

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: B-MOBIBO



Adéla Knapová

Časná ontogeneze buněčných cirkadiánních hodin

Early ontogeny of the cell's circadian clock

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, 20. 4. 2024

Podpis:

Adéla Knapová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Prof. PharmDr. Aleně Sumové, CSc., DSc. za odborné vedení práce, cenné rady, velikou trpělivost a ochotu. Také děkuji své matce, která mi byla velkou oporou nejen při psaní, ale i během celého studia.

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na vývoj a funkci cirkadiálního systému, který reguluje biologické procesy v organismu podle cyklu 24 hodin. V úvodu je představen cirkadiální systém a jeho klíčové složky, včetně suprachiasmatických jader hypotalamu a periferních oscilátorů. Je zde i zmíněn molekulární chod cirkadiálních hodin, který je ovlivněn dvěma smyčkami. Hlavním tématem je ontogeneze cirkadiálních hodin, ke které dochází autonomně během buněčné diferenciace embryonálních kmenových buněk. Tento proces je ovlivněn různými faktory, jako jsou ultradiální rytmy segmentačních hodin a vliv mateřských faktorů. Ne všechny signály jsou však pro vývoj těchto hodin, a hlavně jejich rytmů, zásadní, jak odhalily metody in vitro. Dále je v práci diskutováno, jak se chování embryonálních kmenových buněk liší od buněk diferenciovaných z nich, a proč jsou v těchto buňkách cirkadiální hodiny nefunkční. Práce přináší hlubší porozumění ontogeneze cirkadiálního systému, jeho rytmů a jeho regulačních mechanismů – tedy toho kdy, kde a za jakých okolností se hodiny začínají vytvářet a „tikat“.

Klíčová slova: cirkadiální hodiny, cirkadiální rytmy, embryo, embryonální kmenové buňky, ontogeneze, suprachiasmatická jádra, periferní oscilátor

Abstract

This thesis focuses on the development and function of the circadian system, which regulates biological processes in the body according to the 24-hour cycle. The circadian system and its key components, including the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and peripheral oscillators, are introduced. The molecular operation of the circadian clock, which is influenced by two loops, is also discussed. A major theme is the ontogeny of the circadian clock, which occurs autonomously during embryonic stem cell differentiation. This process is influenced by various factors such as ultradian rhythms of the segmentation clock and the influence of maternal factors. However, not all signals are essential for the development of these clocks, and especially their rhythms, as revealed by in vitro methods. Furthermore, the thesis discusses how the behaviour of embryonic stem cells differs from cells differentiated from them, and why the circadian clock is dysfunctional in these cells. The work provides a deeper understanding of the ontogeny of the circadian system, its rhythms, and its regulatory mechanisms - that is, when, where and under what circumstances the clock starts to form and "tick".

Keywords: circadian clock, circadian rhythms, embryo, embryonic stem cells, ontogeny, suprachiasmatic nucleus, peripheral oscillator

Seznam použitých zkratek

AVP	arginin vasopresin
bHLH	basic helix-loop-helix
Bmal1	Brain and muscle Arnt-like proteiny 1
CCGs	hodinami řízené geny
CK1 ϵ	Casein kináza 1 epsilon
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
Cry	Cryptochrome 1-2
DBP	D site albumin promoter binding protein
E4BP4	E4 binding protein 4
ESC	embryonální kmenové buňky
Ex	x embryonální den
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	glukokortikoidy
Gfap	gliální fibrilární kyselý protein
GRP	gastrin uvolňující peptid
miRNA	mikroRNA
PAR	receptory aktivované proteázami
PAS	PER-ARNT-SIM
Per	Period 1–3
PSM	zadní presomitický mezoderm
Px	x postnatální den

Rev-erb α	Reverse-erb alfa
RHT	retinohypotalamický trakt
RNA-seg	sekvenování RNA
Ror α , β	Retinoic acid-related orphan receptor alfa, beta
SCN	suprachiasmatická jádra hypotalamu
TTFL	transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky
VIP	vasoaktivní intestinální peptid

