

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Aneta Kubištová

Vliv narušení funkce cirkadiánního systému na vznik chorob gastrointestinálního traktu
Impact of circadian system disruption on development of gastrointestinal disorders

Bakalářská práce

Školitel: doc. PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

Praha 2018

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Aleně Sumové, CSc., DSc. za odborné rady, ochotu a vstřícnost při zpracovávání bakalářské práce.

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, 28. 4. 2018

Podpis

Abstrakt

Schopnost vnímat a přizpůsobit se 24-hodinovým cyklům pozorujeme u většiny živých organismů na Zemi. U savců je vnitřní časový systém složen z cirkadiánních hodin, které jsou umístěny v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, a periferních hodin uložených v různých tkáních a orgánech těla. Tyto hodiny se přizpůsobují změnám ve vnějších podmínkách, jako je např. cyklus střídání světla a tmy nebo cyklus v příjmu potravy. Periferní hodiny v orgánech trávicího traktu jsou synchronizovány jednak signály z centrálních hodin v suprachiasmatických jádrech a také signály o příjmu potravy. Pokud jsou tyto signály vzájemně v rozporu, může dojít k rozvoji chorob gastrointestinálního systému, spojených s neefektivním trávením nebo dokonce ke zvýšenému riziku nádorového onemocnění. Tato práce se soustředí na cirkadiánní rytmy v těle obecně, se zaměřením na rytmy v gastrointestinálním traktu a na význam cirkadiánních hodin pro jeho správnou funkci. Dále se zaměří na souvislost mezi desynchronizací cirkadiánních hodin a rozvojem onemocnění, a to především obezity a nádorového onemocnění.

Klíčová slova: cirkadiánní hodiny, synchronizace, příjem potravy, obezita, nádorové onemocnění

Abstract

The ability to sense 24-hour cycles in external environment and to adapt to them is present in a great array of species living on the Earth. Mammals possess internal time-keeping system which is composed of circadian clocks located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus and peripheral clocks in various tissues and organs of the body. These clocks are adapting to the changes of external environment, such as light and dark cycles or feeding cycles. Peripheral clocks in the organs of the digestive system are synchronized with the signals derived from the central clock in the SCN and also with signals from food intake. Discordance between these signals may result in development of various diseases of the gastrointestinal tract (GIT) related to insufficient digestion or even in higher risk of developing a cancer. This bachelor thesis is generally aimed at circadian rhythms in the body, with the focus on rhythms in the GIT. It will deal with the importance of the circadian rhythms for correct GIT functions. Furthermore, the thesis is focused on connection between the desynchronization of the circadian clock and GIT disease development, namely of obesity and cancer.

Key words: circadian clock, entrainment, food intake, obesity, cancer

Seznam použitých zkratk

ACACA	Acetyl-CoA karboxyláza 1
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
BMAL1	brain and muscle ARNT-like 1
CCGs	hodinami kontrolované geny
CDC	cyklin-dependentní kináza
CKI	kasein kináza 1
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
c-MYC	MYC proto-onkogen
CREB	cAMP responsivní element-vázající protein
CRY	cryptochrome
DBP	albumin D-box vázající protein
DEX	dexametazon
E-box	enhancer box
FASN	syntáza mastných kyselin
FBXL3	F-box/LRR-repeat protein 3
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GLUT-1	glukózový transportér 1
GSK3 β	glykogen syntáza kináza 3 β
ipRGCs	vnitřní fotosenzitivní retinální gangliové buňky
IR	imunitní odpověď
LD	light/dark (jedinec na standardním světelném režimu)
LL	light/light (jedinec je na stálém světle)
LUC	luciferáza
MT	mutant
MT-LR	mutant-liver restored (obnovená funkce jater)
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
P20	20 kDa protein

P21..... 21 kDa protein
PER..... period
PPAR α peroxizom proliferátorem–aktivovatelný receptor α
PVN.....paraventrikulární jádro
REV-ERB..... reverse strand of *ERBA*
RHT.....retinohypotalamický trakt
ROR..... retinoic acid receptor related orphan receptor
ROREROR elementy (retinoic acid related orphan receptor response elements)
SCD1 stearoyl-CoA desaturáza 1
SCN.....suprachiasmatická jádra
TTFL transkripčně translační zpětnovazebná smyčka
VEGF cévní endoteliální růstový faktor
WT..... wild-type

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Molekulární mechanismus transkripčně translačních zpětnovazebných smyček.....	2
2.1 Primární smyčka	2
2.2 Sekundární smyčka.....	2
2.3 Role jaderných receptorů REV-ERB α a ROR α v metabolismu lipidů.....	3
3. Centrální hodiny v SCN a jejich seřizování.....	5
4. Přítomnost periferních oscilátorů v orgánech trávicí soustavy.....	7
5. Desynchronizace cirkadiálního systému	8
5.1 Desynchronizace cirkadiálního systému změnou v režimu příjmu potravy.....	8
5.1.1 Dopad poruchy časových regulací na metabolismus	10
5.1.2 Molekulární mechanismus adaptace periferních tkání na časový posun v příjmu potravy	11
5.1.3 Reakce SCN na příjem potravy	12
5.1.4 Desynchronizace jaterních hodinových genů je klíčová při rozvoji obezity..	12
5.2 Vliv desynchronizace cirkadiálního systému na buněčný cyklus a výskyt rakoviny.....	14
5.2.1 Cirkadiální regulace buněčného cyklu	14
5.2.2 Vliv cirkadiální desynchronizace na rychlost růstu nádorové tkáně.....	15
6. Závěr	19
7. Seznam použité literatury.....	22

1. ÚVOD

Úspěšnost druhu je do značné míry úměrná jeho schopnosti přizpůsobit se na podmínky v místě výskytu. Jednou z takových podmínek jsou cyklické změny v prostředí, jako je například změna intenzity světla během dne, a proto se ukázalo jako výhodné řídit procesy u živých organismů s přibližně 24 h (cirkadiálními) cykly. Podle obecně přijatých teorií se cirkadiální hodiny vyvinuly už u jednobuněčných organismů a pro svou výhodnost se schopnost odměřovat denní cykly zachovala až do současnosti. U některých organismů pozorujeme absenci cirkadiálních rytmů. Jedná se o výsledek „regresivní evoluce“, kdy jsou tyto mechanismy vypnuty u druhů, kteří žijí v necyklickém prostředí, a u kterých tak předvídání denní doby není výhodné.

Označení „cirkadiální“ rytmus pochází z latinských slov „circa“ znamenající okolo a „dies“ přeloženo jako den. Systém cirkadiálních hodin dovoluje organismům předvídat denní dobu, kdy mají být aktivní a kdy ve stavu spánku a seřídít tak podle tohoto cyklu jejich metabolismus tj. například snížit potřebu příjmu potravy v noci (u denních druhů). Tyto hodiny se nacházejí ve většině buněk těla. U savců jsou uspořádány tak, že centrální hodiny v mozku nastavují fázi tzv. periferních hodin v orgánech a tkáních prostřednictvím různých mechanismů, zahrnující například autonomní nervový systém a hormonální hladiny. Bez signálů zvenčí jsou cirkadiální hodiny schopny vytvářet signál s periodou, která se pouze blíží 24 h. Pro 24-hodinové cykly je nutné cirkadiální systém seřizovat odpovídajícími signály z vnějšího prostředí. Takovéto signály označujeme jako *zeitgeber* („udavači času“) a jeden z hlavních je světlo dopadající na sítnici oka. Signály ze sítnice se dále dostávají do oblasti hypotalamu, kde seřizují centrální cirkadiální hodiny v suprachiasmatických jádrech (dále jako SCN) a informují systém o tom, zda je den či noc. V posledních letech se prokazuje, že dalším důležitým signálem pro seřizování periferních cirkadiálních hodin je příjem potravy. U denních živočichů je přítomnost světla spojená s vyšší tělesnou aktivitou a tím i s vyšším metabolickým obratem, a jejich cirkadiální systém zajistí, že je také během dne očekáván příjem potravy. Pokud však denní živočich opakovaně konzumuje potravu v době, kdy jej jeho časový systém připraví na spánek, dochází k nesouladu mezi signály o denní době a příjmu potravy a tím i k desynchronizaci cirkadiálního systému v těle. Tento stav je často doprovázen zvýšeným rizikem výskytu chorob trávicího traktu, který je kvůli svým mnoha cyklickým činnostem obzvláště citlivý na tuto desynchronizaci.

2. Molekulární mechanismus transkripčně translačních zpětnovazebných smyček

Autonomní molekulární hodiny vyskytující se v buňkách savců jsou tvořeny dvěma navzájem interagujícími transkripčně-translačními smyčkami, založenými na zpětné vazbě (v originále jako „transcriptional-translational feedback loop“ dále jako TTFL), způsobující rytmicky se opakující expresi hodinových genů.

