

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

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů - Neurobiologie



**Josef Boubín**

*Cirkadiánní systém a jeho změny u myši s mutací Lurcher*  
*Circadian system and it's changes in Lurcher mutant mice*

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2018

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za nekonečnou trpělivost a ochotu, se kterou provázela vznik této práce. Dále bych chtěl poděkovat všem členkám laboratoře fyziologických adaptací a biorytmů Přf UK, které se podílely na experimentech souvisejících s touto prací.

Za dlouhodobou podporu v mé práci děkuji G. Hauptmanové a své rodině.

## **Prohlášení**

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

V Praze,

Podpis

## **Abstrakt**

Tématem této diplomové práce jsou změny v cirkadiánních rytmech způsobené poruchou cerebella. Jako animální model byly vybrány myši s mutací Lurcher, které mají specificky degenerovanou vrstvu Purkyňových buněk. Z našich výsledků vyplývá, že mutace glutamátového receptoru *GluR $\delta$ 2*, která podmiňuje postupnou degeneraci Purkyňových buněk, vede k poškození cirkadiánního systému. Myši s touto mutací mají sníženou schopnost synchronizace s vnějšími světelnými podmínkami, vykazují zvýšenou variabilitu v délce endogenní periody a nejsou schopny generovat anticipační chování v režimu časově omezeného přístupu k potravě. Na rozdíl od kontrolních myší, u postižených myší jsme nedetekovali významný rytmus v hladině proteinu hodinového genu *Bmal1* v suprachiasmatických jádrech, paraventriculárních jádrech ani v habenule. Hladiny fosforylovaných kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  měly také narušený rytmus v suprachiasmatických jádrech. Vzhledem k částečně zachovaným cirkadiánním oscilacím v lokomoční aktivitě patrně nedochází k narušení cirkadiánního systému na molekulární úrovni. Cerebelární mutace spíše narušuje vzájemnou synchronizaci neuronů suprachiasmatických jader a může také ovlivňovat procesy ve ventromediálním hypotalamu regulujícím příjem potravy.

Naše poznatky jsou první, které naznačují funkční interakci cerebella a cirkadiánního pacemakeru v suprachiasmatických jádrech, a pravděpodobně také v habenule.

## **Klíčová slova**

cerebellum, cirkadiánní systém, hodinové geny, Lurcher mutace

## **Abstract**

The main topic of this thesis are changes in Circadian rhythms caused by cerebellar disorders. Mice with Lurcher mutation, which have specifically degenerated Purkinje cells layer, were chosen as animal model. Our results show that mutation of the glutamate receptor *GluR $\delta$ 2*, which causes gradual degeneration of Purkinje cells, leads to damage of Circadian system. Mice with this mutation have reduced capability to adapt to external conditions in different light modes. They are also showing increased variability in endogenous cycle. The mice are also unable to show anticipatory behavior in time-restricted feeding. Compared to control group, affected mice do not show significant rhythm in levels of protein of *Bmal1* gene in suprachiasmatic nuclei, paraventricular nuclei nor in habenula. Phosphorylated kinases ERK1/2 and GSK3 $\beta$  also had distorted rhythms in suprachiasmatic nuclei. Because Circadian oscillations in locomotor activity are partly preserved, Circadian system is likely not damaged on molecular level. Cerebellar mutation hampers synchronization between suprachiasmatic nuclei of neurons and can also affect processes in the ventromedial hypothalamus regulating food intake.

Our findings are the first to suggest functional interactions between cerebellum and Circadian pacemaker in suprachiasmatic nuclei and likely also in habenula.

## **Key words**

cerebellum, circadian system, clock genes, Lurcher mutation

## Obsah

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	1
2.	ÚVOD .....	2
3.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Charakteristika mutace Lurcher .....	3
3.2	Glutamátový receptor $\delta 2$ .....	3
3.3	Behaviorální vlastnosti Lurcher mutantů .....	5
3.4	Morfologické rozdíly v cerebellu zdravých myší a mutantů Lurcher .....	5
4.	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM SAVCŮ .....	9
4.1	Suprachiasmatická jádra .....	9
4.2	Molekulární mechanismus regulující funkci cirkadiánních hodin .....	10
4.3	Světelná synchronizace .....	13
4.4	Cirkadiánní systém a cerebellum .....	15
5.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	17
6.	MATERIÁL A METODY .....	17
6.1	Pokusná zvířata .....	17
6.2	Časový profil pokusu .....	17
6.3	Měření lokomoční aktivity .....	18
6.4	Světelné režimy .....	18
6.5	Zpracování vzorků .....	19
6.6	Free-floating imunohistochemie .....	19
6.7	Barvení kresylovou violetí .....	20
6.8	Mikroskopování .....	21
6.9	Statistické vyhodnocení .....	21
7.	VÝSLEDKY .....	22
7.1	Zjišťování kvality sítnice oka mutantů Lurcher .....	22
7.2	Lokomoční aktivita .....	23
7.2.1	Potravně anticipační chování .....	23
7.2.2	Alpha a Rho .....	23
7.2.3	Synchronizovaná a endogenní perioda .....	25
7.3	Rytmus v hladině proteinů BMAL1, pERK1/2 a pGSK3 $\beta$ .....	27
8.	DISKUZE .....	35
8.1	Rytmus v lokomoční aktivitě .....	35
8.2	Rytmická hladina proteinů BMAL1, pGSK3 $\beta$ a pERK1/2 .....	37
9.	ZÁVĚR .....	41
10.	POUŽITÁ LITERATURA .....	42

## 1. Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
AVP	arginin vazopresin
B6CBA	myši kmen
Bmal1	Brain and muscle Arnt-like protein 1
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní protein kináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CK1 $\epsilon$ , $\delta$	Kasein kináza 1 $\epsilon$ , $\delta$
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
CRE	calcium responsive element
CREB	calcium/cAMP response element binding protein
Cry1, 2, 3	Cryptochrome 1, 2, 3
DD	z angl. dark/dark, režim tma/tma
Dbp	D site albumin promoter binding protein
ERK1/2	extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2
Hlf	Hepatic leucemia factor
dmSCN	dorsomediální suprachiasmatická jádra
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GHT	genikulohypotalamický trakt
GluR $\delta$ 2	glutamátový receptor delta 2
Grid2	myši gen kódující glutamátový receptor delta 2
GSK3 $\beta$	glykogen syntáza kináza 3 $\beta$
IGL	intergenikulární listek thalamu
Lc	Lurcher
LD	z angl. light/dark, režim světlo/tma
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MGI	internetová databáze myšního genomu, z angl. Mouse Genome Informatics
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> ATPáza	sodno - draselná pumpa
NMDG <sup>+</sup>	N-methyl-D-glukamin
Npas2	Neuronal PAS domain-containing protein 2
P18	osmnáctý postnatální den, analogicky P1, P2, P3 atd.
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAS	Period-Arnt-Single-minded
Per 1, 2, 3	Period 1, 2, 3
PAK	Proteinkináza A
PVN	paraventriculární jádra
RF	z angl. restricted feeding, režim časově omezeného podávání potravy
RHT	retinohypotalamický trakt
Ror $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Retinoic acid-related orphan receptor $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
SCN	suprachiasmatická jádra
Tef	Thyrotroph embryonic factor
TM3	3. transmembránová doména
VIP	vasoaktivní intestinální polypeptid
vlSCN	ventrolaterální suprachiasmatická jádra
VPAC2	vasoaktivní intestinální peptidový receptor 2
wt	z angl. wildtype; kontrolní jedinec
z angl.	z angličtiny

## 2. Úvod

Myši typu Lurcher mají následkem genové mutace glutamátového receptoru GluR $\delta$ 2 zcela degenerovanou vrstvu Purkyňových buněk v cerebellu. Purkyňovy buňky vytváří jediný výstup z korové oblasti cerebella a jejich synapse mají inhibiční charakter. V návaznosti na smrt Purkyňových buněk sekundárně degenerují oliverní neurony a granulární buňky. Behaviorálním projevem této mutace je ataxie, snížená schopnost učení a menší fyzický výkon. Lurcher myši trpící cerebelární degenerací jsou často využívány jako animální model autismu a dalších typů poruch nervové soustavy.

Cerebellum řídí motorické funkce a podílí se na procesu učení. V posledních letech se spojuje také s procesem tzv. intervalového časování, které jedincům umožňuje odhad krátkých časových intervalů. Je možné, že tato funkce se uplatňuje i v konstituci potravně anticipačního chování, tedy zvýšené aktivity jedince před očekávaným podáváním potravy. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda může cerebellum přispívat také k odhadu delších časových intervalů a modulovat případně cirkadiánní systém a funkci hlavního cirkadiánního pacemakeru v suprachiasmatických jádrech hypotalamu. Tato jádra generují cirkadiánní rytmy, jejichž perioda a fáze je synchronizovaná s vnějším solárním dnem. Výsledné oscilace jsou potom přenášeny neuronálními a humorálními signály k periferním oscilátorům celého těla. Naše výsledky naznačují, že Lurcher mutace narušuje integritu rytmů a dokazuje modulační funkci cerebella v cirkadiánním systému myší.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Charakteristika mutace Lurcher

První popis mutace Lurcher (Lc) pochází z roku 1960. Byla identifikována jako semi-dominantní typ mutace genu *Grid2*. Gen *Grid2* je umístěn na 6. autozomálním chromozomu (Phillips, 1960). Mutace genu *Grid2* způsobuje změnu ve 3. transmembránové podjednotce glutamátového receptoru  $\delta 2$  (GluR $\delta 2$ ). Tento receptor je exprimován pouze v Purkyňových buňkách lokalizovaných v cerebellu. Na základě mutace Lc mění GluR $\delta 2$  své vlastnosti a stává se z něj konstantně otevřený iontový kanál. Touto změnou dochází k dysbalanci iontového prostředí v intracelulárním prostoru buňky a má za následek úplné vymření populace Purkyňových buněk.

Purkyňovy buňky objevené v roce 1837 Janem Evangelistou Purkyněm mají v cerebellu klíčovou regulační úlohu. Patří mezi největší neurony v mozku a tvoří základní funkční jednotku cerebella. Cerebellum zpracovává motorické učení, koordinaci komplexních pohybů a ovlivňuje i mnohé další kognitivní funkce. Myši postižené Lc mutací mají sníženou schopnost učení, trpí behaviorálními poruchami, ataxií a byla u nich nalezena změna imunitního a endokrinního systému (Araki *et al.*, 1993; Vernet-der Garabedian *et al.*, 1998; Cendelín *et al.*, 2010; Lorivel *et al.*, 2014; Tuma *et al.*, 2015). Mutanti Lc jsou díky svým vlastnostem používáni k výzkumu poruch cerebelárních funkcí, kognitivních a motorických deficitů či poruch autistického spektra.

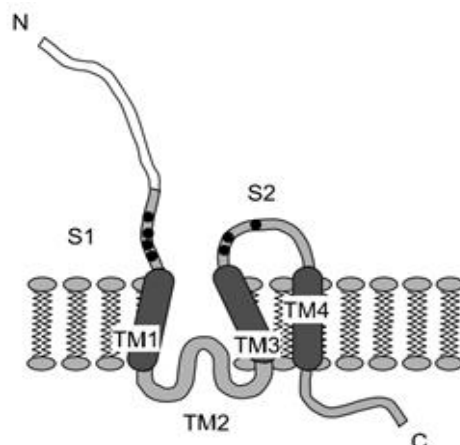
#### 3.2 Glutamátový receptor $\delta 2$

Lurcher mutace způsobuje v GluR $\delta 2$  výměnu adeninu za guanin v nukleotidové pozici 1960 (Zuo *et al.*, 1997). Vlivem této změny dochází k nahrazení aminokyselin, nepolárního alaninu za polární threonin v 654. aminokyselinové pozici, která je lokalizována v 3. transmembránové doméně GluR $\delta 2$ . Substituce je umístěna ve vysoce konzervovaném místě, které je shodné pro celou rodinu ionotropních glutamátových receptorů (Zuo *et al.*, 1997). Průměrná délka genu kódujícího glutamátový receptor u ostatních skupin je okolo 190 kb, zatímco celková délka genu *Grid2* je 1,4 Mb. Tato nadprůměrná velikost je možným vysvětlením častého vzniku mutací v tomto genu. U myši je v současnosti známo na 22 spontánně vznikajících mutací genu *Grid2* (MGI - mouse genome informatics, 2018).

Struktura GluR $\delta 2$  je shodná se stavbou ostatních ionotropních glutamátových receptorů (Obrázek 1). V cytoplasmě buňky je lokalizována C-terminální část, zatímco do prostorem na extracelulární straně membrány vystupuje N-terminální konec. GluR $\delta 2$  se skládá



ze čtyř transmembránových domén (TM), z nichž TM3 vytváří pór uvnitř iontového kanálu. Aminokyselina nacházející se uvnitř domény TM3 ovlivňuje vlastnosti iontově selektivního filtru.



Obrázek 1: Struktura glutamátového receptoru  $\delta 2$ ; převzato a upraveno z (Yuzaki, 2003)

Při výzkumu možných ligandů GluR $\delta 2$  se ukázalo, že receptor po transfekci do buněk neváže glutamát ani jeho analogy. Ani po spojení s jinými podjednotkami ionotropních glutamátových receptorů nevytváří funkční ionotropní glutamátový kanál (Araki *et al.*, 1993; Lomeli *et al.*, 1993; Kohda *et al.*, 2003). V roce 2010 byla objevena molekula Cerebellin 1 vázající se na GluR $\delta 2$ . Cerebellin 1 je solubilní glykoprotein sekretovaný granulárními buňkami a je řazen do rodiny C1q tumor supresorových proteinů. Tento ligand GluR $\delta 2$  má v cerebellu důležitou úlohu. Napomáhá spojení a udržení presynaptických elementů paralelních vláken s postsynaptickými elementy Purkyňových buněk, ustanovuje správné schéma inervace Purkyňových buněk se šplhavými vlákny a indukuje vznik dlouhodobé deprese mezi paralelními vlákny a Purkyňovými buňkami (Hirai *et al.*, 2005). Vazba Cerebellinu 1 na GluR $\delta 2$  je nezbytnou podmínkou k vytvoření nové synapse mezi paralelním vláknem (axonem granulární buňky) a Purkyňovou buňkou. V Purkyňových buňkách je hustota exprese GluR $\delta 2$  nejvyšší v dendritických výběžcích, kde dochází k vytváření synapsí s axony granulárních buněk (Takayama *et al.*, 1995).

V heterologních buňkách exprimujících mutantní GluR $\delta 2$  byla naměřena zvýšená propustnost membrány pro sodíkové ionty zapříčiněná konstitutivní aktivací zmutovaného kanálu. V jednom z klíčových experimentů zkoumajících funkci mutovaného GluR $\delta 2$  nahradili Zuo *et al.*, (1997) extracelulární  $\text{Na}^+$  relativně velkým organickým kationtem NMDG $^+$  (N-methyl-D-glukamin), který kvůli své velikosti kanálem neprojde. Po aplikaci tohoto kationtu se konstitutivně zvýšená depolarizace (-32,8 mV) vrátila do standardních

hodnot kontrolních buněk (-54,3 mV). Mutací způsobená substituce aminokyselin tedy vytváří z GluR $\delta$ 2 konstitutivně aktivovaný iontový kanál i bez přítomnosti ligandu. Výzkumné týmy ve svých pracích porovnaly tyto poznatky s mutacemi podjednotek glutamátových receptorů 1 a 6, které se při mutaci na stejném místě jako Lc mutace taktéž mění v konstitutivně otevřený kanál (Zuo *et al.*, 1997; Kohda *et al.*, 2000).

Změna propustnosti kanálu zejména pro sodné ionty má za následek konstantně zvýšenou aktivitu Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPázy, která spotřebovává větší množství adenosintrifosfátu (ATP). Pro zajištění dostatečného množství je Purkyňova buňka nucena zvýšit buněčnou respiraci. Takto zvýšený nárůst činnosti mitochondriální cytochrom-oxidázy zapříčiňuje navýšení množství kyslíkových radikálů, které buňku silně poškozují. V důsledku energetického kolapsu dochází k degeneraci Purkyňovy buňky. Určení typu buněčné smrti při tomto procesu je stále předmětem výzkumu a jednotlivé články se kloní excitotoxické smrti způsobené Ca<sup>2+</sup> (Zuo *et al.*, 1997), k apoptóze (Norman *et al.*, 1995), nekróze (Dumesnil-Bousez *et al.*, 1992; Nishiyama *et al.*, 2010) či autofagii (Yue *et al.*, 2002).

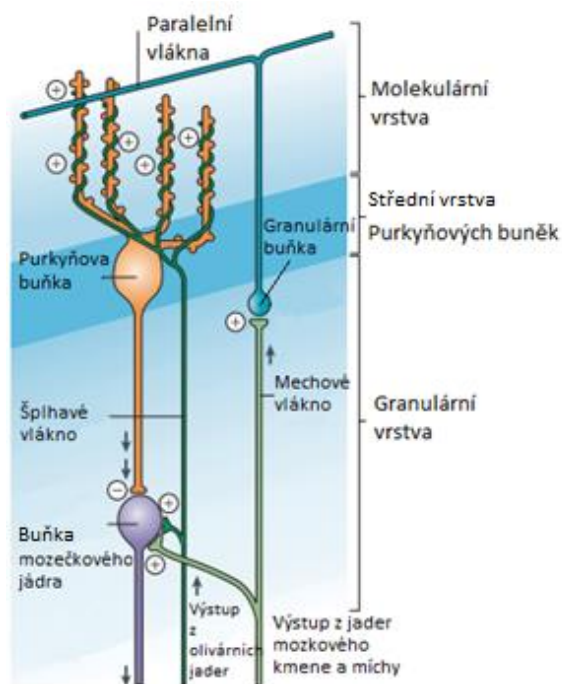
### 3.3 Behaviorální vlastnosti Lurcher mutantů

Lurcher mutace svým nositelům způsobuje snížení motorických schopností a má vliv i na vyšší mozkové funkce, kognice a emoce. Myši trpící touto mutací bývají často využívány k výzkumu vlivu cerebella na prostorovou orientaci, motorické deficity, schopnost učení nebo úzkostné stavy. Postižení jedinci mají oproti zdravým myším stejného kmene sníženou tělesnou hmotnost (Thullier *et al.*, 1997; Tuma *et al.*, 2015). Myši s mutací Lc mají výrazně sníženou schopnost motorického učení a celkový motorický výkon v porovnání se zdravými jedinci téhož kmene (Le Marec *et al.*, 1997; Thullier *et al.*, 1997; Hilber *et al.*, 1998; Porrás-García *et al.*, 2005). Fyziologický vývoj motorických funkcí je opožděný a postnatální reflexy se objevují později. Měřením doby, po kterou jsou Lc myši schopny udržet se pověšené za přední tlapky na provázku tým vědců prokázal sníženou sílu svalů především zpočátku vývoje Lc mutantů. V tomto testu síly podávají nejlepší výkon mladé myši ve věku 3 měsíců. Výkon Lc mutantů od 3. měsíce konstantně klesá. V období 9. - 15. měsíce postižené myši zaostávají za zdravými kontrolami. Od 15. měsíce se ale již výkon Lc i zdravých myši neliší (Hilber a Caston, 2001).