Obsah

1. Úvod	1
2. Cirkadiánní systém	2
2.1 Struktura a funkce suprachiasmatických jader hypotalamu jako centra řízení cirkadiánních hodin	2
2.2 Periferní oscilátory a jejich role v systému	3
3. Molekulární mechanismy cirkadiánního řízení	5
3.1 Klíčové molekuly a signální dráhy	5
3.2 Stabilizace zpětnovazebné smyčky	7
4. Embryo	7
4.1 Vývojová stádia embrya	8
4.2 Vliv mateřských hormonů na embryo	10
5. Embryonální kmenové buňky	10
5.1 Co se (ne)děje v ES buňkách oproti diferenciovaným buňkám.....	11
5.2 Diferenciace kmenových buněk a vývoj hodin	14
5.3 Vliv segmentačních hodin na cirkadiánní hodiny	15
6. Časná ontogeneze cirkadiánních hodin	17
6.1 Ontogeneze suprachiasmatických jader	18
6.1.1 Chronologie morfologického vývoje suprachiasmatických jader	18
6.1.2 První projevy cirkadiánních rytmů v embryonálním stádiu.....	18
6.1.3 První projevy cirkadiánních rytmů ve fetálních explantátech SCN in vitro	20
6.1.4 Synaptogeneze SCN.....	21
6.2 Ontogeneze periferních oscilátorů	22
7. Synchronizace během časně ontogeneze	23
7.1 Vliv mateřských faktorů na ontogenezi cirkadiánních hodin	23
8. Závěr.....	26
9. Seznam použité literatury.....	27

1. Úvod

U všech živých organismů se projevují biologické rytmy s pravidelně se opakující periodou. Rytmy s přibližně denní periodou mají na starosti tzv. cirkadiánní hodiny. Cirkadiánní hodiny jsou zodpovědné za časovou synchronizaci biologických funkcí v organismu, představují klíčový aspekt biologického rytmu. Tyto hodiny jsou pod vlivem různých vnitřních a vnějších faktorů – tzv. „zeitgebers“ (německy „udavač času“) a regulují opakující se biologické události s periodou přibližně 24 hodin. Již během procesu ontogeneze dochází k formování molekulárního hodinového mechanismu, jež představuje klíčový prvek buněčných cirkadiánních oscilací. Cirkadiánní systém zajišťuje synchronizaci behaviorálních, fyziologických a molekulárních funkcí u většiny zkoumaných organismů. Jeho evoluční vývoj proběhl jako adaptace na již zmíněné cyklické změny světla a tmy způsobené rotací Země během solárního dne, trvajících 24 hodin (proto „cirkadiánní“, vycházející z latinských slov „circa“ (přibližně) a „dies“ (den)). Cirkadiánní systém zajišťuje přesné načasování klíčových životních procesů u většiny doposud zkoumaných organismů. U savců tvoří cirkadiánní systém centrální hodiny, uložené v suprachiasmatických jádrech v mozku a periferní hodiny v různých tkáních těla, které podléhají řízení centrálních hodin. Molekulární hodiny v buňkách vytvářejí cirkadiánní rytmicitu a regulují tělesné funkce prostřednictvím rytmické transkripce genů. Mohlo by se zdát, že každá buňka v těle, obsahuje tyto hodiny, existují však výjimky. Jednou z výjimek jsou embryonální kmenové buňky, ze kterých organismy vznikají. Embryonální kmenové buňky tyto hodiny postrádají a jsou v časně fázi vývoje pod vlivem ultradiánních rytmů segmentačních hodin. A teprve po dokončení organogeneze, v průběhu jejich diferenciaci, dochází k postupnému vzniku cirkadiánních oscilací.

2. Cirkadiánní systém

Biologické hodiny jsou endogenního původu a mají charakter vnitřního oscilátoru, což znamená, že vykazují rytmy i ve stálé tmě (shrnutí v Hastings, 1997). Tyto hodiny jsou synchronizovány s denní dobou především pomocí denního světla (Pittendrigh and Daan, 1976), ale také pohybové aktivity, teploty okolního prostředí, sociální interakce a dalších faktorů.

Cirkadiánní systém savců má komplexní strukturu tvořenou centrálním pacemakerem v mozku, periferními hodinami, vstupními cestami pro synchronizaci s vnějším prostředím a výstupními cestami pro přenos rytmického signálu na periferii (Leak and Moore, 2001). Molekulární mechanismy vytvářející rytmický signál jsou přítomny téměř v každé buňce těla savců (Schibler et al., 2003). Bylo prokázáno, že centrální cirkadiánní hodiny sídlí v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN), která jsou komplexní strukturou složenou ze vzájemně synchronizovaných buněčných oscilátorů (shrnutí v Welsh et al., 2010).

SCN jsou na vrcholu hierarchického uspořádání cirkadiánního systému, jelikož synchronizují ostatní periferní hodiny v mozku i různých tkáních a orgánech těla a koordinují cirkadiánní behaviorální a fyziologické procesy (Abe et al., 2001; Herzog et al., 2004). Hlavním synchronizátorem SCN je světelný signál, který je detekován retinou (Besharse and Iuvone, 1983). Tato synchronizace je klíčová pro správnou funkci cirkadiánního systému, který organismům umožňuje přizpůsobit se pravidelnému střídání dne a noci (Abe et al., 2001). Výzkum ontogeneze cirkadiánních hodin ukazuje, že synchronizované molekulární oscilace se vyvíjejí postupně během ontogeneze a přetrvávají i v postnatálním období (Sumová et al., 2006).

