastávají dočasnou funkci hlavního cirkadiánního pacemakeru, protože světelný seřizovací systém skrze RHT dozrává až po narození (Davis et al., 1990; Trejo-Muñoz et al., 2014).

### 4.3 VÝSTUPNÍ RYTMY

Piriformní kůra získává přímé vstupy z mitrálních buněk čichových laloků. Může tak být považována za cílovou strukturu i cirkadiánního systému čichového laloku. Piriformní kůra sama také exprimuje hodinové geny, např. exprese hodinového genu *Per1* byla naměřena v piriformní kůře potkanů *in vitro*, avšak nevykazovala cirkadiánní oscilace (Abe et al., 2002). Granados-Fuentes a jeho kolegové chtěli zjistit, zda cirkadiánní hodiny obou struktur souvisí s čichovou funkcí. Měřili expresi okamžitého raného genu *c-Fos*, jež se běžně používá jako marker aktivace buněk, vyvolanou vůní cedrového oleje *in vivo* v čichovém systému myši. Za konstantní tmy vyvolala tato vůně podobné denní rytmy indukované exprese *c-Fos* v buňkách mitrální i granulózní vrstvy čichových laloků a v buňkách piriformní kůry. Největší množství *c-Fos* v buňkách bylo aktivováno během subjektivní noci a nejméně během subjektivního dne, což odpovídá noční aktivitě myši, a s ní spojené větší vzrušivosti neuronů čichového systému po pachové stimulaci během noci. Vůně cedrového oleje vyvolala také excitaci membrány mitrálních buněk čichových laloků i buněk piriformní kůry, což odpovídá jejich propojení a přenosu čichové informace (Granados-Fuentes et al., 2006).

Granados-Fuentes a kolegové chtěli také objasnit vliv SCN na pachem vyvolané rytmy v čichovém systému. Po odstranění SCN pozorovali přetrvávající rytmy *c-Fos* v čichových lalocích i v piriformní kůře myši vyvolané vůní cedrového oleje. Zjistili, že pachem vyvolané rytmy v čichovém systému nejsou pod kontrolou SCN, ale jsou pravděpodobně řízené cirkadiánním pacemakerem v čichových lalocích, jelikož i bez přítomnosti vůně cedrového oleje pozorovali spontánní cirkadiánní expresi *c-Fos* v buňkách čichových laloků a piriformní kůry. Odstranili proto myším bilaterální čichové laloky a *in vivo* pozorovali arytmiicitu spontánní exprese *c-Fos* v buňkách piriformní kůry během cirkadiánního cyklu. Tímto dokázali, že cirkadiánní pacemaker v čichových lalocích řídí rytmy čichového vnímání v piriformní kůře u myši (Granados-Fuentes et al., 2006).

Na závěr Granados-Fuentes s kolegy zkoumali vliv bulbektomie na lokomoční aktivitu myších sameček. Ukázali, že odstranění čichových laloků u myši významně snížilo počet dní potřebný pro resynchronizaci po šestihodinovém předběhnutí světelného cyklu. A naopak, že bulbektomie prodloužila dobu resynchronizace k šestihodinovému zpoždění světelného cyklu. Bulbektomie u myši také zkrátila „volně běžící“ periodu lokomočních rytmů řízených SCN, což mohlo být zapříčiněno ztrátou vstupů z čichových laloků do SCN. Výsledky poukazují na propojení SCN a čichových laloků, jejich vzájemné působení a ovlivňování. Zároveň však demonstrují, že čichové laloky ovlivňují denní chování řízené SCN (Granados-Fuentes et al., 2006).