### 3.4 Morfologické rozdíly v cerebellu zdravých myší a mutantů Lurcher

Buněčná struktura cerebella je Lc mutací silně poškozena. Pro správné pochopení důsledků degenerace populace Purkyňových buněk je nutné znát stavbu a jednotlivé buněčné

populace cerebella. U člověka je cerebellum zvrásněno folii stejně tak jako koncový mozek gyrifikací. U laboratorních hlodavců je zvrásněno pouze cerebellum. Střední část cerebella nazývaná vermis je z obou stran obklopena hemisférami. Stejně jako v jiných částech mozku je vnitřní část cerebella vyplněna bílou hmotou tvořenou především axony neuronů a šedou hmotou na povrchu, která je tvořena těly neuronů. Mezi základní typy cerebelárních neuronů patří Purkyňovy buňky, Golgiho buňky, granulární buňky, košíčkovité a hvězdicovité buňky. Ty jsou rozděleny do 3 vrstev cerebelární kůry (Obrázek 2). Svrchní molekulární vrstvu tvoří paralelní vlákna granulárních buněk, hvězdičkové a košíčkové buňky. Tyto interneurony propojují vzdálená paralelní vlákna s Purkyňovými buňkami. Ve střední vrstvě cerebella jsou umístěny Purkyňovy buňky, které jsou nejdůležitější částí cerebella. Jejich axony vytváří jediný výstup z cerebelární kůry. Buňky jsou umístěny vedle sebe v jedné vrstvě. Jejich silně rozvětvené dendrity svým větvením připomínají korunu stromu a jsou členěny pouze v jedné rovině. Dendritické výběžky stoupají do svrchní molekulární vrstvy, kde vytváří synapse s dvěma hlavními excitačními typy neuronálních vláken - šplhavým a paralelním vláknem. Šplhavá vlákna vystupují z jader olivy mozkového kmene a přímou synapsí inervují jednu až deset Purkyňových buněk. S jedním šplhavým vláknem vytváří Purkyňova buňka pouze jedno spojení, nedochází tak k tvorbě paralelních synapsí (Cerminara *et al.*, 2015). Synapse mezi Purkyňovou buňkou a šplhavým vláknem je natolik silná, že vytváří jednu z největších depolarizací v celém nervovém systému (Eccles *et al.*, 1966). Další zdroj vzruchů vytváří aferentní mechová vlákna, která ovlivňují Purkyňovi buňky nepřímou cestou skrze excitační synapse napojené na granulární buňky. Axony Purkyňových buněk se zanořují hluboko do bílé hmoty, kde jsou lokalizována cerebelární jádra, kde vytváří inhibiční typ synapsí. Neurony z cerebelárních jader vytváří nejvíce výstupů z cerebella a zprostředkovávají spojení do dalších částí centrální nervové soustavy (Cerminara *et al.*, 2015). Nejspodnější tzv. granulární vrstva je obsazena hustě řazenými granulárními buňkami. Paralelní vlákna stoupající z této vrstvy buněk míří do svrchní vrstvy. Zde se větví do tvaru T a vedou v řádech milimetrů podél cerebelárních folií kde se napojují na vlákna Purkyňových buněk. Jedna granulární buňka vytváří synaptické spojení s velkým počtem Purkyňových buněk.



Obrázek 2: Neurální propojení v cerebelárním kortexu; převzato a upraveno z (Apps a Garwicz, 2005).

Cerebelární kortex obsahuje více nervových buněk než celý zbytek centrální nervové soustavy dohromady. To vypovídá o velkém množství regulačních procesů, které v cerebellu probíhají (Herculano-Houzel, 2009). Přes tuto obrovskou výpočetní kapacitu, kterou v sobě cerebellum skrývá, není životně důležitou částí mozku a je možné bez něj žít.

Funkční okruhy cerebella myši se začínají vyvíjet poměrně pozdě v ontogenezi. Purkyňovi buňky začínají migrovat ze zárodečných zón neurální trubice teprve po porodu. V této době se formují v jedné vrstvě v molekulární části cerebelárního kortexu (Uzman, 1960; Miale a Sidman, 1961). Prvních 9 postnatálních dní se Purkyňovi buňky mění jen minimálně. Shodně s touto vývojovou stagnací se nerozvíjejí ani charakteristické rysy Lc mutace a postižená mláďata se nedají od zdravých jedinců odlišit. Teprve v druhém týdnu života dochází v Purkyňových buňkách k velkým morfologickým a fyziologickým změnám, které bývají dokončeny do 18. postnatálního dne (P18). V další fázi se již dospělá Purkyňova buňka mění jen málo a dochází pouze k nárůstu velikosti a komplexnosti dendritického stromu (McKay a Turner, 2005).

Základní informace o průběhu degenerace Purkyňových buněk u Lc myši jsou známy od sedmdesátých let (Caddy a Biscoe, 1978). Lurcher myši mají při menší velikosti cerebella srovnatelný počet neuronů se zdravými jedinci, avšak neurony postižených myši jsou

v cerebellu více stěsnané. První patrné rozdíly se v cerebellu mutantů začínají objevovat mezi P3 a P4. Čtvrtý den po porodu začínají umírat první Purkyňovi buňky a je patrná pyknotizace jader v molekulární vrstvě. Následující den jsou již ve vrstvě Purkyňových buněk patrné první mezery. Největší vymírání buněk podle autorů nastává mezi P8 až P10. V období P26 zůstává zachováno pouze 10 % počtu Purkyňových buněk. Do tří měsíců od narození vymřou v cerebelárním kortexu všechny Purkyňovi buňky. V reakci na úhyn Purkyňových buněk sekundárně degenerují oliverní neurony z jejichž původního počtu bývá zachováno 25 %. Ze stejného důvodu degenerují granulární buňky, z nichž zůstává zachováno okolo 10 % populace. Přestože Purkyňovi buňky vytváří synapse s neurony hlubokých cerebelárních jader zůstává jejich počet plně zachován (Caddy a Biscoe, 1978).

## 4. Cirkadiánní systém savců

### 4.1 Suprachiasmatická jádra

V roce 1972 byla dvěma nezávislými výzkumnými týmy identifikována suprachiasmatická jádra (SCN) jako sídlo centrálních cirkadiánních hodin savců (Moore a Lenn, 1972; Stephan a Zucker, 1972). Jsou to dva shluky neuronů lokalizované v anteroventrální části hypotalamu nad optickým chiasmatem po obou stranách třetí mozkové komory. U hlodavců jsou tvořena přibližným počtem 20 000 neuronů (Moore *et al.*, 2002).

Suprachiasmatická jádra fungují v organismu jako hlavní cirkadiánní pacemaker schopný sebeudržujících oscilací, který synchronizuje se svojí fází cirkadiánní oscilátory v periferních tkáních. Jeho význam pro fungování celého cirkadiánního systému byl potvrzen řadou studií, které sledovaly rytmické funkce zvířat s lézí SCN a také s následnou transplantací donorových hypotalamických štěpů obsahujících SCN (Stephan a Zucker, 1972; Inouye a Kawamura, 1979; Lehman *et al.*, 1987). V organismu postrádajícím SCN dochází ke ztrátě cirkadiánní rytmicity a tím i ke změně sekrece hormonů, kardiovaskulárních funkcí a pohybové aktivity (Janssen *et al.*, 1994). Pomocí transplantace SCN mohou být v těle cirkadiánní rytmy znovu obnoveny. Transplantované SCN přenesou do příjemce i délku periody rytmů, které probíhali v dárci před odebráním jader (Ralph *et al.*, 1990).

V těle savců obsahuje každá buňka, včetně bezjaderných erytrocytů (O'Neill a Reddy, 2011) vlastní vnitřní hodiny. SCN autonomně generují cirkadiánní signál i v neperiodickém prostředí s přibližnou periodou 24 hodin. Především pomocí světelného signálu, střídáním světla a tmy v průběhu dne se SCN synchronizují s periodou solárního dne (Herzog *et al.*, 2004).

Neurony SCN vykazují autonomní cirkadiánní rytmy v genové expresi i elektrické aktivitě, které přetrvávají i v konstantních podmínkách *in vitro* (Welsh *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2007). Také gliové buňky, zejména astrocyty vykazují cirkadiánní rytmy v expresi hodinových genů (Prolo, 2005; Brancaccio *et al.*, 2017). Štěrbínovými spoji (z angl. gap junctions) je mezi astrocyty a neuronálními buňkami v SCN zajištěna komunikace (Tamada *et al.*, 1998).

Suprachiasmatická jádra se dělí na dvě části - dorsomediální (dmSCN) část, označovanou jako slupka (z angl. „shell“), která zaujímá vnější část a ventrolaterální (vlSCN) část, která je označována jako jádro (z angl. „core“) (Moore *et al.*, 2002). Ve vlSCN se vytváří vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP), zatímco dmSCN tvoří především arginin vasopresin (AVP) (van den Pol a Tsujimoto, 1985; Moore *et al.*, 2002).

Světelný signál je veden do vlSCN z retiny retinohypotalamickým traktem (RHT) jehož neurotransmiterem je především glutamát (Castel *et al.*, 1993; Jens *et al.*, 2000). V retině jsou lokalizovány gangliové buňky, které transdukují světelný signál pomocí fotonopigmentu melanopsinu. Informace o světle tak může být šířena i bez účasti světločivných receptorů tyčinek a čípků (Qiu *et al.*, 2005). Lidský melanopsin reaguje maximálně na světlo v rozmezí 460-480 nm vlnové délky (Provencio *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2005). Dopad světla na retinu zahajuje v SCN indukci exprese hodinových genů *Per1* a *Per2* (Shearman *et al.*, 1997) a okamžitých raných genů jako např. *c-fos* (Kornhauser *et al.*, 1992). Kromě přímé inervace přes RHT je signál o světle veden do SCN nepřímou drahou vedoucí z retiny skrze inergenikulární listek (IGL) talamu a z něho dále genikulohypotalamickým traktem (GHT). Integrací světelných a nesvětelných signálů má tato nepřímá dráha regulační vliv na funkci SCN (Challet *et al.*, 1998). Neurotransmitery této dráhy jsou především GABA a neuropeptid Y, dále pak enkefalin a neurotensin (Mason *et al.*, 1987; Shinohara *et al.*, 1993; Moore a Card, 1994; Morin a Blanchard, 2001).

Úlohou VIP produkovaného buňkami vlSCN je vzájemná synchronizace oscilací jednotlivých buněk mezi sebou. VIP reguluje syntézu cAMP skrze receptor VPAC2. Pokud jsou VPAC2 receptory geneticky odstraněny z buněk SCN, jednotlivé buňky ztrácejí schopnost vzájemně synchronizovat rytmy v expresi hodinových genů i v elektrické aktivitě. Snižuje se tak celková amplituda cirkadiánních rytmů SCN, a tím i síla synchronizačního signálu k periferním tkáním a dalším částem mozku (Atkinson *et al.*, 2011).

Dorsomediální část SCN nedostává přímý signál o světle. Jeho neurony především udržují endogenní cirkadiánní oscilaci a zprostředkovávají výstupní signály do dalších částí mozku a periferních hodin v organismu (Leak a Moore, 2001).

## 4.2 Molekulární mechanismus regulující funkci cirkadiánních hodin

Molekulární mechanismus generování cirkadiánních oscilací existuje téměř ve všech živých organismech, včetně prokaryotních. V průběhu evoluce se v eukaryotických buňkách konstituoval poněkud složitější mechanismus zpětnovazebných smyček. Přibližně 24 hodinová oscilace v expresi tzv. hodinových genů je základem endogenní cirkadiánní rytmicity (Dunlap, 1999; Kume *et al.*, 1999). Hodinové geny jsou např. *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput), *Bmal1* (brain and muscle Arnt-like protein 1), *Period 1* (*Per 1*), *Period 2* (*Per 2*) a *Period 3* (*Per 3*), dále *Cryptochrome 1* (*Cry1*), *Cryptochrome 2* (*Cry2*), *Rev-erba*, *Rev- erbb*, *Rora*, *Rorb*, *Rory* (retinoic acid-related orphan receptor) *Casein kinas 1 epsilon* (*CK1ε*) a další (*Tef*, *Hlf*, *Dbp*, *AVP*, apod.; Reppert a Weaver, 2001; Emery a

Reppert, 2004; Guillaumond *et al.*, 2005). Tyto geny svými proteiny spolu vytváří transkripčně translační pozitivně i negativně zpětnovazebné smyčky. Tyto zpětnovazebné smyčky zajišťují rytmickou regulaci hodinových genů (Shearman *et al.*, 2000; Reppert a Weaver, 2001). Délka periody je dále ovlivňována posttranslačními úpravami, fosforylací a ubiquitinací proteinových produktů hodinových genů (Ko a Takahashi, 2006).

Geny *Bmal1*, *Clock* a *Rora* jsou transkripční aktivátory řadící se do rodiny basic helix - loop - helix a PAS (Period-Arnt-Single-minded) transkripčních faktorů. Proteiny těchto genů vytváří v cytoplasmě heterodimer BMAL1:CLOCK, který se váže na E-box cis-regulační sekvenci v promotoru genů *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Cry2* (Gekakis *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999). Ve světelné části dne se proteiny PER1, PER2, CRY1 a CRY2 hromadí v cytoplasmě a vytváří společně heterodimery PER:CRY. Ty se dále spojují s kasein kinázami CK1 $\epsilon$  nebo CK1 $\delta$ , které tyto heterodimery fosforylují (Vielhaber *et al.*, 2000; Akashi *et al.*, 2002; Eide *et al.*, 2002; Etchegaray *et al.*, 2010). Fosforylované heterodimery jsou ke konci světelné části dne translokovány do jádra, kde zpětnovazebně inhibují vlastní transkripci inaktivací heterodimeru BMAL1:CLOCK a v noci tak dochází k poklesu hladiny jejich mRNA (Zylka *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999; Vielhaber *et al.*, 2000; Eide *et al.*, 2002). Ke konci noci je inhibiční komplex navázaný na BMAL1:CLOCK ubiquitinován a degraduje. Nejvyšší hladina proteinů je vůči nejvyšší hladině transkriptů posunuta o několik hodin. Fosforylované proteiny PER1 a PER2 jsou později odbourávány v proteasomu (Akashi *et al.*, 2002; Eide *et al.*, 2005). Proteiny CRY1 a CRY2 jsou rozštěpeny v komplexu SCF E3 ubiquitin ligázou obsahující protein FboxL3. Mutace genu *Overtime* způsobuje nefunkčnost FboxL3 a nedochází tak k odbourávání CRY. V důsledku této mutace přetrvává inhibice aktivačního komplexu BMAL1:CLOCK, a dochází tak k prodloužení periody. Jedinci s homozygotní mutací genu *Overtime* vykazují prodloužení periody až na 26 hodin (Eide *et al.*, 2002; Busino *et al.*, 2007; Siepka *et al.*, 2007).

Heterodimer BMAL1:CLOCK aktivuje také transkripci jaderných genů *Rev-erba* a *Rora*, které jsou řazeny do rodiny sirotčích jaderných receptorů. Mezi geny *Rora* a *Rev-erba* dochází ke kompetici o vazebnou sekvenci RORE na promotoru genu *Bmal1*. Transkripce genu *Rev-erba* je rychlejší, váže se na sekvenci RORE promotor genu *Bmal1* a inhibuje jeho transkripci. Gen *Rora*, jehož transkripce je pomalejší, transkripci *Bmal1* naopak aktivuje (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Guillaumond *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2012). Touto sekundární zpětnovazebnou smyčkou je zajišťována exprese genu *Bmal1* v antifázi vůči transkripci genů *Per* a *Cry* (Preitner *et al.*, 2002).



Další regulační roli v tomto mechanismu zastává protein PER2, jehož N-konec s LXXLL motivem interaguje s REV-ERB $\alpha$  skrze lysin 456 v doméně vázající ligand. Pomocí této regulace protein PER2 dokonale synchronizuje primární a sekundární zpětnovazebnou transkripčně-translační smyčku (Schmutz *et al.*, 2010).

Cirkadiální rytmy jsou vytvářeny fázovými posuny mezi transkripčními smyčkami, které utváří přibližně 24 hodinovou periodu. Transkripce genu *Bmal1* je největší v tmavé fázi dne a klesá s ránem vlivem působení proteinu REV-ERB $\alpha$ . Nejvyšší hladina mRNA genů *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Cry2* je naopak během světlé části dne (Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Guillaumond *et al.*, 2005).