2.1 Struktura a funkce suprachiasmatických jader hypotalamu jako centra řízení cirkadiánních hodin

SCN se utváří z embryonálního epitelu ventrálního diencefalonu jako integrální část periventriculárních buněčných skupin (Altman and Bayer, 1986). SCN jsou párová jádra, složená z přibližně 20 000 nervových buněk, umístěná v hypotalamu nad křížením optických

nervů a po obou stranách třetí mozkové komory (shrnutí v Klein and Moore, 1991). Tato poloha je strategická pro příjem informací z vnitřního i vnějšího prostředí.

Neurony SCN jsou heterogenní a liší se v různých aspektech, včetně aferentních a eferentních spojení, fenotypu neuropeptidů a funkce (Abrahamson and Moore, 2001). Tyto neurony tvoří dvě subpopulace, nazývané ventrolaterální část neboli jádro (angl. core) a dorsomediální část neboli obal (angl. shell) (Leak and Moore, 2001). Ventrolaterální subpopulace přijímá většinu podnětů z retiny přes retinohypotalamický trakt (RHT) a sekretuje látky jako vasoaktivní intestinální peptid (VIP) nebo gastrin uvolňujícího peptidu (GRP) spolu s kyselinou γ -aminomáslenou (GABA) (Aton et al., 2005, 2006). Dorsomediální obal, charakterizovaný populací neuronů s arginin vasopresinem (AVP) a kalretininem, obklopuje jádro (Moore et al., 2002).

Individuální neurony SCN jsou samostatnými oscilátory s periodou τ , která je přibližně 24 hodin (Welsh et al., 2010). Tyto oscilátory jsou synchronizovány pomocí elektrické aktivity a neurotransmiterů jako je GABA (Moore and Speh, 1993) a VIP (Aton et al., 2005). Hlavním synchronizátorem je světelný signál, který je detekován gangliovými buňkami sítnice obsahujícími melanopsin (Provencio et al., 2000). Světelný pulz aktivuje kaskádu signálních molekul a transkripčních faktorů v SCN, což vede k seřízení hodin (shrnutí v Foster et al., 2020). SCN následně prostřednictvím výstupních humorálních a neuronálních drah upravují periferní oscilátory tak, aby odpovídaly správné fázi během denního cyklu a byly synchronizovány mezi sebou (obrázek 1) (Buijs et al., 2003; Yoo et al., 2004).

2.2 Periferní oscilátory a jejich role v systému

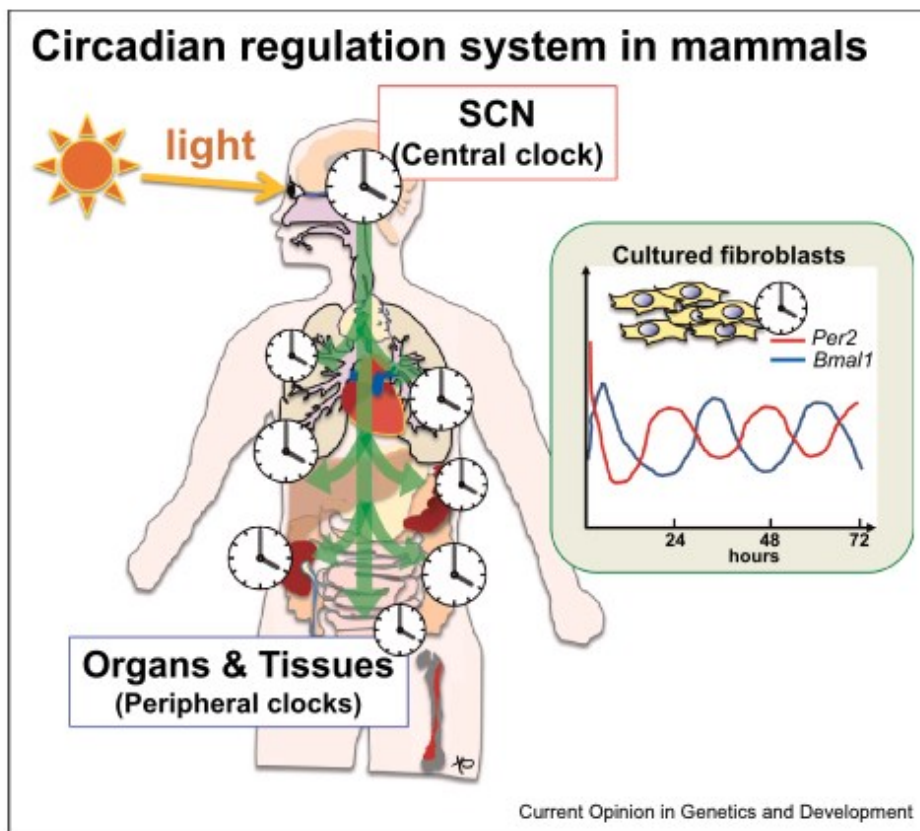
Periferní hodiny, které jsou také klíčové pro cirkadiánní systém, můžeme rozdělit na dvě hlavní kategorie, a to hodiny lokalizované v mozku a hodiny umístěné v jednotlivých orgánech a tkáních.