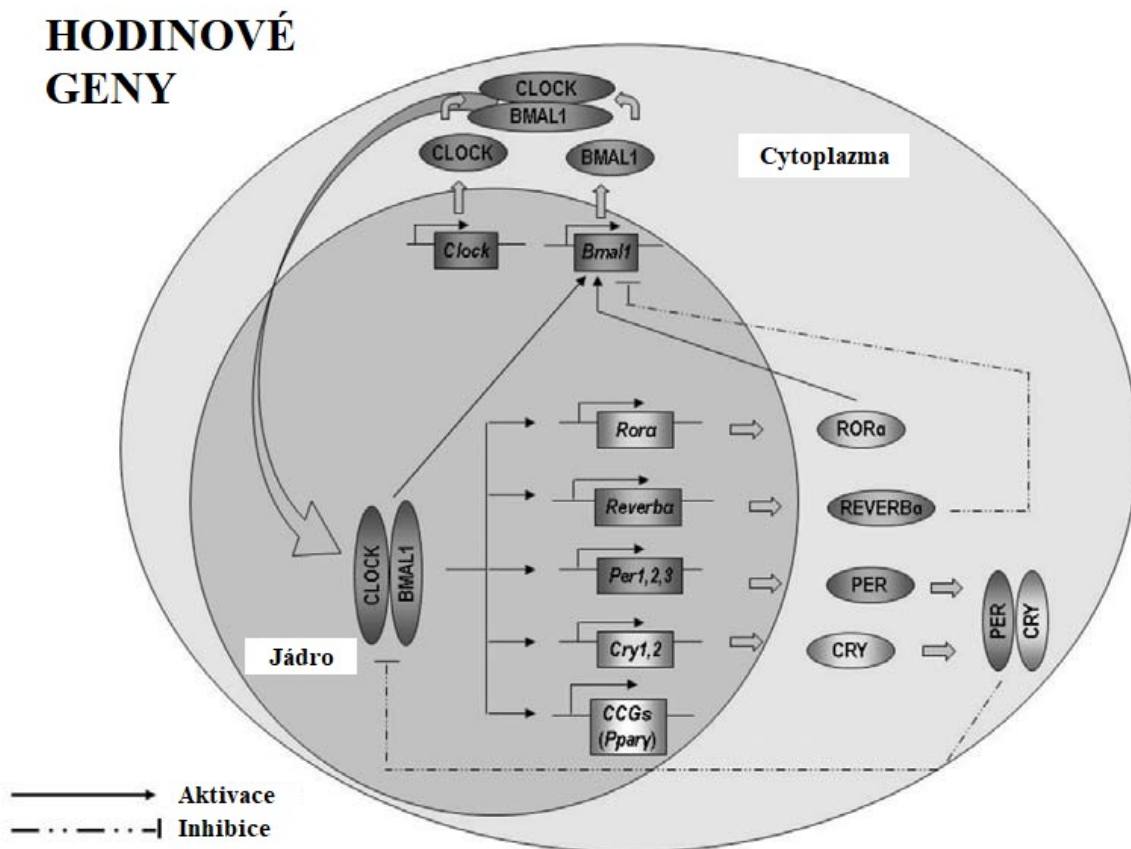
2.1 Primární smyčka

Při absenci inhibice probíhá v jádru transkripce hodinových genů *Clock* (zkratka pro „Circadian Locomotor Output Cycles Kaput“) a *Bmal1* (zkratka pro „Brain and Muscle ARNT-like 1“). V cytoplazmě vzniklé proteiny heterodimerizují na CLOCK:BMAL1 a při návratu zpět do jádra se stávají transkripčně aktivačním komplexem pro další geny (Gekakis et al., 1998). Vzniklý heterodimer CLOCK:BMAL1 se v jádru váže na E-box („enhancer box“) na promotorech hodinových genů *Per1*, *2*, *3* a *Cry1*, *2* a řady tzv. hodinami kontrolovaných genů (v angličtině jako „clock-controlled genes“) a iniciuje jejich transkripci (Hao et al., 1997; Ripperger & Schibler, 2006). Následně dochází k translaci proteinů PER (zkratka pro „PERIOD“) a CRY (zkratka pro „CRYPTOCHROME“) (Zheng et al., 2001; Horst et al., 1999). Proteiny PER a CRY mohou být v cytoplazmě posttranslačně fosforylovány kinázami CKI δ a CKI ϵ (Camacho et al., 2001; Keesler et al., 2000) GSK3 β (Kurabayashi et al., 2010) a AMPK (Lamia et al., 2009). Proteiny PER a CRY pak spolu tvoří dimer, který vstupuje do jádra, ten blokuje transkripčně aktivační komplex CLOCK:BMAL1 a zabraňuje tak tvorbě dalších proteinů PER a CRY (Ye et al., 2014). Následně jsou v cytoplazmě odbourávány zbylé PER a CRY proteiny ubiquitinovou cestou, řízenou pomocí FBXL3 komplexu (Busino et al., 2007), a protože již není indukována exprese hodinových genů, hladiny jejich proteinů se postupně během noci v buňce snižují (Siepka et al., 2007). Při absenci inhibujících PER a CRY proteinů na komplexu CLOCK:BMAL1 je opět zahájena transkripce genů *Per*, *Cry* a hodinami kontrolovaných genů a cyklus začíná znovu. Tento celý cyklus trvá přibližně 24 hodin.

2.2 Sekundární smyčka

Kromě zmíněných kináz je ještě exprese hodinových genů regulovaná činností jaderných receptorů REV-ERB α a ROR α (Harding & Lazar, 1993; Giguere et al., 1994). Exprese jejich genů indukuje navázání aktivačního komplexu CLOCK:BMAL1 na E-box. Vzniklé jaderné receptory poté kompetují o navázání na sekvenci RORE (retinoic acid-related orphan nuclear receptors) na promotoru *Bmal1* a regulují jeho transkripci. REV-ERB α potlačuje expresi *Bmal1* a tím tak prodlužuje cirkadiánní periodu, zatímco ROR α expresi podporuje a periodu zkracuje

(Guillaumond et al., 2005). Schématické znázornění molekulárních mechanismů TTFL viz. Obr. 1.



Obr. 1: Molekulární mechanismus zpětnovazebné smyčky hodinových genů. Transkripční faktory CLOCK a BMAL1 vytváří heterodimer, který se váže na promotor a indukuje transkripci hodinových genů *Per1,2,3*, *Cry1,2* a genů pro transkripční faktory REV-ERB α,β a ROR α,β . Dodatečně ještě na schématu znázorněn vznik produktů hodinami kontrolovaných genů (CCGs). Proteiny PER a CRY tvoří heterodimer inhibující aktivitu CLOCK:BMAL1. Transkripce *Bmal1* je ještě dodatečně regulována kompeticí jaderných receptorů REV-ERB α působící na transkripci inhibičně a ROR α aktivačně. Převzato a upraveno podle (Garautet & Gómez-Abellán, 2013)

2.3 Role jaderných receptorů REV-ERB α a ROR α v metabolismu lipidů

Vedle své funkce v regulaci hodinových genů, byla u jaderných receptorů REV-ERB α a ROR α pozorována účast v metabolismu a homeostáze lipidů. Hlavní funkcí receptoru REV-ERB α je inhibice transkripce *Bmal1* v TTFL a prodlužuje tak periodu oscilace (Harding &

Lazar, 1993). Zvýšené hladiny mRNA *Rev-Erba* byly zaznamenány při diferenciaci nových buněk v tukové tkáni. V případě, kdy bylo tvorbě tukové buňky zabráněno aplikací kyseliny retinové, hodnoty mRNA *Rev-Erba* nebyly navýšeny (Chawla & Lazar, 1993). U laboratorních hlodavců s potlačenou expresí *Rev-Erba* byly zaznamenány hodnoty zvýšené aktivity biosyntézy cholesterolu. Bylo odhaleno, že *Rev-Erba* se přímo váže na většinu genů účastnící se syntézy cholesterolu a potlačuje jejich expresi (Sitaula et al., 2017). Tato studie také poukazuje na možnou léčbu zvýšených hladin LDL cholesterolu pomocí regulací exprese *Rev-Erba*, tato možnost ale ještě zůstává předmětem dalších výzkumů.

Jaderný receptor $ROR\alpha$, který naopak podporuje transkripci *Bmall* a zkracuje periodu v TTFL (Giguere et al., 1994) má roli v regulaci homeostázy lipidů. U jedinců, u kterých byl tento gen umlčen, byly pozorovány nízké hladiny HDL cholesterolu, apolipoproteinu C3 a triacylglycerolu v krvi (Lau et al., 2004). Recentní studie odhalily schopnost jaderných receptorů $ROR\alpha$ a $ROR\gamma$ stimulovat expresi lipogenních genů. Tato regulace metabolismu lipidů a mastných kyselin probíhala ale pouze v případě, kdy jedinec přijímal potravu během své aktivní periody. Je ale nutno podotknout, že u zvířat na lačno tato stimulace lipidového metabolismu neproběhla (Zhang et al., 2017). Pro potenciální úspěšnou léčbu metabolických stavů spojených s manipulací ROR je tedy nezbytné pro nejvyšší efekt terapii provádět s ohledem na denní dobu a příjem potravy jedince.

3. Centrální hodiny v SCN a jejich seřizování

Cirkadiánní hodiny se nacházejí v mnoha typech buněk organismu, ve kterých jsou schopny vytvářet rytmický signál. Primární rolí těchto hodin je udržovat stálý 24 hodinový rytmus, který řídí rytmicky expresi různých genů a tím pak je pak následně rytmicky řízena např. endokrinní sekrece, metabolismus a celkové chování organismu. Centrální cirkadiánní hodiny (někdy také jako „master clock“) jsou uloženy v SCN v hypotalamu (Ralph et al., 1990). Centrální hodiny v SCN a oscilátory v periferních tkáních dávají dohromady síť udávající synchronizovaný čas pro celý organismus. Každý oscilátor v této síti je schopen odměřovat 24-hodinové cykly nezávisle na sobě, ale pro synchronizaci těchto periferních oscilátorů s denní dobou a mezi sebou navzájem je nutný signál z SCN (Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004).