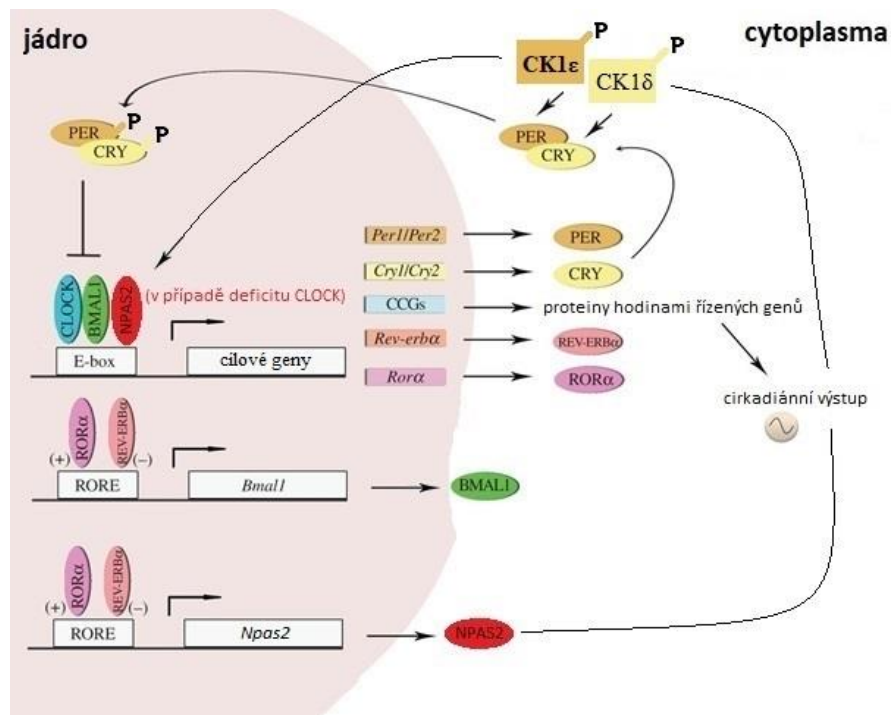
Jak je výše uvedeno, regulace cirkadiálního rytmu je zajišťována kontrolou transkripce genů. Cirkadiální rytmus je ale také regulován na posttranslační úrovni. Kromě zmíněné fosforylace zajišťované cytoplasmatickou CKIe dochází též k histonové acetylaci, jejíž průběh má také cirkadiální rytmus. Acetylaci histonů zajišťují histonacetylázy a je tím zvyšována míra transkripce. Konkrétně jsou acetylovány histon 3 a histon 4 promotorové oblasti hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Cry* (Etchegaray *et al.*, 2003). Protein CLOCK vykazuje vlastní histonacetylázovou aktivitu. Acetyluje také *Bmal1*, čímž je usnadněna inaktivace komplexu BMAL1:CLOCK pomocí dimeru PER:CRY (Doi *et al.*, 2006; Hirayama *et al.*, 2007).

Při deficitu funkce genu *Clock* může jeho úlohu v předním mozku převzít hodinový gen *Npas2* (z angl. Neuronal PAS domain-containing protein 2). Protein tohoto genu vytváří, stejně jako *Clock*, heterodimer BMAL1:NPAS2 (Reick *et al.*, 2001; DeBruyne *et al.*, 2007). Transkripci genu *Npas2* řídí dvojice proteinů REV-ERB $\alpha$  a ROR $\alpha$ , které se váží k sekvenci RORE v jeho promotoru. V porovnání s genem *Bmal1* je afinita obou regulačních proteinů k NPAS2 nižší. Protein REV-ERB $\alpha$  navíc nedokáže plně inhibovat transkripci *Npas2*. Blokuje pouze aktivační funkci ROR $\alpha$  (Crumbley *et al.*, 2010).

Regulační promotorové sekvence hodinových genů E-box a RORE jsou součástí velké řady dalších genů, které jsou tedy také řízené rytmickým střídáním vazby pozitivních a negativních elementů hodinového mechanismu. Jsou to tzv. hodinami řízené geny, které tvoří jeden z výstupních mechanismů, kterými je přenášen rytmus z pacemakeru do celého těla (Lowrey a Takahashi, 2004).

Jako jeden ze základních výstupních signálů, který slouží k zprostředkování synchronizačního signálu pacemakeru do dalších částí mozku a periferních hodin v těle je rytmus AVP syntetizovaného v dmSCN (Reghunandan *et al.*, 1998). Peptid AVP má důležitou úlohu v ledvinách reguluje rovnováhu vody a solí v těle a podílí se na rytmické

produkci kortikoidů v kůře nadledvin. V SCN se podílí na regulaci rytmické aktivity neuronů a vytváření výstupních signálů (Ingram *et al.*, 1998). V regulační části promotoru AVP je specifická vazná sekvence E-box, která váže heterodimer proteinů BMAL1:CLOCK. AVP se tak řadí mezi tzv. hodinami řízené geny CCGs (z angl. clock controlled genes) (Carter a Murphy, 1992).



Obrázek 3: Cirkadiánní hodiny savců. Transkripce genů *Period* (*Per1* a *Per2*) a *Cryptochrome* (*Cry1* a *Cry2*) je aktivována heteromerním komplexem BMAL1:CLOCK. Transkripce se spouští skrze sekvenci E-box těchto genů. V případě deficitu proteinu CLOCK je aktivován gen *Npas2* jehož protein může zastoupit funkci CLOCK. Proteiny PER a CRY jsou fosforylovány CK1 $\epsilon$  a CK1 $\delta$ . V heterodimeru pak tlumí aktivitu BMAL:CLOCK, čímž inhibují vlastní transkripci. Sekundární smyčka sestává z proteinů ROR $\alpha$  a REV-ERB $\alpha$ , které ovlivňují expresi genu *Bmal1* skrze sekvenci RORE. ROR $\alpha$  má na expresi *Bmal1* pozitivní vliv a REV-ERB $\alpha$  negativní. Výsledkem těchto zpětnovazebných smyček je oscilace hladiny mRNA a proteinů hodinových genů v přibližně 24 hodinové periodě. Heterodimery BMAL:CLOCK pak také ovlivňují mnoho dalších CCGs, které řídí specifické fyziologické funkce organismu; převzato a upraveno z (Golombek *et al.*, 2014).

### 4.3 Světelná synchronizace

Cirkadiánní systém může být s vnějším časem synchronizován světelnými i nsvětelnými signály. Světlo je však pro SCN nejsilnějším synchronizačním signálem. Po světelném signálu během noci nebo subjektivní noci dochází v SCN k fázovému posunu cirkadiánního rytmu a zvýšení aktivity suprachiasmatických neuronů. V první části subjektivní noci dochází vlivem světla k fázovému zpoždění, naopak osvětlení v druhé

polovině subjektivní noci má za následek fázové předběhnutí hodin. Reakce vnitřního oscilátoru může být tedy na světelný signál různá podle doby působení vnějšího synchronizátoru a jeho intenzity. Takto dochází například k synchronizaci SCN ke změně fotoperiody, tedy změně délky světlé části dne nebo k adaptaci na změnu světelného režimu při přeletech přes časová pásma.

Axony fotosenzitivních gangliových buněk, které v sobě obsahují fotopigment melanopsin, tvoří retinohypotalamický trakt (Hannibal *et al.*, 2000; Golombek a Rosenstein, 2010). Na cirkadiánní fotorepci se dále podílí S-čípky (Jacobs *et al.*, 1991). Světelný signál vyvolá vylití neuropřenašeče glutamátu na synapsi mezi zakončením RHT a buňkami vlSCN. Kromě glutamátu vytváří gangliové buňky neuropeptid PACAP (z angl. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide). Tento neuropeptid se váže na receptory spřažené s G-proteiny. PACAP se může podílet na světelné aktivaci *Per* genů. PACAP se ve vlSCN váže na VPAC2 receptory, stejně jako VIP a může tak indukovat expresi *Per* genů nezávisle na zpětnovazebné smyčce. Může tak docházet k posílení rytmicity neuronů ve vlSCN (Chen *et al.*, 1999). Při mikromolárních koncentracích je PACAP schopen modulovat glutamátem indukované fázové posuny. Při nanomolární koncentraci pak vyvolává fázovou reakci na světlo podobně jako glutamát (Hannibal, 2002). Nielsen *et al.*, (2001) testoval roli glutamátu při synchronizaci v *in vitro* podmínkách na řezech SCN. Po aplikaci glutamátu došlo k indukci transkripce genů rodiny *Per* stejně, jako k tomu dochází po světelném pulzu.

Klíčovou molekulou pro přenos signálu o světle cirkadiánnímu systému je neuropřenašeč glutamát. Vazbou glutamátu na glutamátové receptory se zvýší influx  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buněk SCN. Vápník jako signální molekula spouští kaskádu reakcí uvnitř buňky, které mají za následek aktivaci kináz PKA, CAMKII a MAPK. Těmito kinázami je fosforylován transkripční faktor CREB (calcium/cAMP response element binding protein). CREB se poté navazuje na CRE (cAMP responsive element) místo promotoru hodinových genů *Per1* a *Per2*. Světelný impuls touto cestou iniciuje transkripci hodinových genů *Per1* a *Per2*, což následně vede ke zvýšení hladiny jejich proteinů mimo standardní čas jejich endogenního vrcholu, který je určován vazbou BMAL1:CLOCK. Dochází tak k ovlivnění dynamiky zpětnovazebné smyčky a následně k fázovému posunu cirkadiánního systému (Albrecht *et al.*, 1997; Gau *et al.*, 2002; Travnickova-Bendova *et al.*, 2002; Tischkau *et al.*, 2003). Informace o fázovém posunu je z vlSCN převedena do dmSCN, čímž dojde k přenastavení endogenních oscilátorů v dmSCN.

## 4.4 Cirkadiánní systém a cerebellum

Cerebellum u myši a potkanů exprimuje v plné šíři všechny základní hodinové geny. Jako u většiny periferních oscilátorů je správný chod cirkadiánních oscilací cerebella závislý na SCN. Léze SCN provedená u potkanů ukončila rytmicitu v cerebellu a byla tak prokázána jejich řídicí funkce cerebelárních oscilací. Hlavní místo exprese hodinových genů u cerebella leží v cerebelárním kortexu. Purkyňovi buňky vykazují nejvýraznější rytmy v expresi hodinových genů z celé populace cerebelárních buněk. Tyto oscilace však podle 3 studií stejného týmu vykazují 5 hodinové zpoždění oproti SCN. (Rath *et al.*, 2012; 2013; 2014; Mordel *et al.*, 2013)

Přímé spojení mezi SCN a cerebellem nebylo dosud potvrzeno. Seřizování periferního oscilátoru cerebella může být ovlivňováno sekundárně pomocí humorálních signálů. Mediátor přenosu by v tomto případě mohl být melatonin, hormon ovlivňující mnohé oblasti cerebella (Al-Ghoul *et al.*, 1998). Melatonin mimo jiné ovlivňuje tvorbu neurotrofických faktorů, které jsou nezbytné k řízení růstu a proliferace cerebelárních buněk (Imbesi *et al.*, 2008). Další důležitou vlastností melatoninu je schopnost inhibice cholinergní neurotransmise v granulárních buňkách cerebella, které přímo excitují Purkyňovi buňky (Markus, 2003; Lax, 2008). Melatonin navíc ovlivňuje vodivost membrány granulárních a Purkyňových buněk (Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015). Zdá se tedy pravděpodobné, že melatonin seřizuje cerebelární cirkadiánní hodiny skrze spojení granulárních a Purkyňových buněk.

Cirkadiánní oscilace v cerebellu mohou být pravděpodobně řízeny i časovaným příjmem potravy. Podle současných znalostí nejsou cirkadiánní oscilace cerebella ovlivňovány pouze cyklem světla a tmy, přestože podle rytmicity genové exprese v cerebellu je tato struktura řízena SCN (Rath *et al.*, 2014). Patton *et al.* (2014) popisuje fázový posun v rytmu hodinových genů v oblastech mozku podílejících se na motivačním chování, včetně struktur cerebella, způsobený změnou doby krmení. Tyto změny jsou však pouze v rozmezí cirkadiánní periody, což podporuje hypotézu o interakci mezi cirkadiánním a motivačním systémem.

Potravně anticipační chování znamená zvýšenou míru aktivity předcházející době krmení ve chvíli, kdy zvíře dostává potravu podle pravidelného rozvrhu. Potravně anticipační chování je řízeno oscilátory, které jsou v principu nezávislé na SCN a mohou tak vytvářet sebeudržující hodinový mechanismus synchronizovaný příjmem potravy. Potravou řízené oscilátory mohou být vytvářeny spojením několika mozkových struktur, mezi něž studie zahrnují parabrachiální jádra a dorsomediální hypothalamus (Carneiro a Araujo, 2009).

V pokusech, ve kterých byly Purkyňovy buňky zničeny pomocí imunotoxinů, nebo byly využity myši s cerebelární mutací Hotfoot, bylo popsáno prodloužení rytmů v potravně anticipačním chování. Tyto poznatky naznačují zapojení Purkyňových buněk cerebella do sítě sebeudržujících potravně řízených oscilátorů (Mendoza *et al.*, 2010). Molekulární komponenty cirkadiánní oscilace jsou přítomny v granulórní vrstvě i Purkyňových buňkách cerebelárního kortexu. Ve svém pokusu Bering *et al.*, (2017) použili nový myší kmen, u kterého mají jedinci specificky knockoutovaný gen *Bmal1*, a to pouze v granulórních buňkách. *Bmal1* se tedy nevyskytoval v granulórní vrstvě cerebella, zatímco ve struktuře SCN i v Purkyňových buňkách byl plně exprimován. Během režimu časově omezeného podávání potravy (RF; z angl. restricted feeding) se specificky knockoutované myši nijak nelišily od kontrolních jedinců. Tím bylo prokázáno, že granulórní vrstva cerebella, na rozdíl od Purkyňových buněk neovlivňuje potravně anticipační chování během režimu RF.

Mordel *et al.*, (2013) se pokusil svým experimentem ověřit, zda je rytmická exprese hodinových genů v cerebellu, synchronizovaná s hlavním pacemakerem v SCN, převedena do elektrického signálu Purkyňových buněk. Přestože Purkyňovy buňky vykazují silnou expresi hodinových genů a závěry dalších studií ukazují na jejich roli v řízení potravně anticipačního chování, nepodařilo se u nich najít cirkadiánní rytmus v jejich signálním výstupu.

Mezi nejvíce zkoumané oblasti přijímající výstupy z cerebella patří v dnešní době bazální ganglia, mozkový kmen, neokortex a thalamus (Roostaei *et al.*, 2014). Pomocí spojení se striatem ovlivňuje cerebellum motorickou koordinaci celého těla. Například stimulováním cerebelární projekce do oblasti striata bylo dosaženo výrazného zlepšení pohybu a chůze u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou (Rossi *et al.*, 2015). Pomocí stimulace či naopak ablace cerebelárních jader a kortexu byl prokázán značný vliv cerebella na viscerální funkce jako srdeční tep, tlak krve, dýchání nebo napětí hladkých svalů (Haines *et al.*, 1990). Řada studií prokázala přímá spojení mezi cerebellem a částmi hypothalamu, s dorsomediální částí, laterální hypothalamickou oblastí a paraventriculárními jádry (PVN) (Haines *et al.*, 1997). Skrze přímé neurální spojení do thalamu tak může cerebellum ovlivňovat základní homeostatické funkce. Reciproční spojení mezi cerebellem a SCN a vliv cerebella na cirkadiánní systém však nebyly dosud studovány.

## 5. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit jaký vliv má cerebelární degenerace na cirkadiánní systém. Hlavní otázkou bylo, zda a do jaké míry cerebellum ovlivňuje chod cirkadiánních rytmů v hlavním cirkadiánním pacemakeru v SCN, ve vybraných oblastech mozku a zda má vliv na cirkadiánní rytmy v lokomoční aktivitě a potravně řízené anticipační chování.

## 6. Materiál a metody

### 6.1 Pokusná zvířata

Jako pokusná zvířata sloužily myši typu Lurcher (+/Lc) a wildtype (wt) (+/+) kmene B6CBA z chovu Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK v Plzni. Pro pokus jsme získali jak samce, tak samice přibližně ve stejném poměru. Myši byly chovány při standardních teplotních podmínkách; teplota 20 - 24 °C, relativní vlhkost 30 - 60 %, s dostupností vody a potravy *ad libitum* s výjimkou režimu RF.

Myši byly umístěny po jedné v plastových boxech z vrchu krytých kovovou mříží. Na mříži každého boxu byl umístěn senzor pohybu tak, aby měřil aktivitu v celém boxu. Chovné boxy byly vystlány podestýlkou z dřevěných pilin, která byla pravidelně vyměňována.

Místnost s umístěnými myšmi byla kryta dvojitými dveřmi, mezi které byl zavěšen těžký černý plášť chránící před průnikem světla. Před pokusem byla zhasnuta veškerá světla klimatizační jednotky a světelně odstíněna větrací šachta, která by též mohla vést slabé množství světla.

Do experimentu bylo zařazeno 59 myší. Z celého počtu celkem 26 myší s mutací Lc a 33 kontrolních jedinců. Pod senzory měřícími aktivitu bylo umístěno 12 myší Lc a 12 wt myší. V celém experimentu předčasně uhynuly 2 myši s mutací Lurcher na následky podmínek režimu RF.

### 6.2 Časový profil pokusu

Před zahájením pokusu byly myši chovány společně po 3 až 4 kusech ve velkých boxech v podmínkách režimu light/dark (LD, z angl. světlo/tma). Světlo bylo nastaveno automatickým spínačem od 6:00 do 18:00 (SELČ).

- Lurcher

V den 0 bylo pod senzory umístěno 12 myších samců s mutací Lurcher. Prvních 17 dní pokusu byly drženy v režimu LD 6:00 - 18:00. Od 18. dne pokusu byly myši převedeny na světelný režim dark/dark (DD, z angl. dark/dark), který trval po dobu 20 dní. Zvířata v době pokusu byla vyrušována v minimální možné míře. Při světelném režimu DD bylo ke svícení v místnosti používáno pouze světlo červeného spektra, které je biologicky neaktivní.

Třicátý osmý den byl nastaven opět režim LD 6:00 - 18:00. V 56. den pokusu byl zaveden režim RF při zachování světelných podmínek LD 12/12 6:00 - 18:00. Potrava byla myším přístupná pouze v době od 10:00 do 16:00. Tedy v době, kdy je u myši klidové období. Režim RF byl původně plánován na dobu 14 dní. Po 5 dnech režimu RF uhynuly dvě myši a pokus musel být zastaven.