Periferní hodiny v mozku jsou součástí cirkadiánního systému, který umožňuje přes informace z SCN komunikaci s dalšími jádry hypotalamu a s ostatními částmi mozku, vytvářejíce funkční celek schopný řídit tkáňové hodiny. Například některá jádra talamu, jádra hypotalamu, bulbus olfactorius koncového mozku, mozeček, amygdala a další mohou fungovat jako oscilátory, jak ukázaly studie (Abe et al., 2002; Lamont et al., 2005). Tyto různé oscilátory se ovšem liší ve své

schopnosti udržovat endogenní oscilace a většina z nich je brána jako oscilátory podřízené SCN.

Z další experimentů vyplývá, že cirkadiánní oscilace hodinových genů jsou patrné i v jednotlivých orgánech těla. Mezi tyto orgány patří slinivka, ledviny, slezina, játra, srdce, žaludek, plíce, kosterní svalstvo, štítná žláza, střeva, rohovka a nadledviny (Balsalobre et al., 1998; Sládek et al., 2007; Yamamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2000).

Jak mozkové, tak tkáňové periferní hodiny vykazují cirkadiánní rytmicitu a mohou fungovat nezávisle na SCN, avšak po odstranění SCN postupně ztrácí rytmus v genové expresi (Akhtar et al., 2002). Toto utlumení rytmu je způsobené vzájemnou desynchronizací jednotlivých oscilátorů v periferních tkáních vlivem absence signálu ze SCN (Yoo et al., 2004). U savců je nastavení fáze periferních oscilátorů pro dosažení synchronizace s cyklem dne a noci také závislé na signalizaci ze SCN (Hastings et al., 2003). V závislosti na tkáni jsou periferní oscilátory za centrálními hodinami zpožděny o 3 až 9 hodin. Vývoj periferních hodin je ovlivněn zráním orgánu, kde jsou umístěny, a také zráním molekulárního hodinového mechanismu. První projev molekulárních oscilací může být výrazně specifický pro konkrétní orgán a druh organismu (Sakamoto et al., 2002).



Obrázek 1 - U savců, včetně člověka, je cirkadiánní systém regulován SCN, které fungují jako centrální hodiny. Cirkadiánní hodiny jsou však přítomny i v periferních buňkách většiny orgánů nebo tkání. SCN mají schopnost synchronizovat periferní hodiny po celém těle (Yagita, 2024).

3. Molekulární mechanismy cirkadiánního řízení

Rytmická exprese hodinových genů a jejich proteinů řídí cirkadiánní hodiny buněčně autonomním způsobem. Rytmický signál vzniká na buněčné úrovni a všechny buňky těla mají sadu genů, zvanou hodinové geny, nezbytnou pro cirkadiánní funkci. V centrálních i periferních hodinách nalezneme podobné mechanismy pro vytvoření rytmičkého signálu, a to prostřednictvím autoregulačního mechanismu řízeného vzájemně propojenými zpětnými vazbami. Tento mechanismus spočívá v rytmičké spínání hodinových genů, které je řízené transkripčně-translačními zpětnovazebnými smyčkami (shrnuto v Takahashi, 2016).

3.1 Klíčové molekuly a signální dráhy

V molekulárním řízení cirkadiánních regulací hrají hlavní roli hodinové geny. K významným hodinovým genům patří *Brain and muscle Arnt-like proteiny 1 (Bmal1)*, *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)*, *Cryptochrome (Cry 1–2)*, *Period (Per 1–3)*, *Casein kináza 1 epsilon*

(*CK1 ϵ*), *Retinoic acid-related orphan receptor alfa (Rev-erb α)* a *Rora*, α , β (Bae et al., 2001; Bunker et al., 2000; van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1994). Tyto geny tvoří vzájemně propojené negativní a pozitivní transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky (z angl. transcriptional-translational feedback loops, TTFL), což vede k rytmické regulaci jejich exprese (Shearman et al., 2000). V rámci těchto smyček jsou transkripčními represory CRY1, CRY2, PER1, PER2 a REB-ERB α a transkripčními aktivátory BMAL1, CLOCK a RORA.