Aby hodiny dodržovaly co nejpřesněji 24 hodinový cyklus, musí být seřizovány signály z okolního prostředí. Jako hlavní synchronizátor slouží centrálním hodinám v SCN světlo (Nishino et al., 1976). Informaci o přítomnosti světla na sítnici zaznamenávají vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky označované jako ipRGCs (zkratka pro „intrinsically photosensitive retinal ganglion cells“) a z nich vystupující axony předávají informaci do SCN. Tvoří tak dráhu mezi sítnicí a hypotalamem, tzv. retinohypotalamický trakt (Berson et al., 2002; Warren et al., 2003). Schopnost ipRGC buněk vnímat světlo je umožněna díky přítomnosti fotosenzitivního pigmentu melanopsinu (Provencio et al., 2000).

Přítomností světla dochází v retině k depolarizaci ipRGCs buněk a následně v SCN nastává uvolnění glutamátu z axonů retinohypotalamického traktu. Glutamát se dále váže na receptory pro N-methyl-D-asparagovou kyselinu (NMDA). Následně dochází k vtoku Ca^{2+} iontů a aktivaci vnitrobuněčných signálních drah. Jejich aktivace během noci ovlivní chod cirkadiánních hodin a optimálně je seřídí (Ding et al., 1998; Colwell, 2001; Irwin & Allen, 2007; Irwin & Allen, 2009). Důležitým faktorem je i intenzita přicházejícího světla (Albers et al., 1982).

Základní mechanismus odměřující 24-hodinový rytmus v těle je na molekulární úrovni shodný pro všechny tkáně (Balsalobre et al., 2000b; Nagoshi et al., 2004). Hlavní rozdíl mezi oscilátorem v SCN a těmi na periferiích spočívá v přítomnosti mezibuněčných spojů v SCN (Liu et al., 2007). Tyto spoje mezi neurony zaručují, že celý systém se stává odolným vůči nežádoucímu podmětům, například teplotním výkyvům (Buhr et al., 2010) nebo zvýšení hladin glukokortikoidů (Balsalobre et al., 2000a). Zatímco SCN není možné ovlivnit změnou v čase příjmu potravy, u ostatních částí hypothalamu může ovlivnění hodin nastat. Recentní studie

prokazují, že příjem potravy v neobvyklou dobu způsobuje nejen desynchronizaci cirkadiánních hodin mezi SCN a periferií, ale dochází i k desynchronizaci jednotlivých částí hypothalamu mezi sebou. V obou jádrech *perifornical area* a *arcuate nucleus* byla vyrušena rytmická oscilace hodinových genů. GABA a glutamátové signální dráhy zůstaly v hypothalamu neovlivněny (Wang et al., 2017). Desynchronizace způsobené příjmem potravy byly také pozorovány v oblasti amygdaly v centrálním a bazolaterálním jádře a hipokampu v oblasti *gyrus dentatus*, kde došlo k modifikaci rytmické exprese *Per2*. Změna v expresi byla indukována samotným stimulem příjmu potravy, při pouhých změnách hladin sacharózy či soli tato změna exprese nenastala (Waddington Lamont et al., 2007).

4. Přítomnost periferních oscilátorů v orgánech trávicí soustavy

Vznik desynchronizace v cirkadiálním systému je možný díky přítomnosti individuálních periferních oscilátorů v tkáních trávicí soustavy. Pozorovány byly například v játrech (Stokkan et al., 2001), slinivce břišní (Pulimeno et al., 2013), žaludku (Hoogerwerf et al., 2007), tlustém střevu (Sládek et al., 2007) a v oblastech dvanáctníku, jejunu a ileu v tenkém střevě (Polidarová et al., 2009). Oscilátory v těchto tkáních jsou spolu za normálních podmínek synchronizovány a reagují na příjem potravy jako na hlavní udavač času. Schopnost průchozí potravy synchronizovat expresi hodinových a hodinami kontrolovaných genů v epiteliálních buňkách trávicího traktu byla pozorována v následující studii (Polidarová et al., 2009). Exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba* a hodinami kontrovaných genů *Weel* byla zkoumána v oblastech dvanáctníku, jejunu, ilea a tlustého střeva s důrazem na detekci načasování denních profilů exprese jednotlivých genů. Mezi zkoumanými částmi traktu bylo pozorováno neustálé narůstající zpoždění exprese cirkadiálních genů ve směru průchodu potravy. Časový rozdíl exprese mezi nejvzdálenějšími zkoumanými částmi traktu (dvanáctníku a distálního konce tlustého střeva) se pohyboval v rozmezí 3 až 4 hodin. Tyto výsledky potvrzují nejen existenci individuálních periferních hodin v jednotlivých částech trávicí soustavy, ale i jejich vzájemnou synchronizaci umožňující očekávání průchodu potravy trávicím traktem.

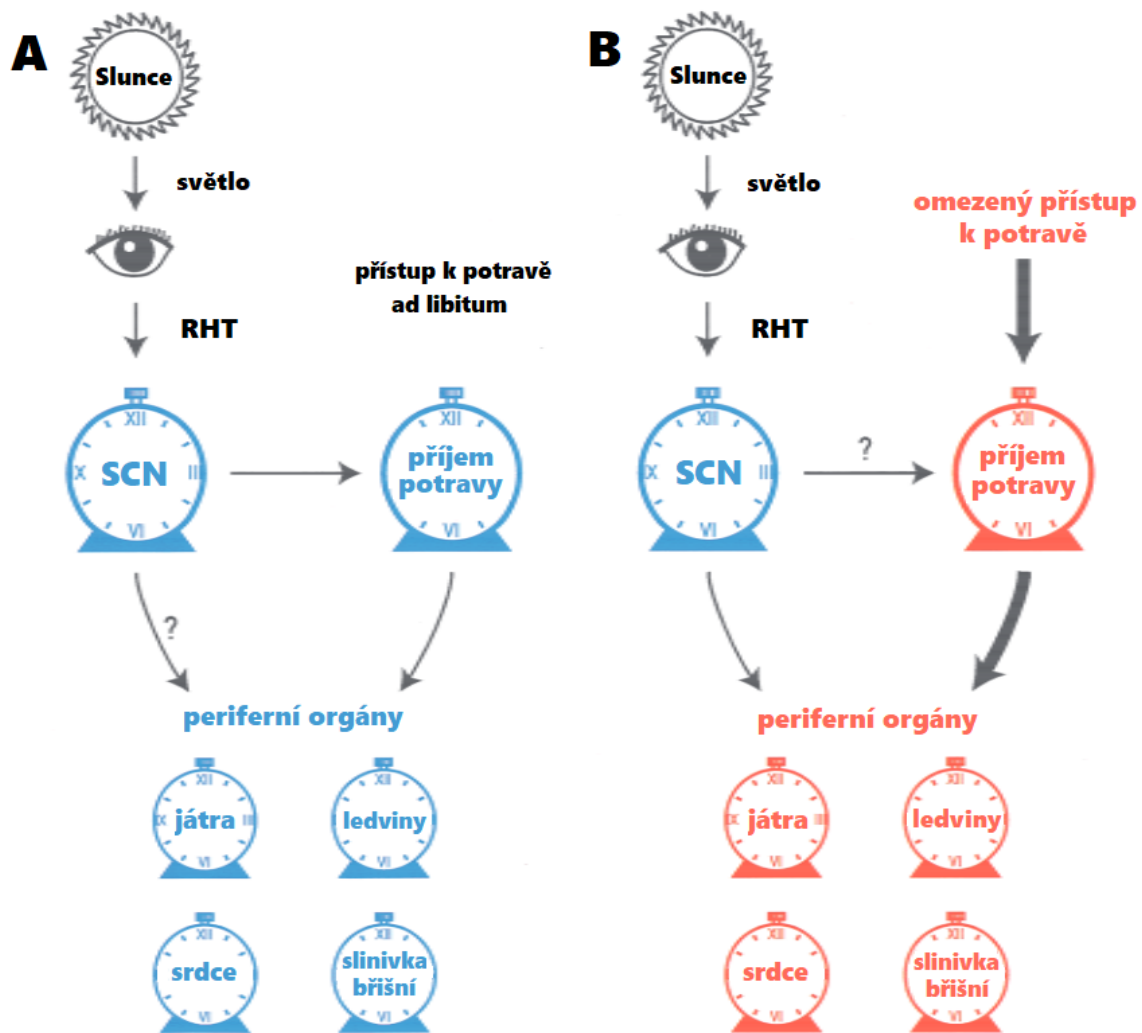
5. Desynchronizace cirkadiálního systému

5.1 Desynchronizace cirkadiálního systému změnou režimu v příjmu potravy

Doba příjmu potravy v aktivní části dne je důležitý faktor při synchronizaci cirkadiálních dějů v těle. Vedle režimu v příjmu potravy jsou pro seřízení správné činnosti trávicí soustavy nezbytné signály z SCN. Poškození SCN se projevilo, vedle jiných obtíží, modifikací režimu v příjmu potravy během dne (Nagai et al., 1978). Výsledná synchronizace mezi přichozími signály z centrálních hodin a periferními hodinami v orgánech trávicího traktu seřizuje rytmickou expresi hodinových genů a genů jimi kontrolovaných v orgánu.