- Wildtype

Pokus s kontrolní skupinou světelným rozvrhem kopíroval předcházející měření na Lc myších. Po naměření režimu LD byly wt myši převedeny na režim DD, který probíhal po dobu 21 dní. Poté byl nastaven opět režim LD, který byl po 18 dnech doplněn režimem RF. Po 5 dnech omezeného přístupu potravy byl pokus úspěšně ukončen.

### 6.3 Měření lokomoční aktivity

Měření lokomoční aktivity bylo prováděno infračerveným detektorem pohybu Minimeter Vitalview od firmy Starr (Oregon, USA). Data sbíraná z detektoru umístěného na vrchu klece byla nahrávána v dodaném programu Vitalview. Zpracování a vyhodnocení dat do aktogramů bylo vytvářeno v programu ClockLab Analysis.

### 6.4 Světelné režimy

První nastavený režim byl LD. Světelné podmínky byly nastaveny na 24 hodinový cyklus, kdy měla zvířata 12 hodin světlo a 12 hodin tmu. V tomto případě od 6:00 do 18:00. Při tomto režimu LD měla zvířata přístup k potravě i vodě *ab libitum*. Zvířata byla ponechána v tomto světelném paradigmatu po několik dní, aby mohla seřadit svou endogenní periodu s nastaveným časem a přizpůsobit se tak danému režimu.

Druhým světelným paradigmatem byl režim DD. V tomto režimu měly myši po celých 24 hodin absolutní tmu. Bylo zamezeno jakémukoliv vstupu světla do chovné místnosti. Při nutných pracích v místnosti bylo v tomto režimu svíceno červeným světlem, které je pro myši biologicky neaktivní.

V režimu RF byly myši drženy ve světelných podmínkách režimu LD. Zdroj vody měly *ab libitum*, ale měly omezenou dobu přístupu potravy. Čas, kdy měly myši k dispozici potravu je nastaven na klidovou dobu jejich subjektivního dne. V tomto případě měly myši potravu přístupnou pouze od 10:00 do 16:00.

## 6.5 Zpracování vzorků

V den odebrání vzorků byly myši drženy po celou dobu v režimu DD, aby nedošlo k potlačení či aktivaci exprese některých z hodinových genů, které reagují na světlo. Myši byly uspávány po 12 kusech jednou za 4 hodiny v průběhu 24 hodin dávkou 50mg/kg thiopentalu aplikovaného intraperitoneální injekcí. Poté byl do srdce aplikován heparin v přibližné dávce 500 U. Následně byla provedena intrakardiální perfuze roztokem PBS po dobu 3minut a poté fixace pomocí 4% roztoku PFA po dobu 5 minut. Odebrané vzorky, mozek a obě oči, byly dále vloženy na 12 hodin do 4% roztoku PFA. Poté byly ponechány v kryoprotektivním roztoku 20% sacharózy. Po 24 hodinách byly vzorky zamrazeny v suchém ledu a poté vloženy do -80°C. Mozek byl krájen při -25 °C na 25 µm tenké řezy. Při krájení byly v přibližném počtu vybírány vzorky se strukturami: SCN, PVN a habenulou. Nakrájené plátky byly štětcem vybírány do jamek s roztokem PBS. Oči byly krájeny při -20 °C na 30 µm tenké řezy. Vhodné vzorky byly vkládány přímo na skla.

## 6.6 Free-floating imunohistochemie

Vybrané vzorky byly pomocí štětce vloženy do jednotlivých jamek tak, aby v každé jamce byly vzorky všech vybraných mozkových struktur a pouze z 1 konkrétního jedince. Po celou dobu provádění metody byl kladen důraz na správné rozmístění všech vzorků. Prvních 10 minut byly řezy máčeny v 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> z důvodu zničení aktivity endogenních peroxidáz. Poté byly vzorky 3x promyty v PBS. Tímto krokem došlo k zablokování nespecifického pozadí. V dalším kroku byly řezy inkubovány v roztoku 1% BSA pufru, do kterého bylo přidáno 2% NGS (normal goat serum). Po hodinové inkubaci byly řezy přemístěny do roztoku 1% primární protilátky ředěné v 1% BSA (BMAL1: 1:500, pERK: 1:1500; pGSKβ: 1:600; PER1: 1:250). Zde byly přes noc inkubovány při teplotě 4 °C. Druhý den ráno byly vzorky promyty 3x po 5 minutách v 0,3% roztoku BSA. Následně byly vzorky inkubovány v sekundární protilátce určené proti imunoglobulinům zvířete, z něhož pocházela primární protilátka. Poté byly vzorky 2x po 5minutách promyty v 0,3% BSA s 0,1% Tritonem. V dalším kroku byly vzorky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě v roztoku avidin-biotin-peroxidázového komplexu (Vectastain: ABC Kit, Goat IgG, 6105) ředěného



v poměru 1:400. Následovalo promytí vzorků v 0,3% BSA po dobu 5 minut a poté v PBS 2x po dobu 5 minut.

Posledním krokem bylo inkubování řezů v roztoku diaminobenzidinu (DAB - Sigma Aldrich, D5905) oxidovaného v roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Oxidovaný diaminobenzidin se navazuje jako substrát na avidin-biotin-peroxidázový komplex a vytváří hnědé zbarvení komplexu, čímž lokalizuje místa, kde došlo k navázání obou protilátek. Doba inkubace v diaminobenzenu určuje intenzitu zbarvení vzorku a může trvat v řádu desítek sekund až desítek minut. Na závěr byly vzorky 2x promyty v PBS.

Pomocí štětce se vzorky nanášely na želatinovaná podložní sklíčka. Po zaschnutí řezů byla sklíčka promyta destilovanou vodou a pak následně máčena 5 minut v 70% EtOH, 2x5 minut v 95% EtOH a 3 po 5 minutách v xylenu. Po oschnutí byla sklíčka potřena optickým médiem (směs DPX Mountant for histology - Sigma Aldrich a xylenu - Penta s.r.o.) a překryta krycím sklíčkem. Po několika dnech zasychání média byla sklíčka očištěna od přebytečných vrstev lepidla a vyleštěna EtOH.

## 6.7 Barvení kresylovou violetí

- Příprava Kresylové violeti
- 500 ml vody
- 0,5 g Cresyl Violet acetát
- 1,25 ml kyseliny octové

Všechny výše uvedené látky byly smíchány ve skleněné láhvi. Roztok byl za stálého míchání zahříván na 60 °C a poté několik hodin míchán. Poté byl skladován v ledničce v zatemněné láhvi. Před použitím byl roztok znovu ohřán, aby došlo k rozpuštění kresylové violeti a poté přefiltrován skrze filtrační papír.

Nakrájené vzorky očí byly postupně máčeny v chemikáliích v tomto pořadí:

- Xylen
- 96% EtOH
- Destilovaná H<sub>2</sub>O
- Kresylová violet
- Nededilovaná H<sub>2</sub>O
- 70% EtOH
- 96% EtOH
- Xylen

V každém kroku je sklo potřeba pouze párkrát rychle namočit. Etanol kresylovou violet' odbarvuje, při 7. a 8. kroku tak lze dobře nastavit intenzitu obarvení vzorku.

## **6.8 Mikroskopování**

Všechny řezy na sklíčku byly nafoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus Provis. Ze získaných snímků byly vybrány nejrepresentativnější fotografie jednotlivých struktur. Počet buněk byl vyhodnocován manuálně i počítačem pomocí programu ImageJ (FIJI). Jednotlivé struktury byly v programu ručně označeny, obraz převeden do 8-bitové kvality a poté program automaticky spočítal počet buněk. Tento postup byl aplikovatelný pouze na vzorky s imunohistochemicky značeným proteinem BMAL1, který je exprimován jaderně, a jednotlivé buňky byly jasně ohraničené a pro program dobře identifikovatelné. U zbylých 2 proteinů byl signál detekován v cytosolu, což znemožnilo automatické počítání, a proto bylo nutné počet značených buněk přepočítat ručně.

## **6.9 Statistické vyhodnocení**

Hodnoty alfa, rho, totální lokomoční aktivita byly vypočítány jako průměr souhrnu impulsů v daném časovém úseku. Perioda rytmu byla odečtena z chi square periodogramu. Hodnoty mezi skupinami byly srovnávány nepárovým Mann-Whitneyovým pořadovým t-testem. Cirkadiánní rytmus v hladinách sledovaných proteinů byl hodnocen jednocestnou ANOVA pro efekt času. P menší než 0,05 určovalo statistickou významnost.

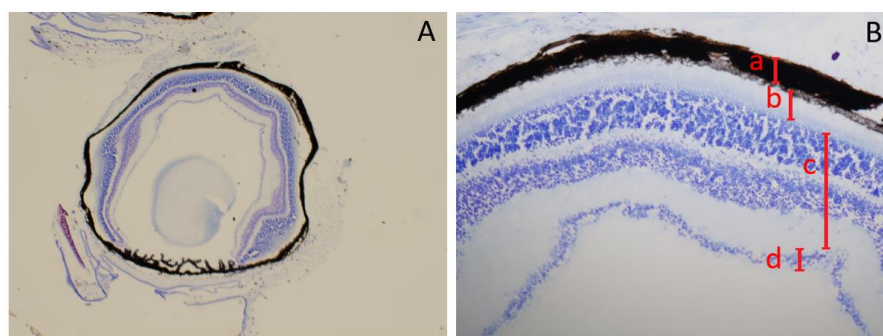
## 7. Výsledky

V naší práci jsme se nejdříve zaměřili na sledování lokomoční aktivity zvířat. Měřili jsme délku endogenní periody, schopnost synchronizace s vnějším prostředím a míru potravně anticipačního chování. Dále nás zajímaly rytmy v hladině proteinů hodinových genů BMAL1 a PER1, v hladině fosforylovaných kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  v různých částech mozku. Hladina proteinu PER nakonec nebyla z metodických důvodů stanovena. Z těchto údajů jsme chtěli posoudit vliv cerebella na cirkadiánní rytmy v hlavním cirkadiánním pacemakeru - SCN a dále v PVN a habenule.

Mutanti Lc trpí často degenerací sítnice oka, která by mohla mít negativní maskující dopad na naše výsledky. Proto jsme po skončení experimentu testovali kvalitu sítnice oka u všech použitých zvířat.

### 7.1 Zjišťování kvality sítnice oka mutantů Lurcher

Barvení retiny bylo nutno použít z důvodu častého výskytu slepoty u Lc mutantů. Jedincům trpícím touto mutací může kompletně degenerovat vrstva gangliových buněk retiny (Tuma *et al.*, 2015). Myši tak mohou mít narušenou i synchronizační dráhu ze sítnice do SCN, což může zkreslit výsledky jak lokomočních záznamů, tak imunohistochemického stanovení exprese proteinů hodinových genů. V našem experimentu jsme obarvili řezy sítnicí oka ze všech testovaných zvířat kreslovou violetí a zhodnotili kvalitu jednotlivých vrstev, zejména gangliových buněk (Obrázek 4). Výsledky ukázaly, že všechny Lc myši v tomto pokusu měly retinu neporušenou a žádná data tak nemusela být vyřazena z hodnocení.



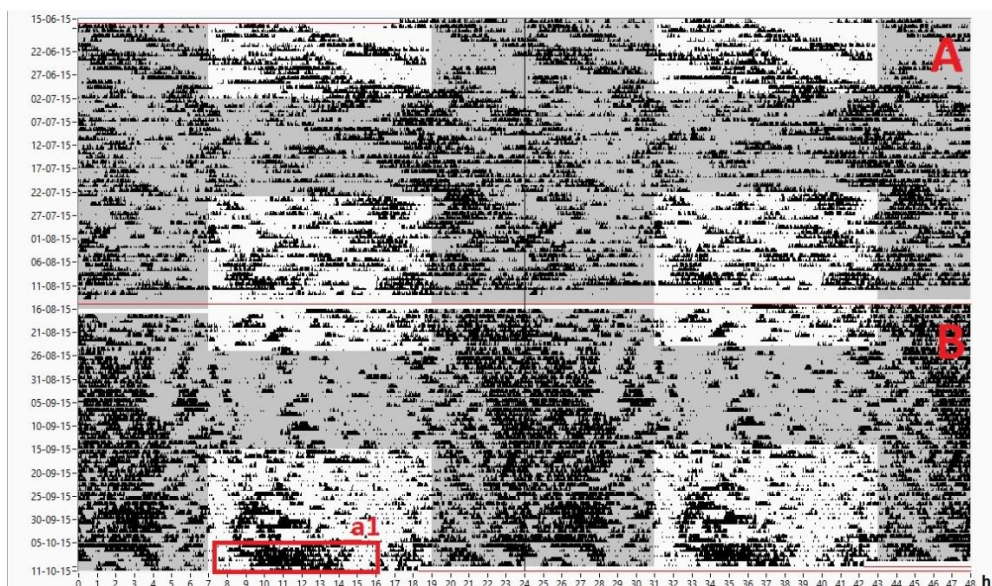
Obrázek 4: Struktura sítnice oka Lc myši. (A) fotografie myšního oka při 4 násobném zvětšení. (B) detail retiny při 10 násobném zvětšení se všemi zachovalými vrstvami buněk; pigmentovým epitelem (a), vrstvou tyčinek a čípků (b), plexiformní a nukleární vrstvou (c) a vrstvou gangliových buněk (d).

## 7.2 Lokomoční aktivita

Myši jsou přirozeně noční zvířata a mají vyšší lokomoci v noční době. Režim LD ukazuje schopnost synchronizace s vnějším světelným prostředím, režim DD zase délku endogenní periody. Analýzou aktogramu jsme vyhodnocovali rozdíly v délce periody, poměru aktivity během dne a noci a anticipačním chování u Lc a wt myší.

### 7.2.1 Potravně anticipační chování

Režim časovaného podávání potravy vyvolal potravně anticipační chování u wt myší (Obrázek 5B). Myši Lurcher však nebyly schopné předpovídat čas podávání potravy, ani zvýšit svoji aktivitu v době krmení (Obrázek 5A). Po pěti dnech experimentu začaly hynout a pokus musel být ukončen.

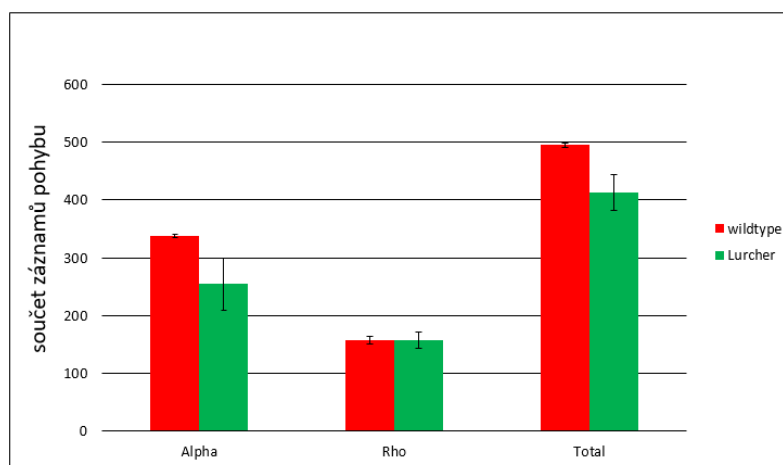


Obrázek 5: Ukázkový aktogram s kompletním záznamem pohybové aktivity Lc myši (A) a wildtype jedince (B) v dvojitě rozloženém záznamu se záznamem světelných režimů (bílé pozadí značí světelnou fázi dne, šedé pozadí značí tmu). V posledních 5 dnech pokusu při režimu RF u myši Lc zjevně chybí anticipační chování před a během přístupné potravy. Myš wt (B) v posledních 5 dnech pokusu při režimu RF vykazuje anticipační chování před dobou přístupné potravy a zvýšenou aktivitu v době volného přístupu k potravě, tedy mezi 10 - 16 hodinou (a1). Osa X z důvodů fixního nastavení programu Clocklab zobrazuje bod 0 jako 23. hodinu.

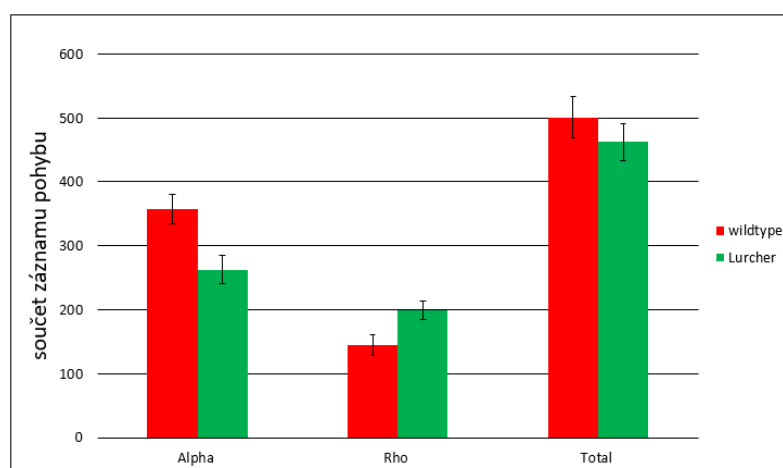
### 7.2.2 Alpha a Rho

Alpha je definovaná jako množství pohybu během aktivní fáze dne, u myší je touto fází noc. Rho značí míru lokomoce během klidové fáze dne, u myší je to období ve světelné části dne. Z naměřené lokomoční aktivity jsme počítali Alfa, Rho a jejich celkový součet

Total nejprve pro světelný režim LD (Obrázek 6) a také pro světelný režim DD (Obrázek 7). Na obou režimech mají wt myši zvýšenou Alfa oproti Lc myším (LD: P - 0,0006; DD: P - 0,0100). Hodnota Rho je u obou měřených skupin stejná na režimu LD, ale mírně zvýšená u Lc na režimu DD (P - 0,0172). Celková aktivita je mírně zvýšená u wt jedinců na režimu LD (P - 0,0034), rozdíl mezi skupinami v režimu DD není statisticky významný.