Celkově jsou cirkadiální hodiny sestaveny z TTFL, kde CLOCK a BMAL1 slouží jako aktivátory, zatímco PER a CRY fungují jako inhibitory. Tyto smyčky se opakují s cirkadiální periodou, což vytváří robustní sebeudržující se cirkadiální oscilace v centrálních a periferních tkáních savců.

Součástí těchto TTFL je heterodimer CLOCK:BMAL1, který vzniká pomocí domény PER-ARNT-SIM (PAS) a aktivuje transkripci genů *Cry*, *Per*, *Rev-Erbs* a *Rors*, jako pozitivní regulátor. Tato aktivace probíhá na E-box – regulační oblasti, obsahující sekvenci CACGTG a nasedá na ni pomocí basic helix-loop-helix (bHLH) domény. Tento heterodimer CLOCK:BMAL1 rovněž indukuje expresi jaderných receptorů REB-ERB α a ROR α , kteří řídí transkripci genu *Bmal1*.

Protein REV-ERB α přistupuje k promotoru genu *Bmal1*, kde efektivně potlačuje transkripci tohoto genu. Tato vazba je v konkurenci s proteinovým produktem genu *Rora*, který naopak působí jako aktivátor transkripce genu *Bmal1* (Guillaumond et al., 2005; Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004).

Role BMAL1 a CLOCK je i v kontrole transkripce hodinami řízených genů (z angl. clock controlled gene, CCGs), které fungují jako efektor v tkáních. Naopak PER a CRY, negativní regulátory transkripce, vytvářejí heterodimer. Tento heterodimer následně po fosforylaci kinázou CK1 δ/ϵ migruje do jádra a působí inhibicí transkripce genů aktivovaných CLOCK:BMAL1 (Eide et al., 2002.; Eide and Virshup, 2001). Tím vzniká hlavní cirkadiální negativní zpětnovazebná smyčka (Albrecht, 2004). Posttranslační mechanismy, včetně fosforylace a degradace proteinů PER a CRY, jsou klíčové pro udržení cirkadiální periody mechanismů (Lee et al., 2001).

3.2 Stabilizace zpětnovazebné smyčky

Kromě výše zmíněné smyčky, existuje ještě jiná smyčka, která přispívá ke stabilizaci zpětnovazebné smyčky PER/CRY. Jedná se o smyčku složenou z D site albumin promoter binding protein (DBP), což je protein ze skupiny receptorů aktivovaných proteázami (PAR) a z E4 binding protein 4 (E4BP4), kteří jsou schopni aktivovat, respektive potlačovat transkripční aktivitu pomocí sekvence zvané D-box (Mitsui et al., 2001). DBP dokáže transkripci aktivovat, naopak tato transaktivace závislá na DBP je potlačena kompetitivní vazbou právě E4BP4 na D-box. Tento E4BP4 obsahuje DNA vazebnou doménu, která je příbuzná zmíněnému DBP. Fáze rytmu mRNA *E4bp4* je opačná než fáze rytmu *Dbp* v SCN a hladiny proteinů E4BP4 a DBP také kolísají v opačné fázi. E4BP4 inhibuje expresi cílových genů během denní fáze, kdy je jeho koncentrace vysoká, zatímco proteiny PAR je aktivují v opačnou denní dobu. Dochází k přepínání mezi těmito dvěma stavy, které ovlivňují aktivitu cílových genů (Mitsui et al., 2001). Ve studii Yamajuka publikoval fakt, že DBP a E4BP4 regulují délku periody oscilací *mPer1* a *mPer2* (Yamajuku et al., 2011). Z této studie je zřejmé, že D-box regulátory mají významnou roli při určování délky periody. Dále bylo zjištěno, že okamžitá aktivace proteinu E4BP4 vyvolává fázový reset periferních hodin, což naznačuje, že D-box hraje důležitou roli nejen při výstupu, ale i při vstupu do cirkadiálního hodinového systému (Yoshitane et al., 2019).

4. Embryo

Embryo je v raném vývoji organismu stádium mezi zygotou a narozením. Embryo prochází sérií ontogenetických procesů, během kterých se formují základní struktury a orgány těla. Embryonální vývoj končí obvykle v okamžiku narození, kde je organismus schopen existovat samostatně mimo tělo matky.

I když jsou cirkadiální hodiny po narození přítomné v celém těle, savčí zygoty, raná embrya a zárodečné buňky nevykazují cirkadiální molekulární rytmy a vytvoření cirkadiálních rytmů probíhá postupně během vývoje, viz kapitola 6 (Alvarez et al., 2003; Amano et al., 2009; Morse et al., 2003).