Studie zaměřená na sledování dopadu narušení signálů z SCN na hodiny v játrech, dvanáctníku a tlustém střevě (Polidarová et al., 2011) prokázala různý stupeň jejich závislosti na režimu příjmu potravy a na signálech přicházejících z SCN. Díky vystavení potkanů stálému světlu byla docílena vzájemná desynchronizace buněk v SCN a hodiny tak nebyly schopny dodávat dostatečně silný synchronizovaný signál ostatním částem těla (Ohta et al., 2005). Při absenci optimální činnosti SCN a neomezeném přístupu k potravě si hodiny v játrech a tlustém střevě zachovávaly rytmickou expresi některých hodinových a hodinami kontrolovaných genů (konkrétně *Rev-erba* a *Dbp*), u většiny však rytmus vymizel. Důležité je ale podotknout, že u dvanáctníku byly i přes absenci *zeitgeberu* zachovány, až na výjimku genu *Weel*, všechny rytmické oscilace. Čím přesně je způsobena tako imunita dvanáctníku vůči desynchronizacím zůstává nejasné. Při obnově pravidelného příjmu potravy (pod stálým světlem) došlo ke kompletní obnově rytmické exprese pozorovaných genů *Per 1 a 2*, *Bmall*, *Rev-erba*, *Dbp* a *Weel* v játrech a dvanáctníku. Pro tyto orgány je tedy příjem potravy silnější *zeitgeber* než synchronizované signály z SCN. Jiné výsledky byly pozorovány v expresi v tlustém střevě, kdy při obnovení režimu v příjmu potravy byly rytmicky exprimovány pouze geny *Per1*, *Bmall* a *Rev-erba*. Periodicita zbylých pozorovaných genů, tedy *Per2*, *Weel* a *Dbp*, je tedy pravděpodobně v tlustém střevu více závislá na signálech z SCN.

Jak již bylo zmíněno výše, dlouhodobá změna režimu v příjmu potravy naopak vede k časovému posunu exprese hodinových genů a metabolických drah s nimi spojených (Damiola et al., 2000). Vzniklá desynchronizace hodin v jednotlivých periferních tkáních se po týdnu změněného jídelního rytmu snižuje na minimum (Damiola et al., 2000). Model závislosti centrálních a periferních oscilátorů na světle a příjmu potravy je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Model závislostí periferních oscilátorů na SCN a příjmu potravy. Informace o přítomnosti světla je díky retinohypotalamickému traktu (RHT) přenesena do SCN. Pokud jedinec přijímá potravu během své aktivní periody (na schématu A) centrální a periferní oscilátory jsou spolu synchronizovány (modře). SCN působí na periferie přes hormony nebo tepelné změny a zároveň působí na potravní chování jedince. Pokud má jedinec neomezený přístup k potravě, SCN udává čas příjmu potravy v období jejich aktivní periody. Oscilaci v periferních orgánech ovlivňuje i samotný příjem potravy. V případě, že je dostupnost jídla omezena pouze na období spánku jedince (na schématu B) je příjem potravy hlavním udavačem času v periferních orgánech (červeně). Dochází tak k desynchronizaci mezi periferními orgány a SCN. Převzato a upraveno z (Damiola et al., 2000).

Desynchronizace mezi centrálními a periferními hodinami se projevuje rozvojem obezity a cukrovky 2. typu (Mukherji et al., 2015a). První příznaky obezity jsou na jedinci

prokazatelné již po prvním týdnu desynchronizace příjmem potravy (Yasumoto et al., 2016). U laboratorních hlodavců byly po 1 týdnu krmení ve dne pozorovány zvýšené přírůstky na váze a ukládání většího procenta mastných kyselin, triacylglycerolu a cholesterolu v játrech. U jedinců byla také naměřena zvýšená exprese lipogenních genů *Scd1*, *Acaca*, *Fasn*. Navzdory hmotnostním přírůstkům a rozvoji hyperfagie byly u testovaných jedinců pozorovány i zvýšené hladiny leptinu v plazmě. Tento fakt poukazuje na možný rozvoj leptinové rezistence způsobené cirkadiánní desynchronizací.

Při obnovení přirozeného režimu v příjmu potravy, byla játra opět podle očekávání synchronizována s příjmem potravy. Stejná synchronizace ale neproběhla u periferních oscilátorů v kosterních svalech jedince. Na možnou desynchronizaci mezi jaterní a svalovou oscilací poukazuje další studie z téhož roku (Opperhuizen et al., 2016), kdy příjem potravy v době spánkové periody způsobil posun exprese hodinových a metabolických genů mezi těmito dvěma tkáněmi.

5.1.1 Dopad poruchy časových regulací na metabolismus

Protože organismus je velmi komplikovaný systém nejrůznějších typů buněk, látek a reakcí, je často určení vlastností jedné konkrétní struktury, genu či buňky obtížné. Pro determinaci funkcí a vlastností struktury se často využívá metoda, kdy onu studovanou strukturu „vyřadíme z provozu“. Toto vypínání struktur má na organismus téměř vždy negativní vliv. Podle absence vlastností u modifikovaného jedince a po porovnání se zdravou kontrolou můžeme často determinovat vlastnosti oné vyřazené struktury. Při zjišťování vlivu cirkadiánních rytmů na metabolismus se postupovalo podobně.

Pro objasnění důležitosti světla a denních rytmů byli laboratorní hlodavci vystavováni abnormálním světelným podmínkám. Kontrolní skupina myši (vystavena 12 hodinám světla a 12 hodinám tmy) byla porovnáována se skupinou chovanou ve stálém světle. Myši chované ve stálém světle výrazně nabyly na váze a v porovnání s kontrolami vykazovaly sníženou glukózovou toleranci (Fonken et al., 2010). Tyto nálezy indikují důležitost cirkadiánní desynchronizace v rozvoji obezity a cukrovky 2. typu. Dále bylo v těchto podmínkách u myši pozorováno zvýšené množství příjmu potravy a snížené výdaje energie. Po 4 týdnech byla u myši chovaných ve stálém světle zaznamenána redukce amplitudy výstupních signálů z SCN na 44% původní amplitudy, časová regulace příjmu potravy či výdeje energie byla narušena a citlivost inzulínu byla také výrazně snížena (Coomans et al., 2013).

Desynchronizace mezi tělními oscilátory bylo také možno dosáhnout změnou doby pravidelného příjmu potravy, která vedla k posunu exprese hodinových genů v periferních tkáních od centrálních hodin v SCN (Damiola et al., 2000). Játra spoléhají na čas příjmu potravy jako na hlavní *zeitgeber*, neboť na změnu reagují nejrychleji ze všech periferních tkání a přes 80% jaterních transkriptů je ovlivněno touto změnou doby konzumace (Vollmers et al., 2009). Desynchronizace způsobená příjmem potravy vede k posunu exprese hodinových a hodinami ovlivněných genů zodpovídající na metabolickou homeostázu. Toto rozladění mělo za následek rozvoj řady metabolických patologií, včetně obezity nebo cukrovky 2. typu (Mukherji et al., 2015a). Tyto nálezy indukují blízké propojení metabolismu s cirkadiánní oscilací hodinových genů. Bohužel mechanismu, propojujícímu systém cirkadiánních hodin a metabolismus není současné době kompletně porozuměno a zůstává předmětem studií.

Recentní studie indikují existenci komplikovanějšího mechanismu regulací. Ve výše popsaných studiích byla desynchronizace mezi centrálními hodinovými geny v SCN a na perifériích způsobena vystavením jedince narušením světelného režimu. V recentní studii byl zkoumán efekt desynchronizace vyvolané narušením funkce hodinových genů bez vystavení jedince stálému světlu. Mutací genů kódujících kinázy CKI δ a CKI ϵ selektivně v neuronech SCN bylo docíleno prodloužení periody hodin na 27,4 h a způsobena tak vnitřní desynchronizace hodinových genů mezi SCN a hodinami v periferních tkáních. Překvapivě ale u těchto jedinců nebyl pozorován rozvoj žádných metabolických obtíží. Jedinci nevykazovali známky obezity ani změny v glukózové toleranci či rytmickém výdaji energie. To, že přímá desynchronizace hodin na molekulární úrovni nezpůsobila očekávané patologické stavy, poukazuje na složitější mechanismus propojení cirkadiánních rytmů a metabolismu, který zůstává neobjasněn. (van der Vinne et al., 2018)

5.1.2 Molekulární mechanismus adaptace periferních tkání na časový posun v příjmu potravy

Při opakovaném příjmu potravy během neaktivní fáze dne došlo u laboratorních potkanů ke 12 hodinovému posunu exprese genů spojených s periferními oscilátory (Damiola et al., 2000). Molekulární mechanismus reakce periferních cirkadiánních oscilátorů na časový posun příjmu potravy byl popsán v recentní studii (Mukherji et al., 2015b). Při krmení laboratorních myší během jejich spánkové periody, byly během jejich aktivní periody pozorovány snížené hladiny insulínu. To mělo za následek zvýšení hladin volných mastných kyselin a glukagonu

v krvi. Mastné kyseliny aktivovaly receptory PPAR α (zkratka pro „peroxisome proliferator-activated receptor α “), zatímco glukagon způsobil aktivaci CREB proteinů (zkratka pro „cAMP response element-binding protein“). Aktivita těchto složek podpořila expresi *Rev-Erba* a *Per1, 2* v periferních oscilátorech i v abnormální části dne. Snížené hladiny insulinu také vedly ke zvýšené aktivitě glykogen syntázy kinázy 3 β (GSK3 β), která ještě dodatečně zvýšila hladiny *Rev-Erba*. Výsledkem byla represe exprese *Bmall*, což vedlo k prodloužení periody a odpražení od signálů přicházející z SCN.