Obrázek 6: Poměr pohybové aktivity v režimu LD mezi wt a Lc. Grafy vyjadřují průměr ze souhrnu impulsů záznamového zařízení v průběhu noci (alfa), v průběhu světlé části dne (rho) a v průběhu celého dne (total) (n= 12; ± S.E.M)



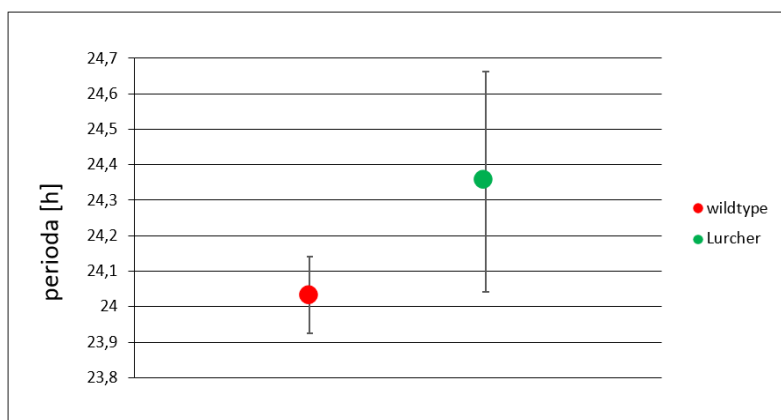
Obrázek 7: Poměr pohybové aktivity v režimu DD mezi wt a Lc. Grafy vyjadřují průměr ze souhrnu impulsů záznamového zařízení v průběhu noci (alfa), v průběhu světlé části dne (rho) a v průběhu celého dne (total) (n= 12; ± S.E.M)

### 7.2.3 Synchronizovaná a endogenní perioda

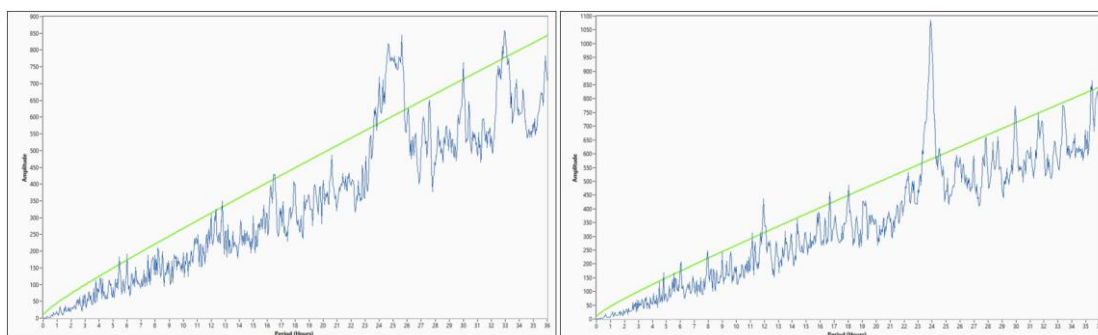
Perioda rytmů v pohybové aktivitě odpovídá periodě cirkadiánního oscilátoru v SCN. V režimu LD by se měla zvířata synchronizovat s nastaveným světelným režimem a jejich perioda by měla odpovídat 24 hodinovému světelnému cyklu. Během režimu DD přechází myši na tzv. volný běh a běží s tzv. endogenní cirkadiánní periodou Tau, která se může mírně lišit od periody světelného cyklu.

Naše výsledky ukazují, že na režimu LD jsou wt myši vskutku synchronizované k 24 hodinovému střídání světla a tmy, zatímco myši Lc vykazují periodu delší než 24 hodin ( $P = 0,0011$ , Obrázek 8) a velký rozptyl v rámci experimentální skupiny (Obrázek 8, Obrázek 9 a Obrázek 10).

Z horní a spodní části obrázku 10 je patrné, že zatímco wt myši se poměrně dobře synchronizují se světelným režimem, Lc myši se buď nesynchronizují (horní část Obrázek 10, vpravo) nebo jim adaptace na světelný režim trvá déle (dolní část Obrázek 10, vpravo).

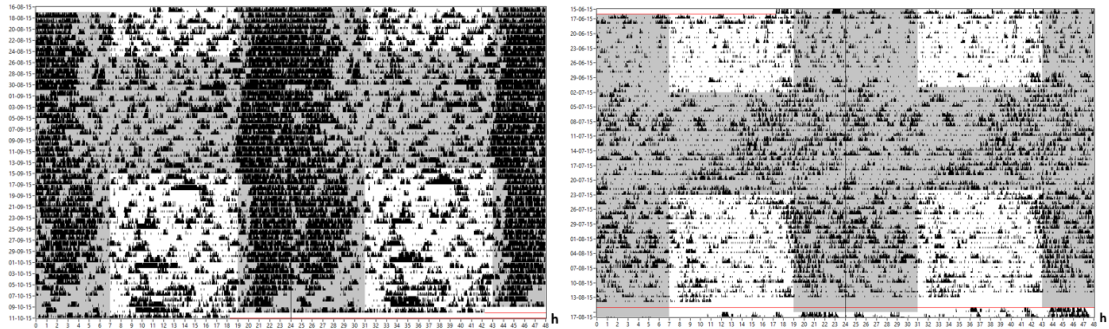


Obrázek 8: Délky periody v režimu LD. Wildtype jedinci se drží blízko 24 hodin (24,033 h) a skupina vykazuje malý rozptyl okolo této hodnoty. Lc myši mají průměrnou denní periodu delší (24,352 h) a mají větší rozptyl hodnot ve srovnání s kontrolní skupinou, ( $n = 12$ ;  $\pm$  S.E.M).



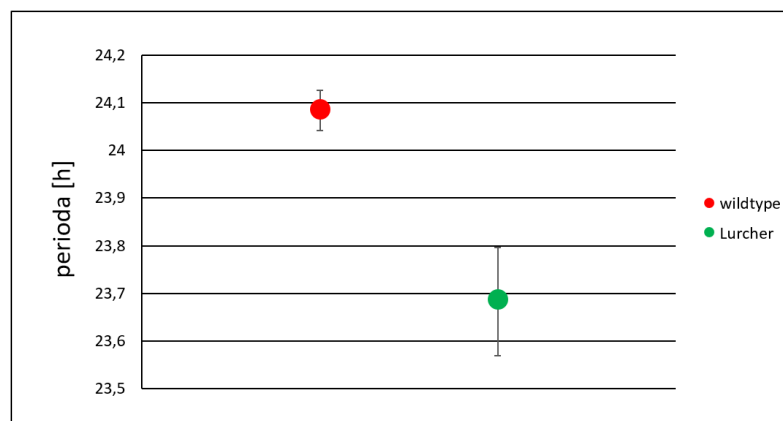
Obrázek 9: Ukázkový chi square periodogram Lc myši s nejdelší periodou ze skupiny při režimu LD v délce 25,6 h (vlevo) a s nejkratší periodou v délce 23,9 h (vpravo).



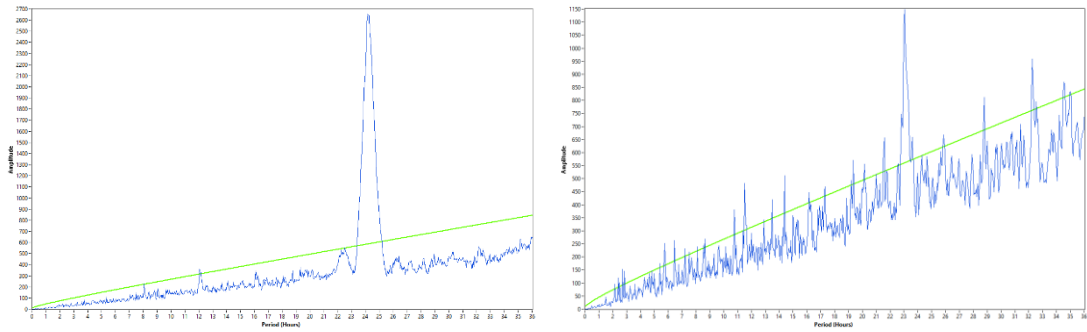


Obrázek 10: Ukázkové aktogramy se záznamem lokomoce wt myši (vlevo) a Lc myši (vpravo) ve dvojitém rozložení se záznamem světelných režimů (bílé pozadí značí světelnou fázi dne, šedé pozadí značí tmu). Při zahájení měření se wt myš rychle synchronizovala s nastaveným režimem LD. Po přechodu na režim DD se u zvířete ukazuje endogenní perioda, která má v tomto případě délku 23,95 h a zvíře se tak pouze nepatrně předbíhá vůči solárnímu dni. Při druhém nastavení režimu LD vidíme opět rychlé seřízení vůči vnějšímu prostředí. Ukázková Lc myš se v prvním režimu LD nebyla schopna synchronizovat s nastaveným světelným režimem. Při režimu DD se projevuje endogenní perioda, která je u tohoto zvířete zkrácena na 23,5 hodiny a dochází tak každý den k tzv. předbíhání oproti solárnímu dni. Při druhém LD režimu je synchronizace lepší, po přechodu na LD režim je ale patrné několik transienčních cyklů, než se ustanoví fáze aktivity podle světelného cyklu. Osa X z důvodů fixního nastavení programu Clocklab zobrazuje bod 0 jako 23. hodinu.

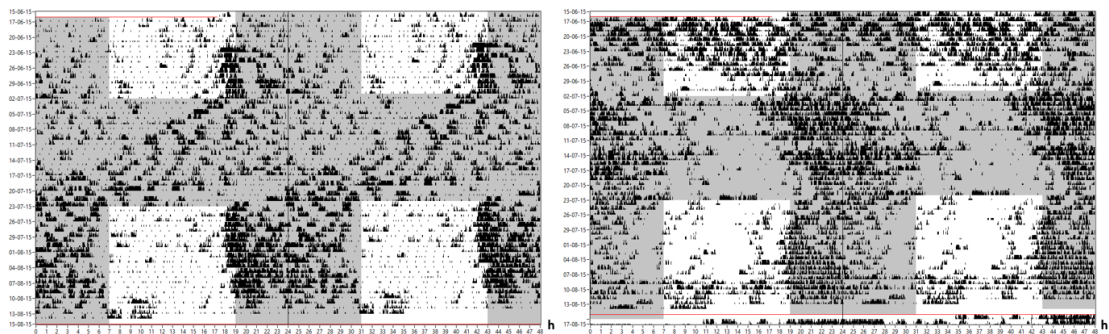
V režimu konstantní tmy přecházejí myši na svou vnitřní periodu. Ze záznamu tak můžeme vyčíst, jak dlouhá je jejich přirozená endogenní perioda daná samotným endogenním pacemakerem. Naše výsledky ukázaly, že endogenní perioda myši Lc je výrazně kratší než u wt jedinců ( $P = 0,0050$ , Obrázek 11). Podobně jako na LD, Lc myši vykazují velký rozptyl v rámci experimentální skupiny (Obrázek 11, Obrázek 12 a Obrázek 13).



Obrázek 11: Graf se záznamem délky periody v režimu DD. V režimu DD došlo u kontrolní skupiny k mírnému prodloužení periody (24,083 h), rozptyl kolem naměřené hodnoty zůstal malý. U Lc myši došlo v režimu DD ke zkrácení endogenní periody (23,683 h). Rozptyl hodnot je ve srovnání s kontrolní skupinou opět větší. (wt -  $n = 12$ ; Lc -  $n = 12$ )



Obrázek 12: Ukázkový Chi square periodogram Lc myši s nejdelší periodou ze skupiny při režimu DD v délce 24,15 h (vlevo) a s nejkratší periodou v délce 23,05 h (vpravo).



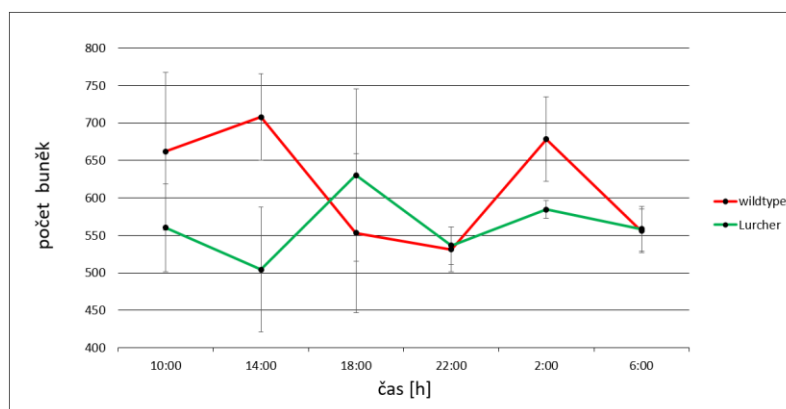
Obrázek 13: Ukázkové aktogramy se záznam lokomoce se zaměřením na režim DD (šedé pozadí). Vlevo záznam lokomoce Lc myši s nejkratší endogenní periodou (23,05 h). U zvířete dochází každý den k předbíhání vůči solárnímu dni. Vpravo záznam lokomoce Lc myši s nejdelší periodou (24,15 h). Zvíře se tak každý den opožďovalo vůči solárnímu dni. Osa X z důvodů fixního nastavení programu Clocklab zobrazuje bod 0 jako 23. hodinu.

### 7.3 Rytmus v hladině proteinů BMAL1, pERK1/2 a pGSK3 $\beta$

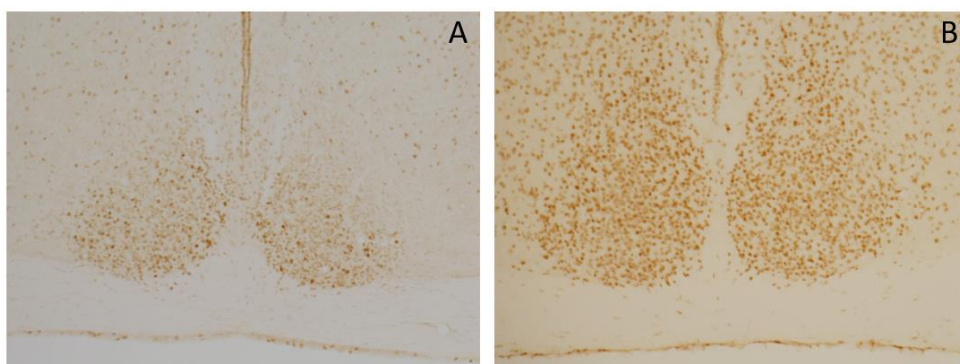
Metodou imunohistochemie jsme označili buňky syntetizující BMAL1, pERK1/2, pGSK3 $\beta$  a také PER1. Imunohistochemické zobrazení PER1 však nebylo kvalitní, značeny byly nespecificky téměř všechny buňky mozku bez ohledu na strukturní odlišnosti. Výsledky stanovení PER1 nejsou tedy součástí diplomové práce.

Hlavní strukturou, kterou jsme hodnotili, bylo SCN. Počet buněk, které produkovaly protein hodinového genu BMAL1 se lišil v průběhu 24 h cyklu u wt myši ( $P = 0,0267$ ), zatímco u myši Lc se statisticky neprokázala variabilita v čase ani one way ANOVA, ani kosinorovou analýzou ( $P = 0,8111$ ; Obrázek 14, Obrázek 15).



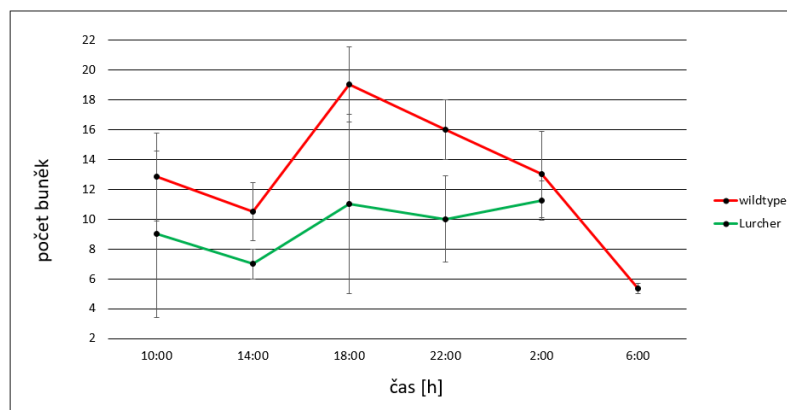


Obrázek 14: Cirkadiánní profil exprese proteinu *BMAL1* v suprachiasmatických jádrech. U wt skupiny byl naměřen signifikantní rytmus s nízkou hladinou v první polovině noci u Lc myši není hladina *BMAL1* signifikantně rytmická. (wt - n= 31; Lc - n= 26, ± S.E.M)

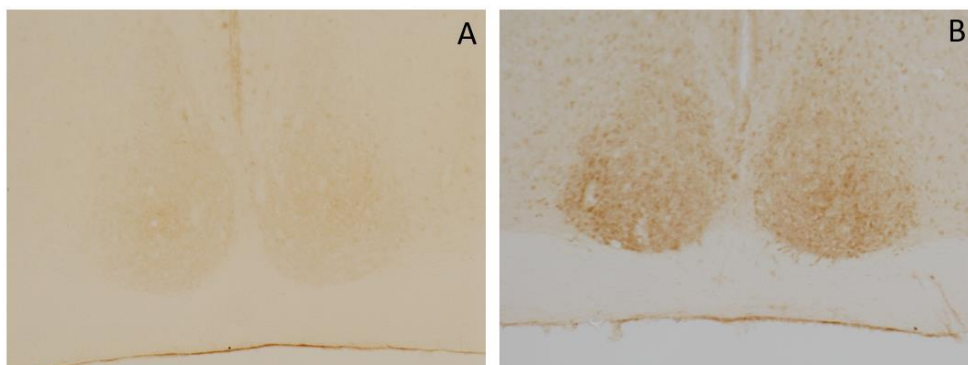


Obrázek 15: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu *BMAL1* v suprachiasmatických jádrech. (A) SCN Lc jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou *BMAL1*. (B) SCN kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou *BMAL1*.

Hladina fosforylované formy kinázy *GSK3β* se v SCN také rytmicky měnila v průběhu cirkadiánního cyklu u wt jedinců (P - 0,0335), ale nebyla rytmická u mutantů Lc (P - 0,9337; Obrázek 16, Obrázek 17).