Proces oplození se obvykle odehrává v ampulích vejcovodů. Nejprve ale musí u samice dojít k ovulaci. Ovulace u potkanů nastává přibližně v době porodu a poté opět 29 až 30 dnů

po porodu. Druhé období ovulace je považované za příznivější pro oplození vajíček (shrnuto v Huber, 1915).

Ke vzniku embrya dochází díky oplození, což je proces, během kterého pronikne samčí spermie do samičího vajíčka a dojde k zahájení vývoje nového jedince. Tento důležitý krok umožňuje přenos genetické informace z rodičů na potomstvo a spouští celou řadu událostí, které vedou k vytvoření nového organismu.

V následujících kapitolách, se budu zaměřovat na embrya hlodavců, především jde o data získaná pokusy s potkany a myšmi.

4.1 Vývojová stádia embrya

Prenatální období trvá u potkana 22–23 dní, období postnatální trvá přibližně 3 týdny. Vývoj hlodavců probíhá v několika krocích:

a) Rýhování

Po oplození nastává pronukleární fáze, jejíž trvání se u potkana odhaduje na 12–15 hodin. Na začátku druhého dne po oplození nastává první segmentace, jejímž výsledkem je dvoubuněčné stádium, které trvá přibližně 24 hodin. První dvě blastomery jsou identické buňky, ale nedělí se synchronně. Jedna z blastomer se obvykle segmentuje dříve než druhá, což vytváří třibuněčné stádium, které je přítomné u každého vajíčka pouze po krátkou dobu. Čtyřbuněčné stádium nastává na konci třetího dne po oplození. Ve druhé polovině čtvrtého dne po oplození je pozorováno stádium obsahující 8 buněk a na konci tohoto dne vajíčka opouštějí vejcovod a přecházejí do dělohy ve stádiu 12 až 16 buněk (Huber, 1915).

Dělení blastomer pokračuje a formuje se kompaktní shluk buněk, který je znám jako morula. V prvních hodinách pátého dne po oplození jsou vajíčka nalezena volně v lumen dělohy a rozmístěna podobně jako v pozdějších fázích vývoje. Segmentace v této době již proběhla, což vede k vytvoření morulových hmot, které mají vejčitý tvar a skládají se z 24 až 32 buněk (Huber, 1915).

b) Blastogeneze

Morula se následně transformuje do pokročilejší struktury nazývané blastocysta. Tato komplexní formace se skládá z vnější vrstvy buněk, známé jako trofoblast a z vnitřní skupiny buněk, označované jako embryoblast. Trofoblast je klíčový pro budoucí vývoj placenty, která zajišťuje výživu a podporu rostoucího embrya. Na druhé straně, embryoblast obsahuje buňky, které budou diferencovat do různých tkání a orgánů v embryonálním vývoji (shrnutí v Suckow et al., 2005).

c) Implantace

Blastocysta se spojuje s endometriální vrstvou dělohy matky v procesu zvaném implantace. Během této události proniká trofoblast do endometria a vytváří struktury, které navazují spojení s embryem v průběhu těhotenství. V době implantace se myší blastocysta skládá ze tří linií: epiblastu, trofoektodermu a primitivního endodermu, z nichž vzniká vlastní embryo, placenta a žloutkový váček (shrnutí v Suckow et al., 2005).

d) Gastrulace

Po implantaci začíná fáze vývoje nazývaná gastrulace. Během této fáze se blastocysta diferencuje na tři zárodečné vrstvy, které se nazývají ektoderm, mezoderm a endoderm. Na diferenciaci zárodečných vrstev mají podíl hlavně embryonální kmenové buňky (ESC), které mají schopnost diferenciaci do různých buněčných typů, což je klíčové pro vytvoření těchto zárodečných vrstev. Každá z těchto vrstev má specifickou roli a je základem pro tvorbu různých orgánů a tkání v těle embrya (shrnutí v Suckow et al., 2005).

e) Organogeneze

Po gastrulaci následuje organogeneze, při které se díky ESC jednotlivé orgány a tkáně formují a diferencují. Organogeneze je klíčová pro vytvoření funkčního systému těla, který zahrnuje nervový, kardiovaskulární, trávicí a respirační systém (shrnutí v Suckow et al., 2005).

f) Fetální vývoj a porod

Po organogenezi následuje fáze fetálního vývoje, během které probíhá další zrání orgánů a tkání a dochází k posledním úpravám, které jsou nezbytné pro život mimo matčino tělo.

V období fetálního vývoje, obvykle trvajícím od 15 do 21 dnů, dochází k rychlému růstu a zrání plodu. Po 21 až 23 dnech nastává porod (shrnutí v Suckow et al., 2005).