5.1.3 Reakce SCN na příjem potravy

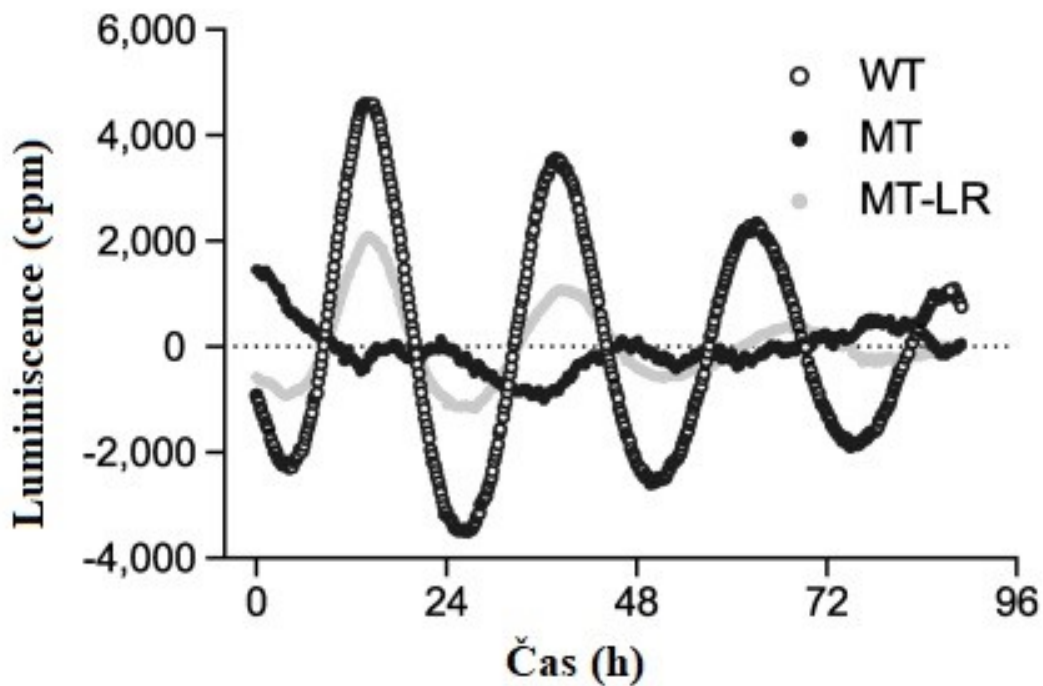
I když některé části hypothalamu na změnu v příjmu potravy reagují (Wang et al., 2017), SCN zůstává vůči změnám imunní (Waddington Lamont et al., 2007). Recentní studie prokázaly, že na rozdíl od periferních tkání, v oblasti SCN nejsou exprimovány PPAR α a glukagonové receptory, které by reagovaly na změnu způsobenou příjmem potravy (Mukherji et al., 2015a). V průběhu pokusu nebyly detekovány žádné změny v expresi hodinových genů, konkrétně *Bmall*, *Cry1*, *Per1* a *2*, *ROR α* a *Rev-Erba*. Ve výsledku SCN nemůže na změnu příjmu potravy reagovat posunem exprese hodinových genů jako se tak děje na periferiích a vzniklá desynchronizace může následně vést k rozvoji metabolických chorob (Lowden et al., 2010). Studie (Wang et al., 2017) také potvrdila přítomnost PPAR α a glukagonových receptorů v paraventriculárním jádře (PVN), zprostředkujícím přenos informací mezi SCN a tělem nebo ostatními částmi mozku (Moga et al., 1995). Exprese receptorů byla také pozorována v oblasti hipokampu (Roy et al., 2013). Tento nález poukazuje na potenciální vliv změn v čase příjmu potravy na paměť, potenciální důsledky na organismus zůstávají předmětem studií.

5.1.4 Desynchronizace jaterních hodinových genů je klíčová při rozvoji obezity

Hodiny v játrech jsou řízeny vlastním mechanismem, zajišťujícím oscilaci hodinových genů, který je citlivý na příjem potravy a částečně také na signály z SCN (Kornmann et al., 2007). Kritická role hodinových genů v metabolismu a energetické homeostázi byla potvrzena, kdy mutace v genu *Clock* vedla k rozvoji obezity a metabolických symptomů (Turek et al., 2005). U takto mutovaných laboratorních myší byl pozorován stav hyperlipidemie a hyperglykemie, steatózy jater a snížená produkce insulinu. Došlo také ke změnám v expresi genů kódujících neuropeptidy zodpovědné za regulaci v příjmech potravy a energetických

výdajů v oblasti hypotalamu. Snížená aktivita jedinců a zvýšení pocitů hladu v porovnání s kontrolou dále ještě podporují rozvoj obezity u CLOCK mutantů.

Na správnou funkci hodinových genů jater jako na nezbytnou složku správného chodu metabolismu a energetické homeostázy poukazuje následující recentní studie (Meyer-Kovac et al., 2017). Myši s mutací v *Clock* genu byly vystaveny genové terapii pro tento konkrétní gen v oblasti jater. U takto léčených myší došlo k částečné obnově jaterní cirkadiánní exprese. Obnova exprese byla detekována pomocí luciferázy, jejíž exprese byla řízena promotorem genu *Bmal1* (Nagoshi et al., 2004). Díky vpravení reportérového genu pro luciferázu bylo možno ve vzorcích jater pozorovat oscilace luciferázy v bioluminiscenci (Obr. 3).



Obr. 3: Záznam luminiscence v jaterních vzorcích po injekci *Bmal1-LUC* reportéru. Zdravé geneticky nemodifikované myši označeny jako WT (zkratka pro „wild-type“) sloužily jako kontrola pro posouzení úspěšnosti genetické terapie. Skupina myší MT (zkratka pro „mutant“) znázorněna na grafu černě s mutací v *Clock* genu nevykazovala žádné pravidelné oscilace v bioluminiscenci a tím pádem ani pro ostatní geny závislé na *Bmal1*. Skupina MT-LR (zkratka pro „mutant - liver restored“) byla podrobena genové terapii *Clock* genu. Léčené myši vykazují částečné obnovení genetické oscilace, lišící se od WT kontroly v prodloužení periody o přibližně 2 hodiny a snížení amplitudy o 2000 cpm. Převzato a upraveno z (Meyer-Kovac et al., 2017).

Myši vystavené genové terapii vykazovaly nižší příbytky na váze a byl u nich pozorován vyšší energetické výdej, než u původních neléčených mutantních jedinců. Dále bylo u léčených hlodavců detekováno snížené jaterní ukládání lipidů, zvýšení glukózové tolerance, snížené hormonální hladiny leptinu během noci a zvýšení ghrelinových hladin během dne v porovnání s CLOCK mutantem. Fakt, že obnova oscilace hodinových genů v oblasti jater vedla ke značnému zmírnění příznaků obezity, indikuje na kritickou roli jaterních hodinových genů v lipidovém metabolismu a případné léčbě souvisejících poruch.

5.2 Vliv desynchronizace cirkadiálního systému na buněčný cyklus a výskyt rakoviny

5.2.1 Cirkadiální regulace buněčného cyklu

Vedle početných metabolických obtíží bylo u jedinců s desynchronizací cirkadiálního systému pozorováno zvýšené riziko výskytu nádorových onemocnění (Hansen, 2001). Cirkadiální desynchronizace způsobená příjmem potravy, způsobila urychlený růst nádorů (Filipski et al., 2005). Při zavedení pravidelného příjmu potravy byl naopak rozvoj nádorové tkáně značně pozastaven (Li et al., 2010). Tyto nálezy poukazují na významnou roli synchronizovaných cirkadiálních hodin v inhibici karcinogeneze.

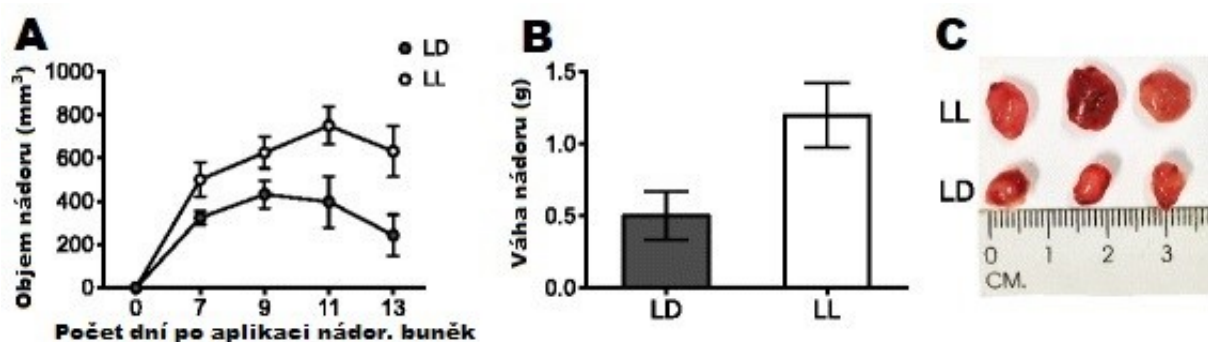
Tyto inhibiční účinky v nádorových tkáních jsou do značné míry způsobeny rolí hodinových a hodinami ovládaných genů zapojených do regulace přechodů jednotlivých fází buněčného cyklu. Přejít buňky z G1 do S fáze je regulován přítomností inhibitorů *p20* a *p21*, které jsou pod kontrolou hodinových genů (Gréchez-Cassiau et al., 2008; Laranjeiro et al., 2013). Dále se na přechodu G1/S fáze účastní přímo PER proteiny, které spolu s RNA vázajícím proteinem NONO tvoří komplex aktivující geny pro přechod z G1 do S fáze (Kowalska et al., 2013). Přejít mezi G2/M fází je kontrolován činností Wee1 kinázy kódované genem, jehož exprese je závislá na navázání CLOCK:BMAL1 komplexu na E-box v promotoru tohoto genu. Wee1 v buněčném cyklu reguluje komplex cyklin B1/CDC2 zodpovědný za přechod buňky do mitózy (Matsuo et al., 2003). Buněčný cyklus je regulován celou řadou dalších elementů vykazujících cirkadiální oscilace, jejichž exprese podmíněna činností hodinových genů. Přehled regulací buněčného cyklu hodinovými geny je shrnut v přehledné práci (Soták et al., 2014).