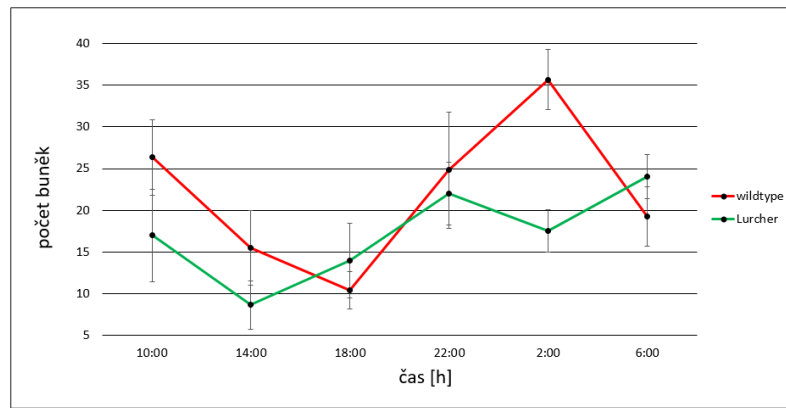


Obrázek 16: Cirkadiánní profil exprese proteinu pGSK3 $\beta$  v suprachiasmatických jádrech. U wt byl naměřen signifikantní rytmus s vysokou hladinou v první polovině noci u Lc myši není hladina pGSK3 $\beta$  signifikantně rytmická. (wt - n= 21; Lc - n= 15,  $\pm$  S.E.M)

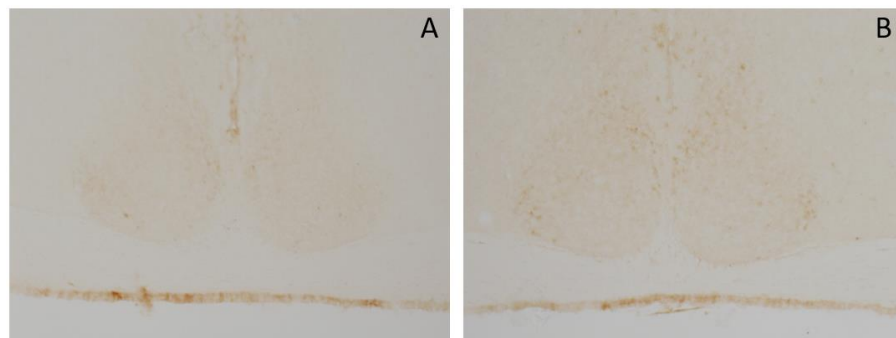


Obrázek 17: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu pGSK3 $\beta$  v suprachiasmatických jádrech. (A) SCN Lc jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou pGSK3 $\beta$ . (B) SCN kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou pGSK3 $\beta$ .

Forforylovaná forma kinázy ERK1/2 se rytmicky mění v SCN u myši wt (P - 0,0108), zatímco u myši Lc je patrná snížená amplituda a rytmus není signifikantní (P - 0,2202; Obrázek 18, Obrázek 19)

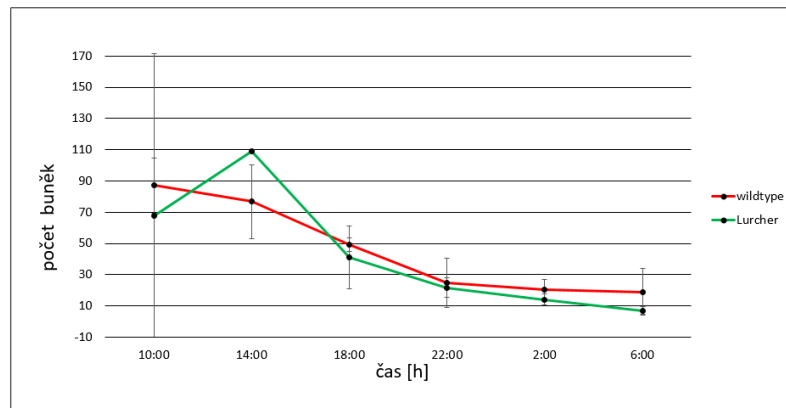


Obrázek 18: Cirkadiánní profil exprese proteinu pERK1/2 v suprachiasmatických jádrech. U wt byl naměřen signifikantní rytmus s nízkou hladinou v první polovině noci u Lc myši není hladina pERK1/2 signifikantně rytmická. (wt - n= 28; Lc - n= 25, ± S.E.M)

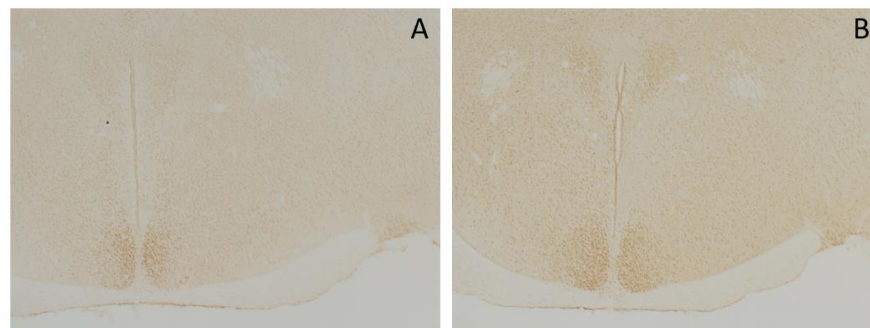


Obrázek 19: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu pERK1/2 v suprachiasmatických jádrech. (A) SCN Lc jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou pERK1/2. (B) SCN kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou pERK1/2.

Paraventriculární jádro hypothalamu je jedna z hlavních struktur, která převádí časové signály z SCN k regulaci autonomního nervového systému, endokrinním funkcím hypofýzy i produkci melatoninu epifýzou. PVN exprimuje rytmicky hodinové geny (Abe *et al.* 2002; Chun *et al.* 2015). Naše výsledky ukazují, že hladina proteinu BMAL1 se v PVN rytmicky mění u wt myši (P - 0,0498) ale ne u myši s Lc mutací (P - 0,3771, Obrázek 20, Obrázek 21). Je to dáno pravděpodobně velkými rozptyly mezi jedinci v jednom časovém bodě.

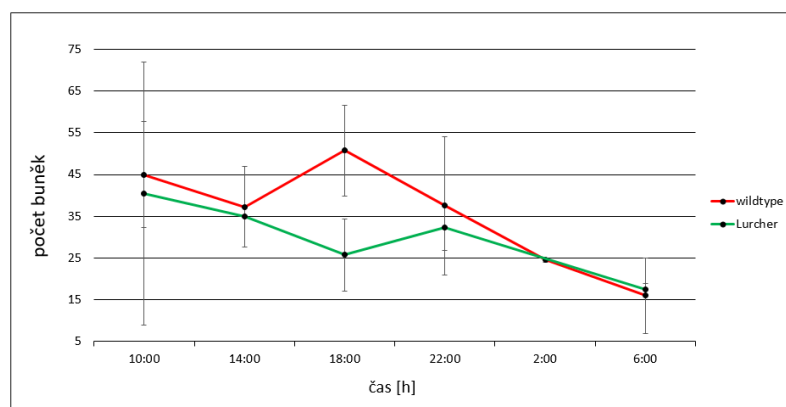


Obrázek 20: Cirkadiánní profil exprese proteinu *BMAL1* v paraventriculárních jádrech. U wt jedinců byl naměřen signifikantní rytmus s nízkou hladinou v noci u Lc myši není hladina *BMAL1* signifikantně rytmická. (wt - n= 19; Lc - n= 18, ± S.E.M)

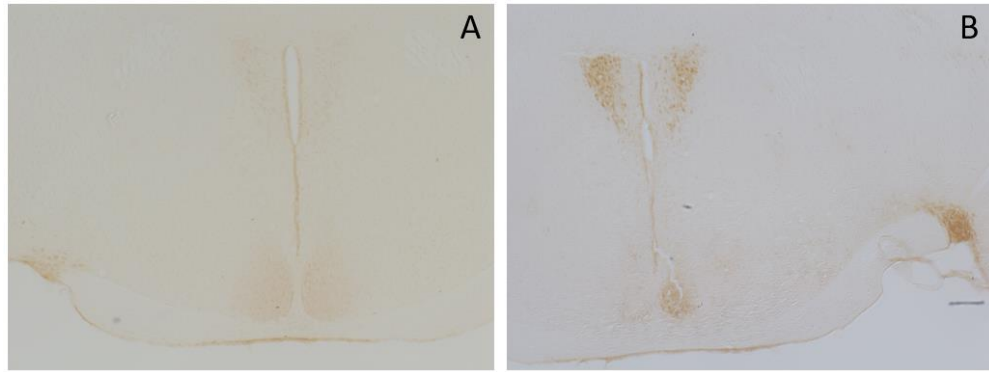


Obrázek 21: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu *BMAL1* v paraventriculárních jádrech. (A) PVN Lc jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou *BMAL1*. (B) PVN Lc jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou *BMAL1*.

Výsledky imunohistochemické detekce ukazují, že hladina proteinu *pGSK3β* se v PVN rytmicky mění u kontrolních myši (P - 0,4070). U Lc myši není rytmicita signifikantně prokazatelná (P - 0,4675; Obrázek 22, Obrázek 23).

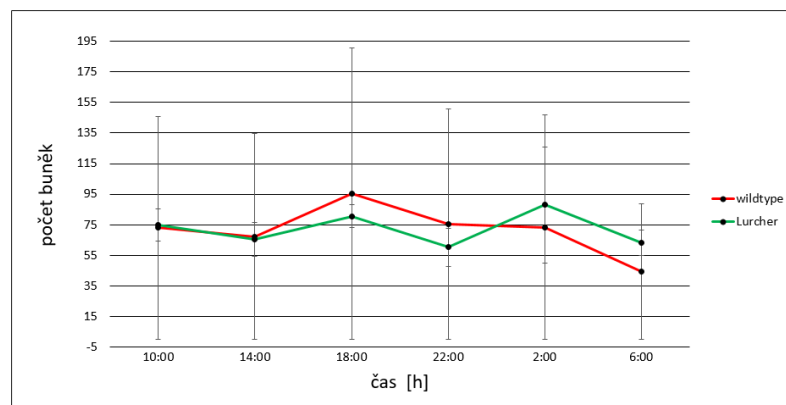


Obrázek 22: Cirkadiánní profil exprese proteinu *pGSK3β* v paraventriculárních jádrech. U wt jedinců byl naměřen signifikantní rytmus s vysokou hladinou v první polovině noci u Lc myši není hladina *pGSK3β* signifikantně rytmická. (wt - n= 17; Lc - n= 14, ± S.E.M)

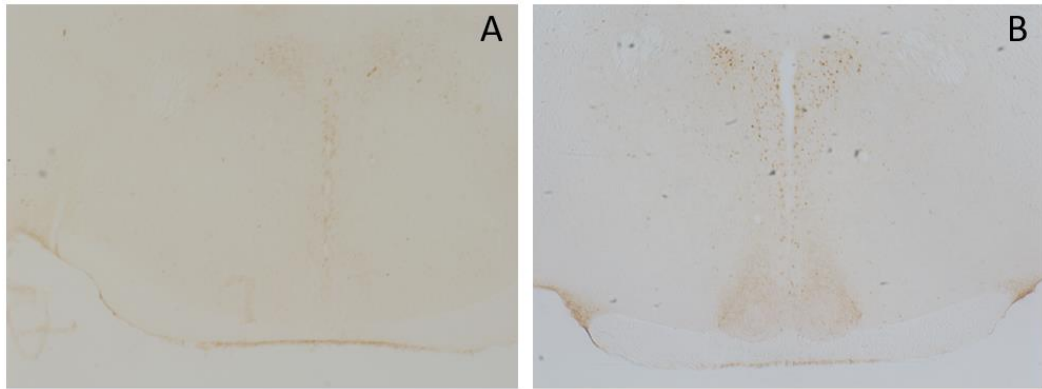


Obrázek 23: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu pGSK3 $\beta$  v paraventriculárních jádrech. (A) PVN kontrolního jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou pGSK3 $\beta$ . (B) PVN kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou pGSK3 $\beta$ .

Fosforylovaná forma proteinu ERK1/2 v paraventriculárních jádrech nevykazuje rytmus ani u kontrolní skupiny (P - 0,2266), ani u myši s mutací Lc (P - 0,6958; Obrázek 24, Obrázek 25).

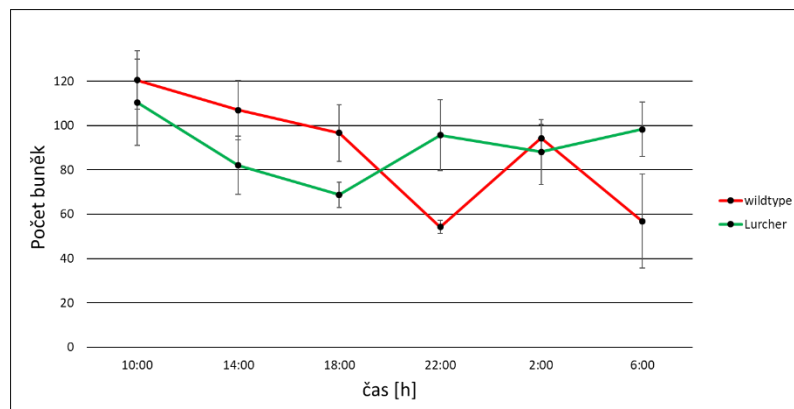


Obrázek 24: Cirkadiánní profil exprese proteinu pERK1/2 v paraventriculárních jádrech. Hladina pERK1/2 není signifikantně rytmická ani u wt jedinců ani u Lc myši. (wt - n= 26; Lc - n= 22,  $\pm$  S.E.M)

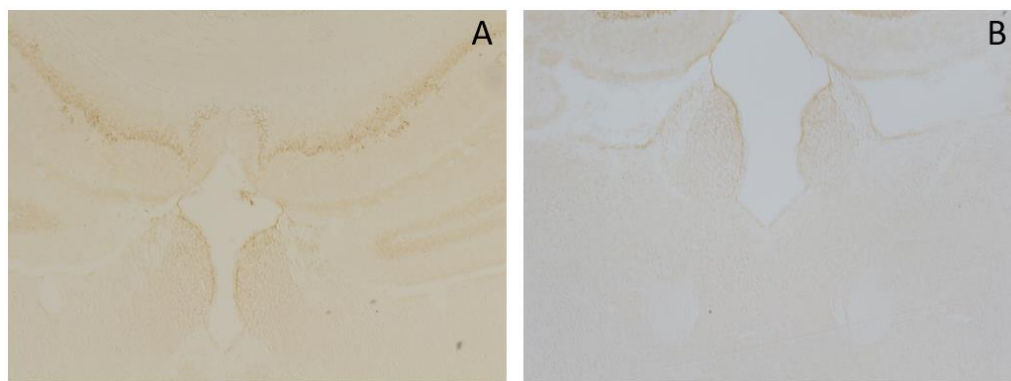


Obrázek 25: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu pERK1/2 v paraventriculárních jádrech. (A) PVN Lc jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou pERK1/2. (B) PVN kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou pERK1/2.

Laterální habenula byla nedávno identifikovaná jako tzv. semiautonomní oscilátor, tj. struktura částečně nezávislá na signálech z SCN. Habenula je aktivovaná nepříjemnými podněty, např. negativním podmiňováním a je možné, že její funkce je změněna v souvislosti s Lc mutací. V naší studii jsme nezaznamenali žádný imunohistochemický signál pro pGSK3 $\beta$  a pERK1/2. Proto jsme hodnotily pouze hladinu proteinu BMAL1. Výsledky ukazují, že wt myši mají signifikantní rytmus (P - 0,0106), zatímco Lc myši nesignifikantní (P - 0,4911; Obrázek 26, Obrázek 27).



Obrázek 26: Cirkadiánní profil exprese proteinu BMAL1 v habenule. U wt myši byl naměřen signifikantní rytmus s nízkou hladinou v noci u Lc myši není hladina BMAL1 signifikantně rytmická. (wt - n= 29; Lc - n= 22,  $\pm$  S.E.M)



*Obrázek 27: Ukázka imunohistochemické detekce proteinu BMAL1 v habenule. (A) habenula kontrolního jedince s nejnižší zaznamenanou hladinou BMAL1. (B) habenula kontrolního jedince s nejvyšší zaznamenanou hladinou proteinu BMAL1.*

## 8. Diskuze

Naše výsledky ukazují, že myši s degenerací Purkyňových buněk cerebella mají narušené cirkadiánní rytmy jak v lokomoční aktivitě, tak v samotném cirkadiánním pacemakeru v SCN, v PVN i semiautonomním oscilátoru - laterální habenule.

### 8.1 Rytmus v lokomoční aktivitě

Rytmus lokomoční aktivity je považován za marker integrity cirkadiánního systému. Začátek i konec aktivní fáze je regulován hlavním cirkadiánním pacemakerem, jehož perioda i fáze jsou synchronizované s vnějšími světlenými podmínkami. V režimu DD perioda i fáze pohybové aktivity odpovídá endogenní periodě volného běhu cirkadiánního pacemakeru v SCN. Časované podávání potravy přidává do cirkadiánního rozložení aktivity během dne ještě tzv. potravně anticipační aktivitu, která je do značné míry nezávislá na cirkadiánním pacemakeru. V aktogramu jsou potom patrné dvě časové složky záznamu, jedna je podmíněna rytmem podávání potravy a druhá cirkadiánním systémem.

Hlavním znakem dospělých myší s mutací Lurcher je ataxie, horší pohyblivost a nejistá chůze. Snížená míra pohybové aktivity vyjádřená pomocí Alfa, a zejména jako Total v režimu LD, pravděpodobně znamená, že ani v době plné aktivity se nedokáží myši Lc tak snadno pohybovat v prostoru klece. Nárůst Rho u Lc myší v režimu DD může být způsoben sníženou amplitudou rytmu v pohybové aktivitě. Totální aktivita myší Lc totiž není v režimu DD významně snížena, a postižené myši tedy vykazují spíše menší rozdíl v míře aktivity mezi dnem a nocí ve srovnání s kontrolními jedinci, u kterých je srovnání míry lokomoce v době světla a tmy více kontrastní.