4.2 Vliv mateřských hormonů na embryo

Mezi důležité mateřské hormony mající vliv na vývoj embrya patří progesteron, estrogen, prolaktin, oxytocin, luteinizační hormon a glukokortikoidy.

Od 1. embryonálního dne (E1) se zvyšuje hladina progesteronu v těle matky a teprve v E20 s nárůstem estrogenu dochází k jeho poklesu (Morishige et al., 1973). Je produkován vaječníky a je zásadní pro růst endometria a pro proces implantace. Tento hormon má také vliv na periferní hodiny v děloze, jeho působením se totiž zvyšuje exprese *per1* v endometriu (Zhang et al., 2019). Hladina estrogenu narůstá u březí samice potkana v E10, maxima je dosaženo v E18 a je udržováno, až do porodu, poté hladina značně poklesne. Tento hormon, který je také produkován vaječníky, je zodpovědný za správnou funkci reprodukčních orgánů a také má podíl na funkci hormonu prolaktinu (Rosenblatt et al., 1988). Hladina prolaktinu je u matky mírně zvýšená v E3 a poté výrazně více v E22, tato hladina stoupá až do 6. postnatálního dne (P6), následně postupně klesá (Morishige et al., 1973). Prolaktin je produkován hypofýzou a je zásadní v laktaci, jelikož stimuluje růst mléčných žláz. Další hormon produkován hypofýzou je oxytocin, který hraje roli při stimulaci kontrakcí dělohy během porodu a také při uvolňování mléka během kojení. Hypofýza produkuje ještě luteinizační hormon, jehož hladina roste během menstruačního cyklu a stimuluje uvolnění zralého vajíčka z folikulu v procesu ovulace (Morishige et al., 1973). Tento hormon ale také podporuje expresi genů *per1* a *Bmal1* (Karman and Tischkau, 2006). Posledním důležitým hormonem jsou glukokortikoidy, které jsou produkovány nadledvinkami matky, mají vliv na různé aspekty vývoje plodu, jako je diferenciace buněk a regulace metabolismu. Jejich vliv na fetální cirkadiální systém je přibližně v kapitole 7.1.

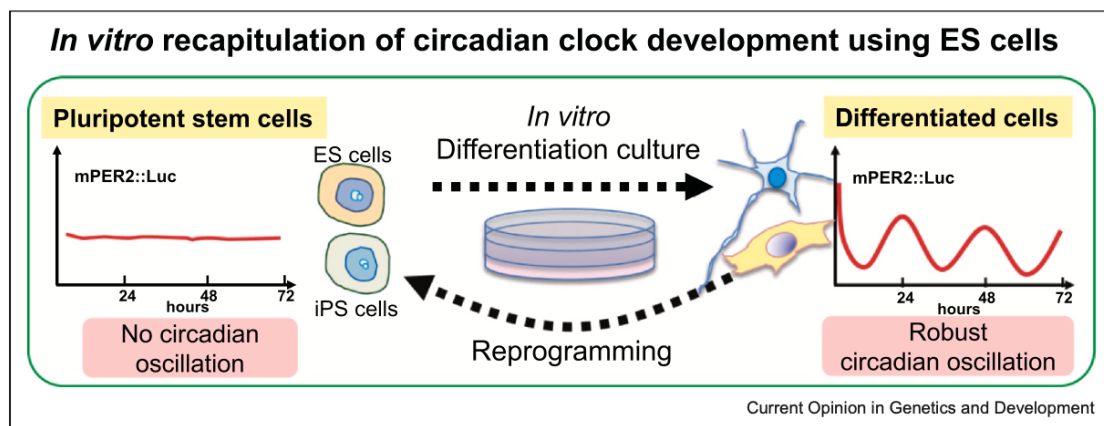
5. Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní, tedy schopné vytvořit všechny buňky embrya a jsou získávány z vnitřní vrstvy blastocysty. V in vitro podmínkách se tyto buňky neomezeně

množí a mohou dát vzniknout buňkám všech tří zárodečných listů, včetně ektodermu, mezodermu a endodermu.

5.1 Co se (ne)děje v ES buňkách oproti diferenciovaným buňkám

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4, i přesto, že cirkadiánní hodiny jsou přítomny v buňkách celého těla, je fascinující, že reprodukční buňky jako jsou oocyty a spermatoocyty, jsou výjimkou a nevykazují oscilaci hodinových genů (Alvarez et al., 2003; Amano et al., 2009). Výzkum na myších a lidských pluripotentních ES buňkách poukazuje na nepřítomnost funkčních cirkadiánních hodin, i když většina základních hodinových genů je v těchto buňkách exprimována (Dierickx et al., 2017; Yagita et al., 2010). Tyto buňky však nevykazují cyklické chování, což naznačuje, že odlišné mechanismy mohou ovlivňovat molekulární hodinový systém tak, aby nedocházelo k oscilaci TTFL. Cirkadiánní zpětnovazební smyčka tedy v ES buňkách neosciluje, ale při diferenciaci a přeprogramování buněk *in vitro* dochází k vytvoření TTFL v buňkách, a naopak k vymizení cirkadiánních hodin při přeprogramování pomocí reprogramovacích faktorů, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc* (obrázek 2) (Yagita et al., 2010).