V pozdější studii Granados-Funetes s kolegy ukázali, že i cirkadiální rytmy čichového rozlišování přetrvávají po odstranění SCN. Předpokládali, že molekulární mechanismus řídící tyto rytmy je podobný mechanismu regulujícímu cirkadiální lokomoční chování. Zkoumali proto narušení rytmů čichového rozlišování u myši s delecí hodinových genů *Bmal1*, *Npas2*, *Per1* a *Per2*. Zjistili, že *Bmal1*-deficientní myši postrádají cirkadiální rytmy čichového rozlišování, podobně tomu bylo i u *Per1<sup>m</sup>Per2<sup>m</sup>* double mutantních myši. Oproti tomu ztráta genu *Npas2* nevyvolala měřitelný vliv na tyto rytmy. Cirkadiální rytmy čichového rozlišování tedy závisí na hodinových genech *Per1*, *Per2* a *Bmal1*, zatímco *Npas2* není nezbytný pro tuto cirkadiální regulaci. Navíc *Per1<sup>m</sup>Per2<sup>m</sup>* double mutantní myši ukazovaly nepřetržitě zvýšenou čichovou výkonnost, z čehož vyplývá, že hodinové geny *Per1* a *Per2* řídí poklesy čichové citlivosti během dne. Výsledky naznačují, že cirkadiální hodiny, které řídí rytmy čichového rozlišování, snižují čichovou citlivost u myši během dne a používají podobné molekulární mechanismy jako kanonické hodiny v SCN (Granados-Fuentes et al., 2011).

#### 4.4 SYNCHRONIZÁTORY

Nejčastější a také majoritní Zeitgeber hlavních cirkadiálních hodin, světlo, nepřímo synchronizuje cirkadiální pacemaker v čichových lalocích a vyvolává expresi hodinových genů *Per1* a *Per2*. Avšak v případě mláďat králíků nejvyšší synchronizační funkci má mateřské mléko, které obsahuje feromony. Navíc byla prokázána i synchronizace cirkadiálního pacemakeru v čichových lalocích pomocí teplotních cyklů prostředí (Hamada et al., 2011; Nolasco et al., 2012; Granados-Fuentes et al., 2004b).

Hamada a kolegové zkoumali citlivost hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Bmal1* v čichových lalocích na odlišné intenzity světelných pulsů u myši. Silný světelný puls vyvolal expresi genů *Per1* a *Per2* hlavně v mitrálních buňkách a granulózní vrstvě čichových laloků, zatímco exprese genu *Bmal1* nebyla pozměněna žádným světelným pulsem. Autoři poprvé ukázali, že čichové laloky získávají světelnou informaci, která může vyvolat expresi genů *Per1* a *Per2*. Zdá se tedy, že nezávislý cirkadiální pacemaker v čichových lalocích může být synchronizován světelnými cykly prostředí. Světelné podněty jsou pravděpodobně přinášeny nepřímo z SCN (Hamada et al., 2011).

Synchronizace cirkadiánních rytmů v hlavních čichových lalocích k časově omezenému kojení byla prokázána na sedmidenních králících střídavě krmených jednou denně (buď ve 2 h, nebo v 10 h), nebo hladovějících. U krmených subjektů Nolasco a kolegové pozorovali nárůst proteinu c-FOS v době kojení, který byl patrný ještě o devadesát minut později. Tato exprese byla interpretována jako tzv. „food anticipatory activity“, kdy se zvýší pohybová aktivita zvířat a aktivita některých mozkových struktur v očekávání příjmu potravy (Mistlberger, 1993). V periglomerulární, mitrální a granulární buněčné vrstvě hlavních čichových laloků byla patrná rytmická exprese genu *Per1* s fázovými posuny čtyři až osm hodin po časově omezeném kojení. Z pozorování vyplynulo, že cirkadiánní rytmy v čichových lalocích králíků mláďat mohou být seřizovány časovaným sáním mléka (Nolasco et al., 2012).

Granados-Fuentes s kolegy vystavili po dobu osmi dní kultury neuronů čichových laloků potkanů teplotnímu režimu 12 h/ 36,8°C : 12 h/ 35,3°C, a zkoumali jejich synchronizační možnosti. Pozorovali, že neurony čichových laloků byly schopné synchronizace s fyziologickými oscilacemi teplot o 1,5°C a již od druhého dne expozice dosahovaly maxima těsně před přechodem z 36,8°C do 35,3°C. Oscilace neuronů vykazovaly průměrnou periodu  $21,9 \pm 0,6$  h. Autoři tedy demonstrovali, že neurony čichových laloků se dokáží synchronizovat s teplotními cykly prostředí (Granados-Fuentes et al., 2004b).