Průměrná délka endogenní cirkadiánní periody měřená v DD je u většiny myších kmenů obvykle kratší než 24 hodin (Jud *et al.* 2005; Ripperger *et al.* 2011). V našem experimentu jsme však u našich kontrolních myší naměřili periodu, která je spíše rovna, nebo je mírně delší než 24 hodin. Mírně prodloužená perioda při režimu DD může být způsobena charakteristikou kmene a při srovnání s literaturou jsme opravdu zjistili, že kmen B6CBA má endogenní periodu spíše rovnou 24 hodinám, což se liší od ostatních kmenů (Schwartz a Zimmerman, 1990). Je zajímavé, že mutace Lurcher způsobila zkrácení průměrné endogenní periody na 23,7 hodiny, avšak rozptyl mezi periodami jednotlivců byl značný. To poukazuje na nedostatečnou synchronizaci zvířat v naší skupině, která může odrážet patologické změny v cirkadiánním pacemakeru.



Měření periody v režimu LD mělo za cíl potvrdit schopnost myši synchronizovat svůj pacemaker s vnějšími světelnými podmínkami. Myši by měly mít periodu v lokomoční aktivitě, která se rovná periodě světleného režimu. To se prokázalo u skupiny kontrolních myši, avšak myši Lc měly periodu výrazně delší než 24 hodin. Podobně jako na režimu LD u nich byly patrné velké individuální rozdíly. Ty mohou značit sníženou schopnost synchronizace s nastaveným režimem LD, a to i přesto, že sítnice oka Lc mutantů nenaznačovala žádné degenerativní změny. Jsme si vědomi toho, že pouhý histologický obraz integrity sítnice nestačí pro posouzení zrakových schopností mutantů. Na druhou stranu je známo, že k synchronizaci nočních hlodavců stačí velmi malá intenzita světla (Meijer *et al.*, 1986). Denní osvětlení naší skupiny se pohybovalo mezi 300-500 luxy, což mnohonásobně přesahuje intenzitu světla potřebnou k synchronizaci a mělo by stačit i v případě mírného narušení sítnice Lc mutantů.

Z aktogramů je možné vyčíst také nekvantifikovatelné rozdíly mezi wt a Lc myšmi. Po převedení do režimu DD například většina kontrolních jedinců zahájila volný běh s fází nastavenou předchozím světelným režimem, zatímco myši s mutací Lc v tomto režimu zahájili volný běh podle své endogenní periody náhodně, někdy dříve, někdy později než v době předchozího zhasnutí světla. Je možné, že to značí nedostatečně silnou vazbu mezi neurony v cirkadiálním pacemakeru, které nemohou udržet pevný fázový vztah mezi endogenním oscilátorem a zhasnutím světla. Je možné, že cirkadiální hodiny v cerebellu přispívají k udržení fázového úhlu konstitucí jakési „paměti“ na předchozí světelný režim. Cirkadiální signalizace vedoucí z kortexu cerebella do striata (Frederick *et al.*, 2014) může také specificky přispívat ke změnám v lokomoční aktivitě. Cerebellum řídící skrze striatum lokomoční aktivitu u myši s degenerovanou kortexovou vrstvou nemůže vysílat synchronizační signály. Striatum Lc myši tak nemusí dostatečně reagovat na signály z SCN a rytmus v pohybové aktivitě může být narušen nezávisle na hlavním cirkadiálním pacemakeru. Tato hypotéza je jedním z důvodů, proč jsme studovali cirkadiální oscilace u Lc mutantů v samotném SCN.

Při režimu RF byla potrava podávána pravidelně ve světlé části dne, tedy v době klidu, a to po dobu 6 hodin. Zvířata tak byla silně motivována přizpůsobit své chování době přístupu potravy a vytvořit tzv. anticipační chování, které doplňuje cirkadiální složku aktivity regulovanou cirkadiálním systémem. Zvýšená aktivita u kontrolních myši předcházející dobu krmení ukazovala jejich schopnost měřit čas pomocí podnětů periferních oscilátorů při současném zachování periody v hlavním řídicím oscilátoru SCN. Lurcher myši během režimu RF nevykazovaly potravně anticipační chování a žádným způsobem neměnily svoji

lokomoční aktivitu ani délku periody. Experiment musel být ukončen, neboť 6 hodinová doba přístupu k potravě byla příliš krátká, nestačila myším k dostatečnému nasycení a myši začaly hynout. V podobném experimentu s jiným animálním modelem cerebelární mutace byla prokázána role Purkyňových buněk v potravně anticipačním chování. Lc myši postrádající tyto buňky mají nejspíše také narušené potravně řízené oscilátory (Mendoza *et al.*, 2010). Naše i publikované nálezy tak naznačují, že cerebellum může být jednou z mozkových struktur, které formují anticipační chování, a může být součástí oscilátorového systému řízeného příjmem potravy. Nedávná studie ukázala přímé neuronální spojení mezi mediálním cerebellárním jádrem a ventromediálním jádrem hypotalamu, které řídí potravní chování (Li *et al.*, 2017). Je tedy možné, že k deregulaci potravně anticipačního chování dochází na úrovni právě této struktury.

## 8.2 Rytmická hladina proteinů BMAL1, pGSK3 $\beta$ a pERK1/2

V naší studii jsme se zaměřili především na sledování rytmických změn v hlavním cirkadiánním pacemakeru v SCN a také v PVN, hlavním hypotalamickém jádře, které převádí signály z SCN do neurálních a humorálních signálů k regulaci fyziologických procesů v organismu. Habenula byla nedávno označena jako samostatný cirkadiánní oscilátor nezávislý na signalizaci z SCN (Sakhi *et al.*, 2014; Guilding *et al.*, 2010) a zároveň je to struktura, která se účastní regulace motivačního chování (Paul *et al.*, 2011; Mendoza *et al.* 2017) a mohla by být důležitá pro potravně podmíněnou rytmicitu. Využili jsme silné exprese proteinu BMAL1 v habenule a zhodnotili jeho cirkadiánní rytmus u Lc myši jako příkladu změn v cirkadiánním systému limbických struktur.

Expresce proteinu hodinového genu BMAL1 byla v SCN u kontrolních jedinců nejnižší v období časně noci a byla významně rytmická. Studie monitorující pomocí bioluminiscence exprese mRNA *in vivo* popisuje nejvyšší hladinu mRNA genu *Bmal1* okolo 18 h (Ono *et al.*, 2015), stejné výsledky potvrzují i starší studie s jinými metodami (Habour *et al.*, 2014; Honma *et al.*, 1998). Rozdíl mezi hladinou mRNA a naším rytmem v proteinu je nejspíše způsoben zpožděním translace za transkripcí podobně jako je tomu u hodinového genu *Per* (Harbour *et al.*, 2014). U Lc myši se rytmicita v produkci proteinu neprokázala. Gen *Bmal1* společně s genem *Clock* jsou pilířem základní zpětnovazebné smyčky udržující cirkadiánní systém v chodu. Je tedy možné, že Lc mutanti tak mají poškozený základní mechanismus udržující cirkadiánní oscilace. Z aktografů je však zřejmé, že většina Lc myši vykazuje cirkadiánní rytmus, byť s různě dlouhou periodou. V této souvislosti je dobré zdůraznit, že rytmus exprese proteinu je v naší studii určován celou populací myši, kdy každý

časový bod tvoří momentální hladina exprese několika jedinců. Pokud jsou jedinci tvořící cirkadiánní profil sledovaných proteinů desynchronizováni mezi sebou, vykazují různě dlouhou periodu a fázi, i algebraický součet získaných hodnot netvoří koherentní rytmus. Tuto hypotézu podporují i značně velké rozptyly mezi zvířaty v jednotlivých časových bodech.

Fosforylace kinázy GSK3 $\beta$  v SCN vykazuje signifikantní rytmicitu v průběhu dne u kontrolních jedinců. Maximální hladina pGSK3 $\beta$  byla naměřena okolo 18. hodiny a pak po celou noc klesala na své minimum o dvanáct hodin později. Tento rytmus je přibližně o 3 hodiny předběhnut oproti rytmu pGSK3 $\beta$  v SCN potkanů (Pačesová *et al.*, 2015). Kináza GSK3 $\beta$  fosforyluje mCRY2, který je poté degradován v proteasomu. Je tedy důležitá k rytmické degradaci proteinů CRY2 v centrálním i periferních oscilátorech a pomáhá tak udržovat periodu zpětnovazebné smyčky (Kurabayashi *et al.*, 2006; Harada *et al.*, 2005). Další úlohou GSK3 $\beta$  je fosforylace PER2, který se tak může lépe translokovat do jádra (Iitaka *et al.*, 2005). GSK3 $\beta$  je aktivní v nefosforylované formě, fosforylací se její kinázová aktivita tlumí. Vysoká hladina aktivní formy v SCN v průběhu dne má pravděpodobně modulační účinky a tlumí aktivitu vznikajících proteinů CRY tak, aby jejich represivní funkce byla oddálena až do večerních hodin a transkripce genů závislá na aktivaci E-boxu mohla během dne pokračovat. V hladině pGSK3 $\beta$  nebyla exprese u Lc mutantů v SCN rytmická což může bezpochyby přispívat k větší variabilitě periody a špatné synchronizaci Lc mutantů.

Imunohistochemická detekce proteinu pERK1/2 v SCN ukázala jasný cirkadiánní rytmus u kontrolních jedinců. Nejvyšší naměřená hladina pERK1/2 byla okolo 2. hodiny ráno, nejmenší množství proteinu bylo detekováno v 18 hodin večer. To odpovídá rytmu pERK1/2 naměřenému v SCN potkanů (Pačesová *et al.*, 2015) i myši (Obrietan *et al.* 1998; Nakaya *et al.*, 2003). Lurcher mutantů oproti tomu mají sníženou amplitudu a rytmus není statisticky významný. ERK1/2 je důležitý modulátor molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin. Fosforyluje BMAL1 a přímo interaguje s CRY1 a CRY2, čímž usnadňuje represi funkce dimeru BMAL1:CLOCK (Sanada *et al.*, 2002; 2004). Světelný signál během noci spouští fosforylaci serinu a threoninu ERK1/2 ve vlSCN v řádech minut (Doi *et al.*, 2007). Při narušení této reakce ERK1/2 je porušena synchronizace cirkadiánních hodin (Butcher *et al.*, 2002). Konstantně snížené množství pERK1/2 u myši s mutací Lc tak může také přispívat ke zhoršené integritě cirkadiánního pacemakeru a popřípadě také ke snížené schopnosti synchronizace se světelným režimem.

PVN přijímají aferentní signál jak přímou cestou z SCN tak i nepřímou skrze dorsomediální hypothalamus (van der Horst *et al.*, 1986; Chou *et al.*, 2003). Kromě

cirkadiánní regulace syntézy glukokortikoidů v nadledvinách a sekrece melatoninu v epifyze zprostředkovávají PVN také cirkadiánní regulaci autonomního nervového systému, sympatiku a parasympatiku. Experimenty *in vitro* ukázaly, že cirkadiánní hodiny PVN jsou závislé na synchronizačním signálu z SCN a bez něj nedokáží oscilovat (Abe *et al.*, 2002). V souladu s tím jsme naměřili rytmickou expresi proteinu BMAL1 u kontrolních jedinců. Přestože se zdá, že rytmus BMAL1 u Lc mutantů v PVN je ještě zřetelnější než u wt myši, není staticky významný, a to zejména z důvodu velkých rozptylů mezi hodnotami tvořícími jednotlivé časové body. Podobně také rytmus BMAL1 v laterální habenule je prokazatelný u wt myši, ale nevýznamný u mutantů Lurcher.

Kinázy GSK3 $\beta$  a ERK1/2 nevykazují v PVN signifikantní cirkadiánní rytmus ve fosforylaci ani u wt ani u Lc myši. Zdá se tedy, že jejich fosforylace není regulována z SCN, což je v souladu s předchozími studii na potkanech. Kinázy v PVN jsou nejspíše regulovány strukturně specifickými signály, jako hladinou glukózy (Gorton *et al.*, 2007).

Naše výsledky ukazují, že cerebelární mutace Lurcher vede k významnému narušení cirkadiánního systému postižených myši. Zdravé myši mají synchronizovanou aktivitu s vnějším světelným režimem, velmi podobnou periodu volného běhu v rámci studované populační skupiny a nenarušený molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací ve všech měřených strukturách testovaný na příkladu proteinu hodinového genu BMAL1. Myši wt mají také cirkadiánní rytmus ve fosforylaci kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  v SCN, který odpovídá dříve publikovaným datům. Myši s mutací Lurcher vykazovaly velké variability v délce periody jak v režimu střídání světla a tmy, tak v režimu stálého světla a měly narušené cirkadiánní rytmy v hladině proteinu BMAL1 ve všech studovaných strukturách a v hladině pERK1/2 a pGSK3 $\beta$  v SCN. Naše studie nám nedovoluje říct, jestli ke změně dochází na úrovni molekulárního mechanismu, protože jsme nestudovali změny v oscilacích hodinových genů či jejich proteinů v jednotlivcích, ale v celé populaci zvířat. Protože však narušení molekulárních hodin znamená obvykle ztrátu celkové rytmicity, kterou u Lc mutantů nepozorujeme, je pravděpodobnější vysvětlení, že Lc mutace narušuje vzájemnou synchronizaci mezi buněčnými oscilátory v SCN, která je závislá na VIP a GABAergní signalizaci (Aton *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2018). Může také narušovat serotonergní inervace SCN (Le Marec *et al.*, 1998), která je důležitá pro udržení odlišného nastavení cirkadiánního pacemakeru mezi subjektivním dnem a nocí.

Studie na pacientech s cerebelární lézí ukázaly, že kromě motorických a kognitivních změn mají tito pacienti narušené tzv. intervalové časování, tj. schopnost odhadovat krátké

časové intervaly (Gooch *et al.*, 2009), která může být daná předchozím učením cerebelárních neuronálních okruhů (Jirenhed *et al.*, 2017). Naše práce naznačuje, že cerebellum může přispívat i k udržování delších časových intervalů, než je několik vteřin a napomáhat cirkadiánnímu pacemakeru regulovat časové změny v organismu, které probíhají s cirkadiánní periodou.

## 9. Závěr

Touto diplomovou prací jsme se pokusili otestovat vliv cerebella na cirkadiánní systém. Ukázali jsme, že myši s degenerovými Purkyňovými buňkami mají narušené rytmy v pohybové aktivitě a expresi proteinu BMAL1 v hlavním cirkadiánním oscilátoru SCN, v PVN a habenule. Exprese genu *Bmal1* tvoří základ zpětnovazebné smyčky hodinových genů, která podmiňuje vznik a udržování cirkadiánní rytmicity. Hladiny fosforylovaných kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  podílejících se na udržení cirkadiánní periody také postrádaly rytmicitu ve struktuře SCN. Postižené myši také vykazovaly velkou diverzitu v délce endogenní periody měřené na rytmu lokomoční aktivity a sníženou schopnost synchronizace se světelným režimem. Při režimu časově omezeného podávání potravy nebyly Lc myši schopny přizpůsobit svou aktivitu nastaveným podmínkám přístupu potravy.

Získané poznatky naznačují, že cerebellum může ovlivňovat cirkadiánní systém, a cerebelární degenerace tak mohou být doprovázeny i poruchami synchronizace fyziologických funkcí organismu. To může zhoršovat příznaky potíží pacientů s postižením mozečku.

## 10. Použitá literatura

Abe M., Herzog E. D., Yamazaki S., Straume M., Tei H., Sakaki Y., Menaker M., Block G. D. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci.* 2002; 22(1):350-6.

Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(6):1693-703.

Al-Ghoul W. M., Herman M. D., Dubocovich M. L. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport.* 1998; 9(18):4063-8.

Albrecht U., Sun Z. S., Eichele G., Lee C. C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell.* 1997; 91(7):1055-64.

Apps R., Garwicz M. Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(4):297-311.

Araki K., Meguro H., Kushiya E., Takayama C., Inoue Y., Mishina M. Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197(3):1267-76.

Aton S. J., Colwell C. S., Harmar A. J., Waschek J., Herzog E. D. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.* 2005; 8(4):476-83.

Atkinson S. E., Maywood E. S., Chesham J. E., Wozny C., Colwell C. S., Hastings M. H., Williams S. R. Cyclic AMP signaling control of action potential firing rate and molecular circadian pacemaking in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 2011; 26(3):210-20.

Bering T., Carstensen M. B., Rath M. F. Deleting the *Arntl* clock gene in the granular layer of the mouse cerebellum: impact on the molecular circadian clockwork. *J Neurochem.* 2017.

Brancaccio M., Patton A. P., Chesham J. E., Maywood E. S., Hastings M. H. Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*. 2017; 93(6):1420-1435.

Busino L., Bassermann F., Maiolica A., Lee C., Nolan P. M., Godinho S. I., Draetta G. F., Pagano M. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science*. 2007; 316(5826):900-4.

Butcher G. Q., Doner J., Dziema H., Collamore M., Burgoon P. W., Obrietan K. The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem*. 2002; 277(33):29519-25.

Caddy K. W., Biscoe T. J. Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1979; 287(1020):167-201.

Carneiro B. T., Araujo J. F. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int*. 2009; 26(7):1273-89.

Carter D. A., Murphy D. Nuclear mechanisms mediate rhythmic changes in vasopressin mRNA expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992; 12(4):315-21.

Castel M., Belenky M., Cohen S., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 1993; 5(4):368-81.

Cendelín J., Voller J., Vozeh F. Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behav Brain Res*. 2010; 210(1):8-15.

Cerminara N. L., Lang E. J., Sillitoe R. V., Apps R. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16(2):79-93.



Crumbley C., Wang Y., Kojetin D. J., Burris T.P. Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB $\alpha$ /ROR $\alpha$  target gene. *J Biol Chem.* 2010; 285(46):35386-92.

DeBruyne J. P., Weaver D. R., Reppert S. M. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci.* 2007; 10(5):543-5.

Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell.* 2006; 125(3):497-508.

Doi M., Cho S., Yujnovsky I., Hirayama J., Cermakian N., Cato A. C., Sassone-Corsi P. Light-inducible and clock-controlled expression of MAP kinase phosphatase 1 in mouse central pacemaker neurons. *J Biol Rhythms.* 2007; 22(2):127-39.

Dumesnil-Bousez N., Sotelo C. Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J Neurocytol.* 1992; 21(7):506-29.

Dunlap J. C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 1999; 96(2):271-90.