V nádorových tkáních bylo pozorováno potlačení rytmické cirkadiální exprese hodinových a tím i tedy hodinami kontrolovaných genů (Miyazaki et al., 2010; Soták et al.,

2013; Relógio et al., 2014). Při absenci prvků regulujících jednotlivé přechody mezi fázemi, je výsledný buněčný cyklus značně uspišen. Recentní studie indikují, že buněčný cyklus a hodinové geny se ovlivňují vzájemně, opodstatnění tohoto mechanismu však ještě zůstává předmětem výzkumů (Bieler et al., 2014).

5.2.2 Vliv cirkadiánní desynchronizace na rychlost růstu nádorové tkáně

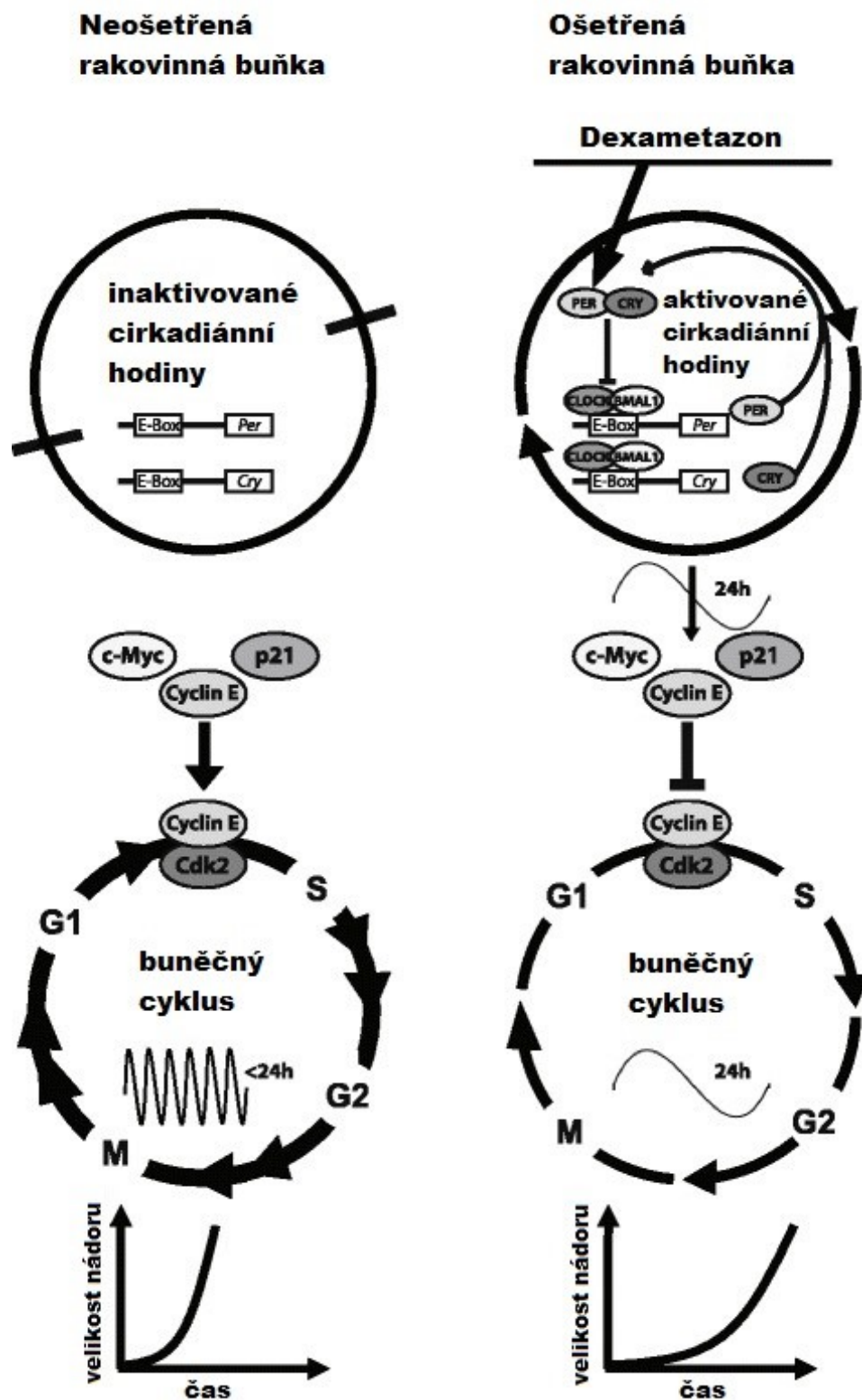
Disturbance cirkadiánního systému má podporující vliv na vznik a růst nádorové tkáně. V posledních letech bylo provedeno množství studií podrobně se zabývajících touto problematikou. Ve studii z roku 2017 (Guerrero-Vargas et al., 2017) byly pozorovány stimulační účinky desynchronizovaného cirkadiánního systému na růst nádorů. Pozorování byla prováděna na laboratorních potkanech, u kterých bylo desynchronizace cirkadiánního systému docíleno vystavením hlodavců stálému světlu po 5 týdnů (skupina LL) a na potkanech u kterých byl režim světla a tmy přirozeně střídán (skupina LD). Oběma těmito skupinám byla infekčně dopravena pod kůži dávka nádorových buněk. Stále světlo podporovalo nádorový růst. U skupiny vystavené stálému světlu byl již po 11 dnech po aplikaci nádorových buněk pozorován téměř dvojnásobný objem nádorové tkáně než u skupiny chované na standardním světelném režimu. Nádory u skupiny vystavené stálému světlu byly také o poznání těžší než nádory u kontrol. Pro ukázkou je porovnání objemu a hmotnosti vzniklých nádorů u obou skupin znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Parametry indukovaných nádorů u skupiny potkanů chovaných na stálém světle (LL) a skupiny na standardním světelném režimu (LD). Na schématu A je znázorněn růst objemu nádorů u skupiny potkanů pod stálým světlem (na grafu světle) a kontroly s v normálních světelných podmínkách (na grafu tmavě). Schéma B znázorňuje hmotnost nádorů u těchto skupin během 13. dne pokusu. Na obrázku C jsou vizuálně porovnány vyoperované nádory z LL a LD skupin zvířat. Převzato a upraveno z (Guerrero-Vargas et al., 2017).

U zvířat chovaných na stálém světle byla kromě zvýšené prozánětlivé reakce na LPS a zvýšené přítomnosti makrofágů v nádorové tkáni, pozorována i zvýšená anabolická aktivita. Zvýšenou expresi vykazovaly lipogenní geny *Acaca*, *Fasn*, *Ppar γ* , gen *Glut-1* pro transport glukózy a geny podporující růst nádorové tkáně *Vegfa*, *Myc* a *Ir*. I přes tyto metabolické změny vykazovali potkani s nádorovou tkání chování na stálém světle celkově nižší hmotnosti než kontroly, indikující vysokou energetickou náročnost tvorby nádorové tkáně. Vzniklé metabolické změny způsobené vystavením stálému světlu tak vytvářely příznivé podmínky pro růst nádoru.

Naopak podpora cirkadiánní exprese měla na růst nádorů inhibiční účinek. V recentní studii (Kiessling et al., 2017) bylo na buňkách melanomu B16 pozorováno výrazné zpomalení rakovinového bujení při posílení exprese hodinových genů. Pro stimulaci hodinových genů byl aplikován dexametazon (DEX), kortikosteroid schopný indukcí *Per* genů resetovat v buňkách rytmickou expresi hodinových genů (Balsalobre et al., 2000a). Při pozorováních in vitro byla po aplikaci DEX prodloužena doba potřebná k zdvojnásobení populace rakovinových buněk z 16,5 h na 22,7 h po aplikaci první dávky DEX a po druhé dávce byla doba ještě prodloužena na 23 h. Při pozorování molekulárních změn byla v jednotlivých nádorových buňkách ošetřených DEX s pomocí *Bmal1-Luc* reportéru detekována obnovená cirkadiánní exprese *Bmal1*, která byla v neošetřených buňkách vysoce arytmiická. Obnovení exprese hodinových genů mělo za následek podporu rytmicity c-Myc (Fu et al., 2002), cyklinu E (Pérez-Roger et al., 1997) a p21 (Gréchez-Cassiau et al., 2008), kteří mají kritickou roli v regulaci buněčného cyklu. Ve finále byla celková rychlost růstu nádoru ošetřených DEX zpomalena o přibližně 60% po 8 dnech testování. Vystavení DEX nádorové tkáni s vyřazeným genem *Bmal1* nemělo žádný efekt na růst tumoru. Podrobnější popis manipulace hodinových genů a buněčného cyklu v této studii je znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5: Model potlačujícího účinku obnovené cirkadiánní oscilace na rychlost růstu nádoru. Na levé části schématu jsou znázorněny procesy probíhající v nádorové buňce neošetřené dexametazonem. Rakovinné buňky vykazují významné narušení rytmické exprese hodinových genů, které nebyly schopny rytmicky stimulovat zkoumané regulační faktory buněčného cyklu tj. cyklin E, c-Myc a p21. Cyklin E dále interaguje s Cdk2 a tvoří komplex regulující přechod

buněčného cyklu z G1 do S fáze, který při destabilizaci cirkadiánní exprese není schopen patřičné regulace cyklu. Výsledkem je značně urychlený buněčný cyklus, který způsobuje zvýšenou rychlost růstu nádoru. Na pravé části schématu je znázorněn efekt dexametazonu na buněčný cyklus v nádorové buňce. Aplikací DEX byla znovuobnovena cirkadiánní exprese hodinových genů a tím i rytmické hladiny regulátorů buněčného cyklu, což vedlo ke zpomalení rychlosti buněčného cyklu který se tak více blíží rytmu ve zdravých buňkách. Zpomalení buněčného cyklu mělo za následek zpomalení celkové rychlosti růstu pozorovaného nádoru. Převzato a upraveno z (Kiessling et al., 2017).