## 5 ZÁVĚR

Zmíněné studie prokázaly přítomnost autonomních cirkadiánních oscilátorů v mitrálních a chomáčkových buňkách čichových laloků savců, které vykazují nezávislost na hlavních cirkadiánních hodinách v SCN a mají schopnost synchronizovat se s vnějšími teplotními cykly. Tato vlastnost se u cirkadiánních pacemakerů v čichových lalocích objevuje již v časně fázi vývoje a byla prokázána u novorozených potkanů i králíků. Význam oscilátorů je dobře patrný i při následném vývoji mláďat hlodavců a králíků, jež jsou plně odkázáni na péči matky a řídí se hlavně čichem. V tomto období ještě zcela nedozrál cirkadiánní oscilátor v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, a proto cirkadiánní pacemakery v hlavních čichových lalocích dočasně zaujímají funkci hlavního cirkadiánního pacemakeru a synchronizují se nesvětelnými podněty, například již zmíněnými teplotními cykly prostředí nebo prostřednictvím feromonů obsažených v mateřském mléce. V dospělosti k synchronizaci těchto pacemakerů může sloužit také světlo, jako je tomu u hlavních cirkadiánních hodin. Světelná informace je do čichových laloků vedena nepřímou cestou ze suprachiasmatických jader a propojení obou pacemakerů dokazuje také vliv cirkadiánních pacemakerů v čichových lalocích na cirkadiánní rytmy lokomoční aktivity. Výstupní rytmy cirkadiánních pacemakerů v čichových lalocích se také promítají do rytmického čichového vnímání v piriformní kůře nebo mění se čichové citlivosti během dne. V minulém roce byla dokonce prokázána účast neuropeptidu VIP na synchronizaci jednotlivých pacemakerů v čichových lalocích



a také na udržení cirkadiánních rytmů čichového vnímání. Budoucí studie by se mohly zabírat prokázáním cirkadiánních rytmů čichového vnímání v ostatních oblastech primární čichové kůry než v oblasti piriformní kůry. Taktéž zajímavé by byly pokusy vysvětlující účinek odorantů na hlavní cirkadiánní hodiny a jimi řízené rytmy lokomoční aktivity nebo objevení alternativních cirkadiánních výstupů pacemakerů v čichových lalocích. V neposlední řadě stále visí otazník nad vzájemným vztahem molekulárních komponent mechanismu těchto pacemakerů a chybí důkazy osvětlující utváření cirkadiánních rytmů čichového chování.

## 6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., and Block, G. D. (2002). Circadian Rhythms in Isolated Brain Regions. *The Journal of Neuroscience* 22, 350–356.
- Abrahamson, E. E., and Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916, 172–191.
- Agster, K. L., and Burwell, R. D. (2009). Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19, 1159–86.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I  $\epsilon$  (CKI  $\epsilon$ ) and CKI $\delta$  in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology* 22, 1693–1703.
- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., and Lee, C. C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91, 1055–1064.
- Aungst, J. L., Heyward, P. M., Puche, A. C., Karnup, S. V., Hayar, A., Szabo, G., and Shipley, M. T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426, 623–629.
- Baba, K., Sengupta, A., Tosini, M., Contreras-Alcantara, S., and Tosini, G. (2010). Circadian regulation of the PERIOD 2::LUCIFERASE bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium-choroid. *Molecular Vision* 16, 2605–2611.
- Bakalyar, H. A., and Reed, R. R. (1990). Identification of a Specialized Adenylyl Cyclase That May Mediate Odorant Detection. *Science* 250, 1403–1406.
- Baler, R., Covington, S., and Klein, D. C. (1997). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter cAMP activation via cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 272, 6979–85.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929–937.
- Balu, R., Pressler, R. T., and Strowbridge, B. W. (2007). Multiple modes of synaptic excitation of olfactory bulb granule cells. *The Journal of neuroscience* 27, 5621–5632.
- Bernard, M., Donohue, S. J., and Klein, D. C. (1995). Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and Y79 retinoblastoma cells. *Brain Research* 696, 37–48.
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., and Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *The EMBO journal* 9, 2453–2458.
- Brunet, L. J., Gold, G. H., and Ngai, J. (1996). General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide – Gated Cation Channel. *Neuron* 17, 681–693.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–87.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., and Pagano, M. (2007). SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science* 316, 900–904.