Eccles J. C., Llinás R., Sasaki K. The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *J Physiol.* 1966; 182(2):268-96.

Eide E. J., Vielhaber E. L., Hinz W. A., Virshup D. M. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I $\epsilon$ . *J Biol Chem.* 2002; 277(19):17248-54.

Eide E. J., Woolf M. F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E. L., Giovanni A., Virshup D. M. Control of mammalian circadian rhythm by CKI $\epsilon$ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(7):2795-807.

Emery P., Reppert S. M. A rhythmic Ror. *Neuron.* 2004; 43(4):443-6.

Etchegaray J. P., Lee C., Wade P. A., Reppert S. M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature.* 2003; 421(6919):177-82.

Etchegaray J. P., Yu E. A., Indic P., Dallmann R., Weaver D. R. Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10303.

Field M. D., Maywood E. S., O'Brien J. A., Weaver D. R., Reppert S. M., Hastings M. H. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*. 2000; 25(2):437-47.

Frederick A., Bourget-Murray J., Chapman C. A., Amir S., Courtemanche R. Diurnal influences on electrophysiological oscillations and coupling in the dorsal striatum and cerebellar cortex of the anesthetized rat. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2014; 8:145.

Gau D., Lemberger T., von Gall C., Kretz O., Le Minh N., Gass P., Schmid W., Schibler U-, Korf H. W., Schütz G. Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron*. 2002; 34(2):245-53.

Gekakis N., Staknis D., Nguyen H. B., Davis F. C., Wilsbacher L. D., King D. P., Takahashi J. S., Weitz C. J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998; 280(5369):1564-9.

Golombek D. A., Rosenstein R. E. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*. 2010; 90(3):1063-102.

Golombek D. A., Bussi I. L., Agostino P. V. Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 369(1637):20120465.

Gorton L. M., Khan A. M., Bohland M., Sanchez-Watts G., Donovan C. M., Watts A. G. A role for the forebrain in mediating time-of-day differences in glucocorticoid counterregulatory responses to hypoglycemia in rats. *Endocrinology*. 2007; 148(12):6026-39.

Gooch C. M., Wiener M., Wencil E. B., Coslett H. B. Interval timing disruptions in subjects with cerebellar lesions. *Neuropsychologia*. 2010; 48(4):1022-31.

Griffin E. A. Jr., Staknis D., Weitz C. J. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*. 1999; 286(5440):768-71.

Guilding C., Hughes A. T., Piggins H. D. Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience*. 2010; 169(4):1630-9.

Guillaumond F., Dardente H., Giguère V., Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005; 20(5):391-403.

Harada Y., Sakai M., Kurabayashi N., Hirota T., Fukada Y. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem*. 2005; 280(36):31714-21.

Harbour V. L., Weigl Y., Robinson B., Amir S. Phase differences in expression of circadian clock genes in the central nucleus of the amygdala, dentate gyrus, and suprachiasmatic nucleus in the rat. *PLoS One*. 2014; 9(7):e103309.

Haines D. E., May P. J., Dietrichs E. Neuronal connections between the cerebellar nuclei and hypothalamus in *Macaca fascicularis*: cerebello-visceral circuits. *J Comp Neurol*. 1990; 299(1):106-22.

Haines D. E., Dietrichs E., Mihailoff G. A., McDonald E. F. The cerebellar-hypothalamic axis: basic circuits and clinical observations. *Int Rev Neurobiol*. 1997; 41:83-107.

Hannibal J., Møller M., Ottersen O. P., Fahrenkrug J. PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol*. 2000; 418(2):147-55.

Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 2002; 309(1):73-88.

Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*. 2009; 3:31.

Herzog E. D., Aton S. J., Numano R., Sakaki Y., Tei H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J Biol Rhythms*. 2004; 19(1):35-46.

Hilber P., Jouen F., Delhay-Bouchaud N., Mariani J., Caston J. Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Behav Genet*. 1998; 28(4):299-308.

Hilber P., Caston J. Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. *Neuroscience*. 2001; 102(3):615-23.

Hirai H., Pang Z., Bao D., Miyazaki T., Li L., Miura E., Parris J., Rong Y., Watanabe M., Yuzaki M., Morgan J. I. *Cbln1* is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci*. 2005; 8(11):1534-41.

Hirayama J., Sahar S., Grimaldi B., Tamaru T., Takamatsu K., Nakahata Y., Sassone-Corsi P. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*. 2007; 450(7172):1086-90.

Honma S., Ikeda M., Abe H., Tanahashi Y., Namihira M., Honma K., Nomura M. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene *Clock*, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 250(1):83-7.

van der Horst G. J., Luiten P. G. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull*. 1986; 16(2):231-48.

Challet E., Scarbrough K., Penev P. D., Turek F. W. Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J Biol Rhythms*. 1998; 13(5):410-21.

Chen D., Buchanan G. F., Ding J. M., Hannibal J., Gillette M. U. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(23):13468-73.

Chou T. C., Scammell T. E., Gooley J. J., Gaus S. E., Saper C. B., Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci.* 2003; 23(33):10691-702.

Imbesi M., Uz T., Manev H. Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *J Neural Transm (Vienna).* 2008; 115(11):1495-9.

Ingram C. D., Ciobanu R., Coculescu I. L., Tanasescu R., Coculescu M., Mihai R. Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res.* 1998; 119:351-64.

Inouye S. T., Kawamura H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(11):5962-6.

Iitaka C., Miyazaki K., Akaike T., Ishida N. A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem.* 2005; 280(33):29397-402.

Jacobs G. H., Neitz J., Deegan J. F. 2nd. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature.* 1991; 353(6345):655-6.

Janssen B. J., Tyssen C. M. , Duindam H., Rietveld W. J. Suprachiasmatic lesions eliminate 24-h blood pressure variability in rats. *Physiol Behav.* 1994; 55(2):307-11.

Jirenhed D. A., Rasmussen A., Johansson F., Hesslow G. Learned response sequences in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114(23):6127-6132.

Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(2):271-7.

Kohda K., Wang Y., Yuzaki M. Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nat Neurosci.* 2000; 3(4):315-22.

- Kohda K., Kamiya Y., Matsuda S., Kato K., Umemori H., Yuzaki M. Heteromer formation of delta2 glutamate receptors with AMPA or kainate receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003; 110(1):27-37.
- Kornhauser J. M., Nelson D. E., Mayo K. E., Takahashi J. S. Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science*. 1992; 255(5051):1581-4.
- Kume K., Zylka M. J., Sriram S, Shearman L. P., Weaver D. R., Jin X, Maywood E. S., Hastings M. H., Reppert S. M. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 1999; 98(2):193-205.
- Kurabayashi N., Hirota T., Harada Y., Sakai M., Fukada Y. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiol Int*. 2006; 23(1-2):129-34.
- Lax P. Melatonin inhibits nicotinic currents in cultured rat cerebellar granule neurons. *J Pineal Res*. 2008; 44(1):70-7.
- Leak R. K., Moore R. Y. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol*. 2001; 433(3):312-34.
- Lehman M. N., Silver R., Gladstone W. R., Kahn R. M., Gibson M., Bittman E. L. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*. 1987; 7(6):1626-38.
- Li B., Zhuang Q. X., Gao H. R., Wang J. J., Zhu J. N. Medial cerebellar nucleus projects to feeding-related neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Struct Funct*. 2017; 222(2):957-971.
- Liu L. Y., Hoffman G. E., Fei X. W., Li Z., Zhang Z. H., Mei Y. A. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current mediates the migration of rat cerebellar granule cells stimulated by melatonin. *J Neurochem*. 2007; 102(2):333-44.

Liu A. C., Welsh D. K., Ko C. H., Tran H. G., Zhang E. E., Priest A. A., Buhr E. D., Singer O., Meeker K., Verma I. M., Doyle F. J. 3rd, Takahashi J. S., Kay S. A. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*. 2007; 129(3):605-16.

Lomeli H., Sprengel R., Laurie D. J., Köhr G., Herb A., Seeburg P. H., Wisden W. The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett*. 1993; 315(3):318-22.

Lorivel T., Roy V., Hilber P. Fear-related behaviors in Lurcher mutant mice exposed to a predator. *Genes Brain Behav*. 2014; 13(8):794-801.

Lowrey P. L., Takahashi J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004; 5:407-41.

Le Marec N., Caston J., Lalonde R. Impaired motor skills on static and mobile beams in lurcher mutant mice. *Exp Brain Res*. 1997; 116(1):131-8.

Le Marec N., Hébert C., Amdiss F., Botez M. I., Reader T. A. Regional distribution of 5-HT transporters in the brain of wild type and 'Purkinje cell degeneration' mutant mice: a quantitative autoradiographic study with [3H]citalopram. *J Chem Neuroanat*. 1998; 15(3):155-71.

Markus R. P., Santos J. M., Zago W., Reno L. A. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H]glutamate release in rat cerebellum slices. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(2):525-30.

Maile I. L., Sidman R. L. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*. 1961; 4:277-96.

Mason R., Harrington M. E., Rusak B. Electrophysiological responses of hamster suprachiasmatic neurones to neuropeptide Y in the hypothalamic slice preparation. *Neurosci Lett*. 1987; 80(2):173-9.

McKay B. E., Turner R. W. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol.* 2005; 567(3):829-50.

Meijer J. H., Groos G. A., Rusak B. Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 1986; 382(1):109-18.

Mendoza J., Pévet P., Felder-Schmittbuhl M. P., Bailly Y., Challet E. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci.* 2010; 30(5):1894-904.

Mendoza J. Circadian neurons in the lateral habenula: Clocking motivated behaviors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2017; 162:55-61.

Moore R. Y., Lenn N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.* 1972; 146(1):1-14.

Moore R. Y., Card J. P. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol.* 1994; 344(3):403-30.

Moore R. Y., Speh J. C., Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 2002; 309(1):89-98.

Mordel J., Karnas D., Pévet P., Isope P., Challet E., Meissl H. The output signal of Purkinje cells of the cerebellum and circadian rhythmicity. *PLoS One.* 2013; 8(3):e58457.

Morin L. P., Blanchard J. H. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol.* 2001; 437(1):79-90.

Nakaya M., Sanada K., Fukada Y. Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3):494-501.

Nielsen H. S., Hannibal J., Knudsen S. M., Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces period1 and period2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience.* 2001; 103(2):433-41.



Nishiyama J., Matsuda K., Kakegawa W., Yamada N., Motohashi J., Mizushima N., Yuzaki M. Reevaluation of neurodegeneration in lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. *J Neurosci.* 2010; 30(6):2177-87.

Norman D. J., Feng L., Cheng S. S., Gubbay J., Chan E., Heintz N. The lurcher gene induces apoptotic death in cerebellar Purkinje cells. *Development.* 1995; 121(4):1183-93.

Obrietan K., Impey S., Storm D. R. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci.* 1998; 1(8):693-700.

O'Neill J. S., Reddy A. B. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature.* 2011; 469(7331):498-503.

Ono D., Honma K., Honma S. Circadian and ultradian rhythms of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. *Sci Rep.* 2015; 5:12310.

Ono D., Honma K. I., Yanagawa Y., Yamanaka A., Honma S. Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. *J Physiol Sci.* 2018.

Pačesová D., Volfová B., Červená K., Hejnová L., Novotný J., Bendová Z. Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 $\beta$  kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(14):3638-49.

Patton D. F., Katsuyama A. M., Pavlovski I., Michalik M., Patterson Z., Parfyonov M., Smit A. N., Marchant E. G., Chung S. H., Abizaid A., Storch K. F., de la Iglesia H., Mistlberger R. E. Circadian mechanisms of food anticipatory rhythms in rats fed once or twice daily: clock gene and endocrine correlates. *PLoS One.* 2014; 9(12):e112451.

Paul M. J., Indic P., Schwartz W. J. A role for the habenula in the regulation of locomotor activity cycles. *Eur J Neurosci.* 2011; 34(3):478-88.

Phillips, R. J. S. "Lurcher", a new gene in linkage group XI of the house mouse. *Journal of Genetics.* 1960; 57(1), pp. 35-42.

van den Pol A. N., Tsujimoto K. L. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 1985; 15(4):1049-86.

Porrás-García E., Cendelin J., Domínguez-del-Toro E., Vozeh F., Delgado-García J. M. Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *Eur J Neurosci*. 2005; 21(4):979-88.

Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002; 110(2):251-60.

Prolo L. M., Takahashi J. S., Herzog E.D. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J Neurosci*. 2005; 25(2):404-8.

Provencio I., Rodríguez I. R., Jiang G., Hayes W. P., Moreira E. F., Rollag M. D. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. 2000; 20(2):600-5.

Qiu X., Kumbalasiri T., Carlson S. M., Wong K. Y., Krishna V., Provencio I, Berson D. M. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*. 2005; 433(7027):745-9.

Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C., Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990; 247(4945):975-8.

Rath M. F., Rohde K., Møller M. Circadian oscillations of molecular clock components in the cerebellar cortex of the rat. *Chronobiol Int*. 2012; 29(10):1289-99.

Rath M. F., Rohde K., Fahrenkrug J., Møller M. Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. *Brain Struct Funct*. 2013; 218(2):551-62.

- Rath M. F., Rovsing L., Møller M. Circadian oscillators in the mouse brain: molecular clock components in the neocortex and cerebellar cortex. *Cell Tissue Res.* 2014; 357(3):743-55.
- Reghunandanan V., Reghunandanan R., Mahajan K. K. Arginine vasopressin as a neurotransmitter in brain. *Indian J Exp Biol.* 1998; 36(7):635-43.
- Reppert S. M., Weaver D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63:647-76.
- Roostaei T., Nazeri A., Sahraian M. A., Minagar A. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin.* 2014; 32(4):859-69.
- Rossi M. A., Calakos N., Yin H. H. Spotlight on movement disorders: What optogenetics has to offer. *Mov Disord.* 2015; 30(5):624-31.
- Sakhi K., Belle M. D., Gossan N., Delagrange P., Piggins H. D. Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J Physiol.* 2014; 592(4):587-603.
- Sanada K., Okano T., Fukada Y. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem.* 2002; 277(1):267-71.
- Sanada K., Harada Y., Sakai M., Todo T., Fukada Y. Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells.* 2004; 9(8):697-708.
- Sato T. K., Panda S., Miraglia L. J., Reyes T. M., Rudic R. D., McNamara P., Naik K. A., FitzGerald G. A., Kay S. A., Hogenesch J. B. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 2004; 43(4):527-37.
- Shearman L. P., Zylka M. J., Weaver D. R., Kolakowski L. F. Jr., Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron.* 1997; 19(6):1261-9.

Shearman L. P., Sriram S., Weaver D. R., Maywood E. S. , Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee C. C. , van der Horst G. T., Hastings M. H., Reppert S. M. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. 2000; 288(5468):1013-9.

Shinohara K., Tominaga K., Fukuhara C., Otori Y., Inouye S. I. Processing of photic information within the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate body: assessed by neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroscience*. 1993; 56(4):813-22.

Schmutz I., Ripperger J. A., Baeriswyl-Aebischer S., Albrecht U. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev*. 2010; 24(4):345-57.

Schwartz W. J., Zimmerman P. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci*. 1990; 10(11):3685-94.

Siepkha S. M., Yoo S. H., Park J., Lee C., Takahashi JS. Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007; 72:251-259.

Stephan F. K., Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972; 69(6):1583-6.

Takahata S., Sogawa K., Kobayashi A., Ema M., Mimura J., Ozaki N., Fujii-Kuriyama Y. Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 248(3):789-94.

Takayama C., Nakagawa S., Watanabe M., Mishina M., Inoue Y. Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in the mouse Purkinje cell. *Neurosci Lett*. 1995; 188(2):89-92.

Takeda Y., Jothi R., Birault V., Jetten A. M. ROR $\gamma$  directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(17):8519-35.

Tamada Y., Tanaka M., Munekawa K., Hayashi S., Okamura H., Kubo T., Hisa Y., Ibata Y. Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Res Bull.* 1998; 45(3):281-7.

Thullier F., Lalonde R., Cousin X., Lestienne F. Neurobehavioral evaluation of lurcher mutant mice during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997; 100(1):22-8.

Tischkau S. A., Mitchell J. W., Tyan S. H., Buchanan G. F., Gillette M. U. Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem.* 2003 ;278(2):718-23.

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

Tuma J., Kolinko Y., Vozeh F., Cendelin J. Mutation-related differences in exploratory, spatial, and depressive-like behavior in pcd and Lurcher cerebellar mutant mice. *Front Behav Neurosci.* 2015; 9:116.

Uzmann L. L. The histogenesis of the mouse cerebellum as studied by its tritiated thymidine uptake. *J Comp Neurol.* 1960; 114:137-59.

Vernet-der Garabedian B., Lemaigre-Dubreuil Y., Delhay-Bouchaud N., Mariani J. Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 62(2):224-7.

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

Vitaterna M. H., Selby C. P., Todo T., Niwa H., Thompson C., Fruechte E. M., Hitomi K., Thresher R. J., Ishikawa T., Miyazaki J., Takahashi J. S., Sancar A. Differential regulation of

mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(21):12114-9.

Welsh D. K., Logothetis D. E., Meister M., Reppert S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 1995; 14(4):697-706.

Yue Z., Horton A., Bravin M., DeJager P. L., Selimi F., Heintz N. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in *lurcher* mice. *Neuron*. 2002; 35(5):921-33.

Yuzaki M. The delta2 glutamate receptor: 10 years later. *Neurosci Res*. 2003; 46(1):11-22.

Zhang Y., Li H., Pu Y., Gong S., Liu C., Jiang X., Tao J. Melatonin-mediated inhibition of Purkinje neuron P-type  $Ca^{2+}$  channels in vitro induces neuronal hyperexcitability through the phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein kinase C delta pathway. *J Pineal Res*. 2015; 58(3):321-34.

Zuo J., De Jager P. L., Takahashi K. A., Jiang W., Linden D. J., Heintz N. Neurodegeneration in *Lurcher* mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature*. 1997; 388(6644):769-73.

Zylka M. J., Shearman L. P., Weaver D. R., Reppert S. M. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 1998; 20(6):1103-10.

### **Internetové zdroje:**

<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:95813> - data ze dne 15.4. 2018