Manipulace s hodinovými a hodinami ovládanými geny se zdá být klíčová při zpomalení tumorogeneze a mohla by při léčbě rakoviny poskytnout dodatečný čas pro léčbu nádoru, který by mohl být rozhodující a přežití pacienta. Nepostradatelná role hodinových genů v buněčném cyklu také vysvětluje zvýšené procento výskytu rakoviny při desynchronizaci cirkadiánního systému (Hansen, 2001).

6. Závěr

V orgánech trávicí soustavy bylo pozorováno množství individuálních periferních oscilátorů, které spolu byly vzájemně synchronizovány příjmem potravy (Polidarová et al., 2009). Výsledky řady studií prokázaly, že změna režimu v příjmu potravy ovlivňuje cirkadiánní expresi hodinových genů (Damiola et al., 2000). Jako jeden z mechanismů byly označeny dráhy zprostředkované pomocí receptorů PPAR α a zahrnující působení CREB proteinů, které podporují expresi *Rev-Erba* a *Per1, 2* a tím ovlivňují cirkadiánní hodiny v periferních oscilátorech tak, že je seřizují s dobou příjmu potravy (Mukherji et al., 2015b). Neschopnost centrálních hodin v SCN přizpůsobovat se změně režimu v příjmu potravy byla přičtena absenci zmíněných PPAR α receptorů (Mukherji et al., 2015a). Při změně v čase příjmu potravy se tedy SCN není schopná synchronizovat s periferními oscilátory v orgánech a je u jedinců pozorováno množství obtíží a patologických stavů spojených s desynchronizací cirkadiánních rytmů (Lowden et al., 2010).

Mezi patologie vzniklé touto desynchronizací patří řada metabolických poruch v čele s obezitou. Z výsledků studií popsanych v této práci lze shrnout, že u jedinců se způsobenou cirkadiánní desynchronizací byly pozorovány nadměrné příbytky na váze spojené se sníženou fyzickou aktivitou a zvýšením pocitu hladu. U jedinců také docházelo k ukládání většího procenta mastných kyselin, triacylglycerolu a cholesterolu v játrech a byla pozorována zvýšená exprese lipogenních genů *Scd1*, *Acaca*, *Fasn* (Yasumoto et al., 2016). Studie také odhalily významnou činnost transkripčního represoru v TTFL, REV-ERB α , který se váže na promotory řady genů zodpovědných za syntézu cholesterolu a potlačuje jejich expresi (Sitaula et al., 2017). Podobné vlastnosti byly detekovány i u ROR α a ROR γ , které byly schopny naopak stimulovat expresi lipogenních genů (Zhang et al., 2017). Navzdory hmotnostním přírůstkům a rozvoji hyperfagie byly u testovaných jedinců s desynchronizovaným cirkadiánním systémem pozorovány i zvýšené hladiny leptinu v plazmě (Yasumoto et al., 2016). Tento fakt poukazuje na možný rozvoj leptinové rezistence způsobené cirkadiánní desynchronizací a podporuje vznik obézních stavů jedinců. Obnovení pravidelného příjmu potravy mělo za následek obnovu metabolické homeostázy.

U jaterních hodinových genů byla pozorována významná role v energetickém metabolismu. U mutanta v *Clock* genu, u kterého byla detekována obezita a ostatní výše zmíněné symptomy spojené s desynchronizací, byla obnovena cirkadiánní exprese hodinových genů genovou terapií pro *Clock* gen v oblasti jater. Výsledkem bylo částečné obnovení metabolické homeostázy, jmenovitě snížené jaterní ukládání lipidů, zvýšení glukózové

tolerance, snížené hormonální hladiny leptinu během noci a zvýšení ghrelinových hladin během dne v porovnání s CLOCK mutantem (Meyer-Kovac et al., 2017). Značné zmírnění příznaků obezity v jedinci s obnovenou jaterní expresí hodinových genů, indikuje na kritickou roli těchto genů v lipidovém metabolismu. Tato informace také poukazuje na možnost využití jaterních hodinových genů při léčbě obezity a souvisejících poruch.

Práce sledující vztah mezi narušeným cirkadiánním systémem a rozvojem nádorových onemocnění prokázaly, že u jedinců s desynchronizovaným cirkadiánním systémem byla pozorována zvýšené procento výskytu nádorových onemocnění (Hansen, 2001) a vyšší rychlost růstu nádorů (Filipski et al., 2005; Guerrero-Vargas et al., 2017). Tento efekt je způsoben regulační činností hodinových a hodinami kontrolovaných genů v buněčném cyklu (Soták et al., 2014). Při nedostatečné expresi hodinových genů způsobené desynchronizací v systému, nedochází z efektivní inhibici přechodů mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, buňky se dělí rychleji a může dojít k rakovinovému bujení. Rychlý růst nádorové tkáně je způsoben potlačením exprese hodinových genů a jejich absence inhibice přechodů mezi fázemi buněčného cyklu. Při obnově cirkadiální exprese v nádorové tkáni došlo ke značnému zpomalení růstu nádoru o přibližně 60% (Kiessling et al., 2017). Obnova cirkadiální exprese v nádorové tkáni a zpomalení jejího růstu by ale mohla být v mnoha případech klíčová. Dodatečně získaný čas způsobený manipulací hodinových genů by mohl v mnoha případech hrát kritickou roli v úspěšnosti dodatečné léčby nádorových onemocnění a přežití pacienta. Pro další léčbu pomocí manipulace s hodinovými geny se také nabízí možnost využití REV-ERB α pro léčbu zvýšených hladin LDL cholesterolu (Sitaula et al., 2017). Tato manipulace by však mohla mít škodlivé vedlejší účinky v podobě destabilizace TTFL kvůli inhibiční činnosti REV-ERB α v regulaci transkripce *Bmal1*. Při léčbě obezity a podobných onemocnění by teoreticky bylo méně rizikovější obnovení pravidelného příjmu potravy během aktivní periody dne a synchronizovat tak cirkadiánní rytmy pacientů pomocí *zeitgeberů*.

Přestože řada studií shrnutých v této práci poukazuje na dopady cirkadiánní desynchronizace na zdraví jedince, stále ještě není zcela objasněno, do jaké míry jsou patologické stavy způsobeny samotnou desynchronizací hodinových genů. V recentní studii (van der Vinne et al., 2018) bylo dosaženo desynchronizace mezi SCN a periferními oscilátory mutací v genech pro kinázy CKI δ a CKI ϵ v SCN, což mělo za následek prodloužení jejich periody na 27,4 hodin, přičemž perioda periferních hodin ovlivněna nebyla. Žádné z očekávaných patologických stavů typické pro desynchronizaci cirkadiánního systému však na mutovaných jedincích nebyly pozorovány. Tento nálezní indikuje existenci složitějšího

systemu regulací, který není v současné době zcela objasněn. Přímá manipulace s hodinovými geny jako léčba metabolických syndromů není nejvhodnější řešení, kvůli nedostatečným informacím o celkovém efektu hodinových genů na metabolismus.

7. Seznam použité literatury

- Albers, H. E., Lydic, R., & Moore-Ede, M. C. (1982). Entrainment and masking of circadian drinking rhythms in primates: Influence of light intensity. *Physiology & Behavior*, 28(2), 205–211.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., ... Schibler, U. (2000a). Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, 289(5488), 2344 LP-2347.
- Balsalobre, A., Marcacci, L., & Schibler, U. (2000b). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, 10(20), 1291–1294.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070 LP-1073.
- Bieler, J., Cannavo, R., Gustafson, K., Gobet, C., Gatfield, D., & Naef, F. (2014). Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. *Molecular Systems Biology*, 10(7), 739.
- Buhr, E. D., Yoo, S. H., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6002), 379–385.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., ... Pagano, M. (2007). SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, 316(5826), 900 LP-904.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D. M., Patel, K., Khorkova, O., ... Keesler, G. A. (2001). Human casein kinase I δ phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Letters*, 489(2–3), 159–165.
- Colwell, C. S. (2001). NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. *The European Journal of Neuroscience*, 13(7), 1420–1428.
- Coomans, C. P., van den Berg, S. A. A., Houben, T., van Klinken, J.-B., van den Berg, R., Pronk, A. C. M., ... Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *The FASEB Journal*, 27(4), 1721–1732.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14(23), 2950–2961.
- Ding, J. M., Buchanan, G. F., Tischkau, S. A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L. E., ... Gillette, M. U. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, 394, 381.

- Filipski, E., Innominato, P. F., Wu, M., Li, X.-M., Iacobelli, S., Xian, L.-J., & Lévi, F. (2005). Effects of Light and Food Schedules on Liver and Tumor Molecular Clocks in Mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *97*(7), 507–517.
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18664 LP-18669.
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., & Chi Lee, C. (2002). *The Circadian Gene Period2 Plays an Important Role in Tumor Suppression and DNA Damage Response In Vivo*. *Cell* (Vol. 111).
- Garaulet, M., & Gómez-Abellán, P. (2013). Chronobiology and obesity. *Nutr Hosp*, *28 Suppl 5*, 114–120.
- 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), 1564 LP-1569.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., & Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes and Development*, *8*(5), 538–553.
- Gréchez-Cassiau, A., Rayet, B., Guillaumond, F., Teboul, M., & Delaunay, F. (2008). *The Circadian Clock Component BMAL1 Is a Critical Regulator of p21WAF1/CIP1 Expression and Hepatocyte Proliferation*. *The Journal of biological chemistry* (Vol. 283).
- Guerrero-Vargas, N. N., Navarro-Espíndola, R., Guzmán-Ruíz, M. A., Basualdo, M. del C., Espitia-Bautista, E., López-Bago, A., ... Escobar, C. (2017). Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer*, *17*, 625.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, *20*(5), 391–403.
- Hansen, J. (2001). Increased Breast Cancer Risk among Women Who Work Predominantly at Night. *Epidemiology*, *12*(1), 74–77.
- Hao, H., Allen, D. L., & Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(7), 3687–3693.
- Harding, H. P., & Lazar, M. A. (1993). The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(5), 3113–21.