- Cagampang, F. R. A., Piggins, H. D., Sheward, W. J., Harmar, A. J., and Coen, C. W. (1998a). Circadian changes in PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic and supraoptic nuclei. *Brain Research*, 218–222.
- Cagampang, F. R. A., Sheward, W. J., Harmar, A. J., Piggins, H. D., and Coen, C. W. (1998b). Circadian changes in the expression of vasoactive intestinal peptide 2 receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Molecular Brain Research*, 108–112.
- Coon, S. L., Del Olmo, E., Scott Young III, W., and Klein, D. C. (2002). Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: Focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 4699–4706.
- Crumbley, C., Wang, Y., Kojetin, D. J., and Burris, T. P. (2010). Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB $\alpha$ /ROR $\alpha$  target gene. *Journal of Biological Chemistry* 285, 35386–35392.
- Czeisler, C. A., Kronauer, R. E., Allan, J. S., Duffy, J. F., Jewett, M. E., Brown, E. N., and Ronda, J. M. (1989). Bright Light Induction of Strong (Type 0) Resetting of the Human Circadian Pacemaker. *Science* 244, 1328–1333.
- Čihák, Radomír. *Anatomie 3 - Druhé, upravené a doplněné vydání*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2004. 406, 457 s. ISBN 978-80-247-1132-4.
- Davis, F. C., Boada, R., and LeDeaux, J. (1990). Neurogenesis of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 519, 192–9.
- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. (2007). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature neuroscience* 10, 543–545.
- Dmitriev, A. V., and Mangel, S. C. (2001). Circadian Clock Regulation of pH in the Rabbit Retina. *The Journal of neuroscience* 21, 2897–2902.
- Dolorfo, C. L., and Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 398, 25–48.
- Doty, R. L. (1986). Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42, 257–71.
- Doyle, S. E., McIvor, W. E., and Menaker, M. (2002). Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *Journal of Neurochemistry* 83, 211–219.
- Duffy, J. F., and Czeisler, C. A. (2009). Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin* 4, 165–177.
- Ebling, F. J. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *progress in neurobiology*, 109–32.
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., and Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I $\epsilon$ . *Journal of Biological Chemistry* 277, 17248–17254.
- Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., and Virshup, D. M. (2005). Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI $\epsilon$ -Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2795–2807.

- Foster, R. G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., and Menaker, M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *Journal of comparative physiology A* 169, 39–50.
- Fülle, H. J., Vassar, R., Foster, D. C., Yang, R. B., Axel, R., and Garbers, D. L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3571–3575.
- Galef, B. G. J., Mason, J. R., Preti, G., and Bean, N. J. (1988). Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. *Physiol Behav* 42, 119–24.
- Gamlin, P. D. R., McDougal, D. H., Pokorny, J., Smith, V. C., Yau, K.-W., and Dacey, D. M. (2007). Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Research* 47, 946–954.
- Gao, Y., and Strowbridge, B. W. (2009). Long-term plasticity of excitatory inputs to granule cells in the rat olfactory bulb. *Nature neuroscience* 12, 731–733.
- Garcia, J. A., Zhang, D., Estill, S. J., Michnoff, C., Rutter, J., Reick, M., Scott, K., Diaz-Arrastia, R., and McKnight, S. L. (2000). Impaired Cued and Contextual Memory in NPAS2-Deficient Mice. *Science* 288, 2226–2230.
- Gau, D., Lemberger, T., Gall, C. Von, Kretz, O., Minh, N. Le, Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H. W., and Schütz, G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock. *Neuron* 34, 245–253.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science* 280, 1564–69.
- Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR $\alpha$ , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes and Development* 8, 538–553.
- Goel, N., Lee, T. M., and Pieper, D. R. (1998). Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male *Octodon degus*. *Brain Research*, 229–236.
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., and Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature neuroscience* 4, 1165.
- Granados-Fuentes, D., Ben-Josef, G., Perry, G., Wilson, D. A., Sullivan-Wilson, A., and Herzog, E. D. (2011). Daily rhythms in olfactory discrimination depend on clock genes but not the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 26, 552–560.
- Granados-Fuentes, D., Prolo, L. M., Abraham, U., and Herzog, E. D. (2004a). The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience* 24, 615–9.
- Granados-Fuentes, D., Saxena, M. T., Prolo, L. M., Aton, S. J., and Herzog, E. D. (2004b). Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *European Journal of Neuroscience* 19, 898–906.
- Granados-Fuentes, D., Tseng, A., and Herzog, E. D. (2006). A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *The Journal of neuroscience* 26, 12219–25.

- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms* 20, 391–403.
- Hamada, T., Honma, S., and Honma, K. (2011). Light responsiveness of clock genes, *Per1* and *Per2*, in the olfactory bulb of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409, 727–731.
- Hamada, T., Lesauter, J., Venuti, J. M., and Silver, R. (2001). Expression of Period Genes: Rhythmic and Nonrhythmic Compartments of the Suprachiasmatic Nucleus Pacemaker. *The Journal of neuroscience* 21, 7742–7750.
- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O. P., and Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and Glutamate Are Co-Stored in the Retinohypothalamic Tract. *The journal of comparative neurology* 155, 147–155.
- Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K.-W. (2002). Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Hayar, A., Karnup, S., Ennis, M., and Shipley, M. T. (2004). External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *The Journal of neuroscience* 24, 6676–6685.
- Horowitz, L. F., Montmayeur, J.-P., Echelard, Y., and Buck, L. B. (1999). A genetic approach to trace neural circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3194–3199.
- Hu, J., Zhong, C., Ding, C., Chi, Q., Walz, A., Mombaerts, P., Matsunami, H., and Luo, M. (2007). Detection of near-atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub> by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317, 953–957.
- Huang, N., Chelliah, Y., Shan, Y., Taylor, C. A., Yoo, S.-H., Partch, C., Green, C. B., Zhang, H., and Takahashi, J. S. (2012). Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* 337, 189–194.
- Huang, Z. J., Edery, I., and Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364, 259–62.
- Hudson, R., and Distel, H. (1986). Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 37, 123–8.
- Charra, R., Datiche, F., Casthano, A., Gigot, V., Schaal, B., and Coureaud, G. (2012). Brain processing of the mammary pheromone in newborn rabbits. *Behavioural Brain Research* 226, 179–188.
- Igarashi, K. M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W. R., et al. (2012). Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *Journal of Neuroscience* 32, 7970–7985.
- Jaliffa, C. O., Saenz, D., Resnik, E., Sarmiento, M. I. K., and Rosenstein, R. E. (2001). Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Research* 912, 195–202.
- Kalsbeek, A., La Fleur, S., Van Heijningen, C., and Buijs, R. M. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *The Journal of neuroscience* 24, 7604–13.

- Kalsbeek, A., Foppen, E., Schaliij, I., Van Heijningen, C., van der Vliet, J., Fliers, E., and Buijs, R. M. (2008). Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate. *PloS one* 3, e3194.
- Kopp, M. D. A., Schomerus, C., Dehghani, F., Korf, H.-W., and Meissl, H. (1999). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Melatonin in the Suprachiasmatic Nucleus: Effects on the Calcium Signal Transduction Cascade. *The Journal of neuroscience* 19, 206–219.
- Kouros-Mehr, H., Pintchovski, S., Melnyk, J., Chen, Y.-J., Friedman, C., Trask, B., and Shizuya, H. (2001). Identification of non-functional human VNO receptor genes provides evidence for vestigiality of the human VNO. *Chemical senses* 26, 1167–1174.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193–205.
- Kurahashi, T., and Yau, K.-W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363, 71–74.
- Larsen, P. J., Enquist, L. W., and Card, J. P. (1998). Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *European Journal of Neuroscience* 10, 128–145.
- Lee, H.-M., Chen, R., Kim, H., Etchegaray, J.-P., Weaver, D. R., and Lee, C. (2011). The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16451–16456.
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R. E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D. L., Reed, R. R., Zufall, F., and Munger, S. D. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14507–14512.
- Leinders-Zufall, T., Lane, A. P., Puche, A. C., Ma, W., Novotny, M. V, Shipley, M. T., and Zufall, F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405, 792–796.
- Lim, C., and Allada, R. (2013). Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nature neuroscience* 16, 1544–50.
- Liu, W. L., and Shipley, M. T. (1994). Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol* 346, 541–58.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* 40, 551–561.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L. B., and Hughes, H. (1999). Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* 96, 713–723.
- Meijer, J. H., Albus, H., Weidema, F., and Ravesloot, J. H. (1993). The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Research*, 284–8.
- Mignery, G. A., and Südhof, T. C. (1990). The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *The EMBO journal* 9, 3893–3898.

- Miller, J.-E. K., Granados-Fuentes, D., Wang, T., Marpegan, L., Holy, T. E., and Herzog, E. D. (2014). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythms in mammalian olfactory bulb and olfaction. *The Journal of neuroscience* 34, 6040–6.
- Mistlberger, R. E. (1993). Effects of scheduled food and water access on circadian rhythms of hamsters in constant light, dark, and light:dark. *Physiology & Behavior* 53, 509–516.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an Olfactory Sensory Map. *Cell* 87, 675–686.
- Montúfar-Chaveznava, R., Hernández-Campos, O., Hudson, R., and Caldelas, I. (2012). Differential maturation of the molecular clockwork in the olfactory bulb and suprachiasmatic nucleus of the rabbit. *Neuroscience* 207, 198–207.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., and Card, J. P. (1995). The retinohypothalamic tract originates from distinct subset of retinal ganglion cells. *The journal of comparative neurology*, 351–366.
- Morales-Medina, J. C., Juárez, I., Iannitti, T., and Flores, G. (2013a). Olfactory bulbectomy induces neuronal rearrangement in the entorhinal cortex in the rat. *Journal of chemical neuroanatomy* 52, 80–6.
- Morales-Medina, J. C., Juárez, I., Venancio-García, E., Cabrera, S. N., Menard, C., Yu, W., Flores, G., Mechawar, N., and Quirion, R. (2013b). Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience* 236, 233–43.
- Mouly, A.-M., and Di Scala, G. (2006). Entorhinal cortex stimulation modulates amygdala and piriform cortex responses to olfactory bulb inputs in the rat. *Neuroscience* 137, 1131–41.
- Munger, S. D., Leinders-Zufall, T., McDougall, L. M., Cockerham, R. E., Schmid, A., Wandernoth, P., Wennemuth, G., Biel, M., Zufall, F., and Kelliher, K. R. (2010). An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning. *Current Biology* 20, 1438–1444.
- Nagayama, S., Homma, R., and Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in neural circuits* 8, 1–19.
- Nagayama, S., Takahashi, Y. K., Yoshihara, Y., and Mori, K. (2004). Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *Journal of neurophysiology* 91, 2532–40.
- Nahm, S.-S., Farnell, Y. Z., Griffith, W., and Earnest, D. J. (2005). Circadian regulation and function of voltage-dependent calcium channels in the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of neuroscience* 25, 9304–9308.
- Nolasco, N., Juárez, C., Morgado, E., Meza, E., and Caba, M. (2012). A circadian clock in the olfactory bulb anticipates feeding during food anticipatory activity. *PloS one* 7, e47779.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., Pletcher, M. T., Sato, T. K., Wiltshire, T., Andahazy, M., et al. (2003). Melanopsin Is Required for Non – Image-Forming Photoc Responses in Blind Mice. *Science* 301, 525–527.
- Patel, R. M., and Pinto, J. M. (2014). Olfaction: anatomy, physiology, and disease. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 27, 54–60.

- Pavan, B., Frigato, E., Pozzati, S., Prasad, P. D., Bertolucci, C., and Biondi, C. (2006). Circadian clocks regulate adenylyl cyclase activity rhythms in human RPE cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350, 169–173.
- Pieper, D. R., and Loboeki, C. A. (1991). Olfactory bulbectomy lengthens circadian period of locomotor activity in golden hamsters. *The American journal of physiology*, 973–8.
- Pinching, A. J., and Powell, T. P. S. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9, 305–345.
- Van den Pol, A. N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *The journal of comparative neurology journal* 191, 661–702.
- Possidente, B., Lumia, A. R., McGinnis, M. Y., Teicher, M. H., DeLemos, E., Sterner, L., and Deros, L. (1990). Olfactory bulb control of circadian activity rhythm in mice. *Brain Research*, 325–8.
- Preitner, N., Damiola, F., Molina, L. L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB  $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Price, J. L., and Powell, T. P. S. (1970). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7, 91–123.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., and Rollag, M. D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of neuroscience* 20, 600–605.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., and Menaker, M. (1990). Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science* 247, 975–978.
- Ralph, M. R., and Menaker, M. (1988). A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. *Science* 241, 1225–1227.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., and McKnight, S. L. (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506–509.
- Restrepo, D., Teeter, J. H., Honda, E., Boyle, A. G., Marecek, J. F., Prestwich, G. D., and Kalinoski, D. L. (1992). Evidence for an InsP<sub>3</sub>-gated channel protein in isolated rat olfactory cilia. *The American journal of physiology* 263, 667–73.
- Rodriguez, I., Greer, C. A., Mok, M. Y., and Mombaerts, P. (2000). A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature genetics* 26, 18–19.
- Rosenblatt, J. S. (1983). Olfaction mediates developmental transition in the altricial newborn of selected species of mammals. *Developmental Psychobiology* 16, 347–375.
- Ruan, G.-X., Allen, G. C., Yamazaki, S., and McMahon, D. G. (2008). An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS biology* 6, 2248–2265.
- Ruan, G.-X., Zhang, D.-Q., Zhou, T., Yamazaki, S., and McMahon, D. G. (2006). Circadian organization of the mammalian retina. *PNAS* 103, 9703–9708.
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Iuvone, P. M., and Tosini, G. (2006). Intracocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Molecular vision* 12, 117–124.



- Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K., et al. (1998). Multitissue Circadian Expression of Rat period Homolog (rPer2) mRNA Is Governed by the Mammalian Circadian Clock, the Suprachiasmatic Nucleus in the Brain. *The Journal of biological chemistry* 273, 27039–27042.
- Shakhawat, A. M. D., Harley, C. W., and Yuan, Q. (2014). Arc Visualization of Odor Objects Reveals Experience-Dependent Ensemble Sharpening, Separation, and Merging in Anterior Piriform Cortex in Adult Rat. *The Journal of neuroscience* 34, 10206–10210.
- Shieh, K.-R. (2003). Distribution of the rhythm-related genes rPERIOD1, rPERIOD2, and rCLOCK, in the rat brain. *Neuroscience* 118, 831–843.
- Shivers, B. D., Görös, T. J., Gottschall, P. E., and Arimura, A. (1991). Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology*, 3055–65.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., and Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424, 68–72.
- Siepkka, S. M., Yoo, S.-H., Park, J., Lee, C., and Takahashi, J. S. (2007). Genetics and Neurobiology of Circadian Clocks in Mammals. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 72, 251–9.
- Sládek, M., Sumová, A., Kováčiková, Z., Bendová, Z., Laurinová, K., and Illnerová, H. (2004). Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6231–6236.
- Stephan, F. K., and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 1583–1586.
- Stettler, D. D., and Axel, R. (2009). Representations of Odor in the Piriform Cortex. *Neuron* 63, 854–864.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., and Weitz, C. J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78–83.
- Streb, H., Bayerdörffer, E., Haase, W., Irvine, R. F., and Schulz, I. (1984). Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J Membr Biol* 81, 241–253.
- Sun, L., Wang, H., Hu, J., Han, J., Matsunami, H., and Luo, M. (2009). Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO2 neurons is activated by bicarbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2041–2046.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., and Maurer, R. A. (1994). Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & Development*, 2527–2539.
- Takeda, Y., Jothi, R., Birault, V., and Jetten, A. M. (2012). ROR $\gamma$  directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Research* 40, 8519–8535.
- Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., Yamamoto, S., et al. (1998). A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLN. *EMBO Journal* 17, 4753–4759.

- Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., and Castanon-Cervantes, O. (2007). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 3866–3871.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419–421.
- Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *PNAS* 99, 7728–33.
- Trejo-Muñoz, L., Navarrete, E., Montúfar-Chaveznava, R., and Caldelas, I. (2014). Temporal modulation of the canonical clockwork in the suprachiasmatic nucleus and olfactory bulb by the mammary pheromone 2MB2 in pre-visual rabbits. *Neuroscience* 275, 170–83.
- Ukai, H., and Ueda, H. R. (2010). Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks. *Annual review of physiology* 72, 579–603.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682–685.
- Yan, Z., Tan, J., Qin, C., Lu, Y., Ding, C., and Luo, M. (2008). Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron* 58, 613–24.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkka, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *PNAS* 101, 5339–5346.
- Yu, W., Nomura, M., and Ikeda, M. (2002). Interactivating Feedback Loops within the Mammalian Clock: BMAL1 Is Negatively Autoregulated and Upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 941, 933–941.
- Yu, Y., Boyer, N. P., and Zhang, C. (2014). Three structurally similar odorants trigger distinct signaling pathways in a mouse olfactory neuron. *Neuroscience* 275, 194–210.
- Zou, Z., Horowitz, L. F., Montmayeur, J. P., Snapper, S., and Buck, L. B. (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* 414, 173–179.