- Hoogerwerf, W. A., Hellmich, H. L., Cornélissen, G., Halberg, F., B Shahinian, V., Bostwick, J., ... Cassone, V. (2007). *Clock Gene Expression in the Murine Gastrointestinal Tract: Endogenous Rhythmicity and Effects of a Feeding Regimen*. *Gastroenterology* (Vol. 133).
- Horst, G. T. J. van der, Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., ... Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627.
- Chawla, A., & Lazar, M. A. (1993). Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(22), 16265–9.
- Irwin, R. P., & Allen, C. N. (2007). Calcium Response to Retinohypothalamic Tract Synaptic Transmission in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(43), 11748 LP-11757.
- Irwin, R. P., & Allen, C. N. (2009). GABAergic signaling induces divergent neuronal Ca(2+) responses in the suprachiasmatic nucleus network. *The European Journal of Neuroscience*, 30(8), 1462–1475.
- Keesler, G. A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C., & Yao, Z. (2000). *Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase Iε*. *Neuroreport* (Vol. 11).
- Kiessling, S., Beaulieu-Laroche, L., Blum, I. D., Landgraf, D., Welsh, D. K., Storch, K.-F., ... Cermakian, N. (2017). Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biology*, 15, 13.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J. S., & Schibler, U. (2007). System-Driven and Oscillator-Dependent Circadian Transcription in Mice with a Conditionally Active Liver Clock. *PLoS Biology*, 5(2), e34.
- Kowalska, E., Ripperger, J. A., Hoegger, D. C., Bruegger, P., Buch, T., Birchler, T., ... Brown, S. A. (2013). NONO couples the circadian clock to the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), 1592–1599.
- Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., & Fukada, Y. (2010). DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3 β , a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Molecular and Cellular Biology*, 30(7), 1757–1768.
- Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., ... Evans, R. M. (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5951), 437–440.

- Laranjeiro, R., Tamai, T. K., Peyric, E., Krusche, P., Ott, S., & Whitmore, D. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor p20 controls circadian cell-cycle timing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(17), 6835–6840.
- Lau, P., Nixon, S. J., Parton, R. G., & Muscat, G. E. O. (2004). RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: Caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36828–36840.
- Li, X.-M., Delaunay, F., Dulong, S., Claustrat, B., Zampera, S., Fujii, Y., ... Lévi, F. (2010). Cancer Inhibition through Circadian Reprogramming of Tumor Transcriptome with Meal Timing. *Cancer Research*, *70*(8), 3351 LP-3360.
- Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., ... Kay, S. A. (2007). Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network. *Cell*, *129*(3), 605–616.
- Lowden, A., Moreno, C., Holmbäck, U., Lennernäs, M., & Tucker, P. (2010). Eating and shift work – effects on habits, metabolism and performance. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, (2), 150–162.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control Mechanism of the Circadian Clock for Timing of Cell Division in Vivo. *Science*, *302*(5643), 255 LP-259.
- Meyer-Kovac, J., Kolbe, I., Ehrhardt, L., Leliavski, A., Husse, J., Salinas, G., ... Oster, H. (2017). Hepatic gene therapy rescues high-fat diet responses in circadian Clock mutant mice. *Molecular Metabolism*, *6*(6), 512–523.
- Miyazaki, K., Wakabayashi, M., Hara, Y., & Ishida, N. (2010). Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes to Cells*, *15*(4), 351–358.
- Moga, M. M., Weis, R. P., & Moore, R. Y. (1995). Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* (Vol. 359).
- Mukherji, A., Kobiita, A., Damara, M., Misra, N., Meziane, H., Champy, M.-F., & Chambon, P. (2015a). Shifting eating to the circadian rest phase misaligns the peripheral clocks with the master SCN clock and leads to a metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(48), E6691–E6698.
- Mukherji, A., Kobiita, A., & Chambon, P. (2015b). Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations, which, on their own, shift the peripheral circadian clocks by 12 hours. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(48), E6683–E6690.

- Nagai, K., Nishio, T., Nakagawa, H., Nakamura, S., & Fukuda, Y. (1978). Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Research*, *142*(2), 384–389.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., & Schibler, U. (2004). Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells. *Cell*, *119*(5), 693–705.
- Nishino, H., Koizumi, K., & Brooks, C. M. (1976). The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Research*, *112*(1), 45–59.
- Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, *8*, 267.
- Opperhuizen, A.-L., Wang, D.-W., Foppen, E., Jansen, R., Boudzovitch-Surovtseva, O., de Vries, J., ... Kalsbeek, A. (2016). *Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats. European Journal of Neuroscience* (Vol. 44).
- Pérez-Roger, I., Solomon, D. L., Sewing, A., & Land, H. (1997). *Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27Kip1 binding to newly formed complexes. Oncogene* (Vol. 14).
- Polidarová, L., Sládek, M., Soták, M., Pácha, J., & Sumová, A. (2011). Hepatic, Duodenal, and Colonic Circadian Clocks Differ in their Persistence under Conditions of Constant Light and in their Entrainment by Restricted Feeding. *Chronobiology International*, *28*(3), 204–215.
- Polidarová, L., Soták, M., Sládek, M., Pácha, J., & Sumová, A. (2009). Temporal gradient in the clock gene and cell-cycle checkpoint kinase weel expression along the gut. *Chronobiology International*, *26*(4), 607–620.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*, *20*(2), 600 LP-605.
- Pulimeno, P., Mannic, T., Sage, D., Giovannoni, L., Salmon, P., Lemeille, S., ... Dibner, C. (2013). Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells. *Diabetologia*, *56*(3), 497–507.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, *247*(4945), 975 LP-978.
- Relógio, A., Thomas, P., Medina-Pérez, P., Reischl, S., Bervoets, S., Gloc, E., ... Sers, C. (2014). Ras-Mediated Deregulation of the Circadian Clock in Cancer. *PLoS Genetics*, *10*(5), e1004338.

- Ripperger, J. A., & Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nature Genetics*, 38, 369.
- Roy, A., Jana, M., Corbett, G. T., Ramaswamy, S., Kordower, J. H., Gonzalez, F. J., & Pahan, K. (2013). Regulation of CREB and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Cell Reports*, 4(4), 724–737.
- Siepkka, S. M., Yoo, S.-H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., ... Takahashi, J. (2007). *Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression*. *Cell* (Vol. 129).
- Sitaula, S., Zhang, J., Ruiz, F., & Burris, T. P. (2017). Rev-erb regulation of cholesterologenesis. *Biochemical Pharmacology*, 131, 68–77.
- Sládek, M., Rybová, M., Jindráková, Z., Zemanová, Z., Polidarová, L., Mrnka, L., ... Sumová, A. (2007). Insight Into the Circadian Clock Within Rat Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology*, 133(4), 1240–1249.
- Soták, M., Polidarová, L., Ergang, P., Sumová, A., & Pácha, J. (2013). An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1032–1041.
- * Soták, M., Sumová, A., & Pácha, J. (2014). Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Annals of Medicine*, 46(4), 221–232.
- Stokkan, K.-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*, 291(5503), 490 LP-493.
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., ... Bass, J. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5724), 1043–1045.
- van der Vinne, V., Swoap, S. J., Vajtay, T. J., & Weaver, D. R. (2018). Desynchrony between brain and peripheral clocks caused by CK1 δ/ϵ disruption in GABA neurons does not lead to adverse metabolic outcomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), E2437 LP-E2446.
- Vollmers, C., Gill, S., DiTacchio, L., Pulivarthy, S. R., Le, H. D., & Panda, S. (2009). Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21453–21458.
- Waddington Lamont, E., Harbour, V. L., Barry-Shaw, J., Renteria Diaz, L., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2007). Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes

- the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience*, 144(2), 402–411.
- Wang, D., Opperhuizen, A.-L., Reznick, J., Turner, N., Su, Y., Cooney, G. J., & Kalsbeek, A. (2017). Effects of feeding time on daily rhythms of neuropeptide and clock gene expression in the rat hypothalamus. *Brain Research*, 1671, 93–101.
- Warren, E. J., Allen, C. N., Brown, R. L., & Robinson, D. W. (2003). Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *The European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1727–1735.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., ... Tei, H. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288(5466), 682 LP-685.
- Yasumoto, Y., Hashimoto, C., Nakao, R., Yamazaki, H., Hiroyama, H., Nemoto, T., ... Oishi, K. (2016). *Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. Metabolism* (Vol. 65).
- Ye, R., Selby, C. P., Chiou, Y.-Y., Ozkan-Dagliyan, I., Gaddameedhi, S., & Sancar, A. (2014). Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes & Development*, 28(18), 1989–1998.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., ... Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339 LP-5346.
- Zhang, Y., Papazyan, R., Damle, M., Fang, B., Jager, J., Feng, D., ... Lazar, M. A. (2017). The hepatic circadian clock fine-tunes the lipogenic response to feeding through ROR α/γ . *Genes & Development*, 31(12), 1202–1211.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., ... Lee, C. C. (2001). Nonredundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, 105(5), 683–694.

* souhrnná práce