Obrázek 2 - V nediferenciovaných ES buňkách nejsou zaznamenány žádné cirkadiánní oscilace molekulárních hodin, po kultivaci *in vitro* se i tak samostatně rozvinuly robustní cirkadiánní oscilace hodinových genů. Ovšem po převedení diferenciovaných buněk s aktivními cirkadiánními hodinami na iPS buňky dojde k zániku cirkadiánních hodin (Yagita, 2024).

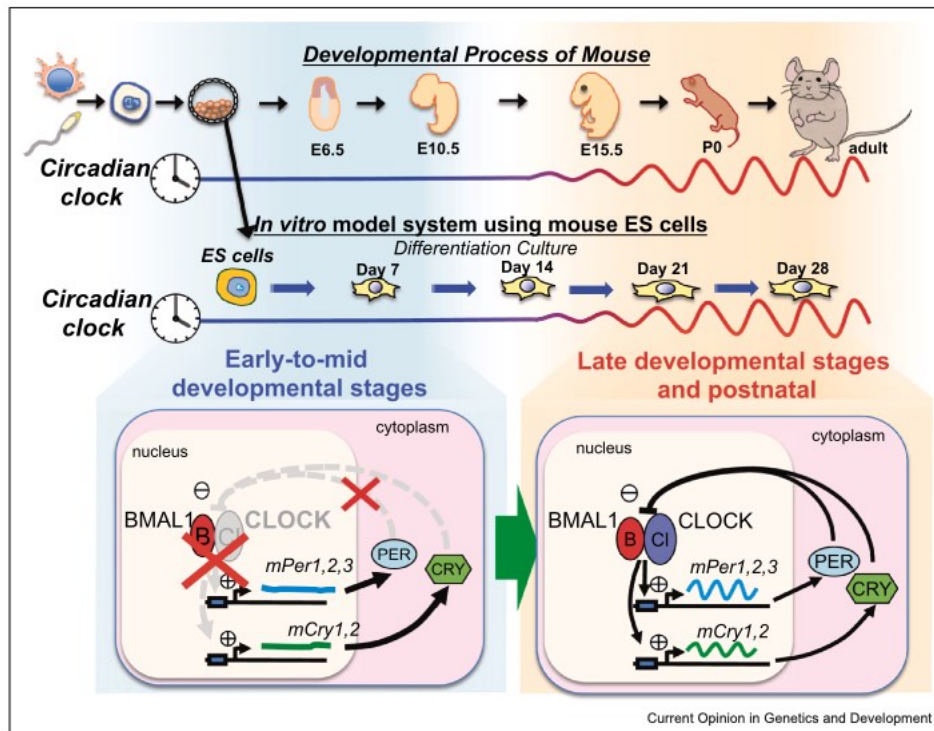
Jedním z rozdílů mezi ES buňkami a buňkami diferenciovanými jsou expresní hladiny základních hodinových faktorů. Ve srovnání s diferenciovanými buňkami jsou tyto hladiny v ES buňkách nižší, s výjimkou *Cry1*, který vykazuje vyšší úroveň v těchto buňkách. Zvýšené hladiny *Cry1* by mohly ovlivnit rozdíly v rychlosti proliferace mezi těmito buňkami (Dierickx et al., 2017; Yagita et al., 2010). Naopak nižší hladinu ve srovnání s diferenciovanými buňkami

pozorujeme u *Per2*, což by mohlo přispět k rychlejší proliferaci pluripotentních buněk (Dierickx et al., 2017; Yagita et al., 2010).

Nefunkční hodiny v ES buňkách mohou být spojeny také s anomální lokalizací základních hodinových proteinů. Bylo teoretizováno, že v této situaci hraje klíčovou roli importin- $\alpha 2$, který je zakódován genem *Kpna2*. Importin- $\alpha 2$, jako jaderný transportér, přemísťuje specifické faktory pluripotence, například OCT3/4 a faktory spojené s diferenciací, jako je OCT6, mimo jádro myších ES buněk s cílem udržet pluripotentní stav (Yasuhara et al., 2013). Tento jaderný transportér reguluje buněčnou diferenciaci s úmyslem udržet buňky v nediferenciovaném stavu. Což vede k zadržování základních hodinových faktorů PER1 a PER2 mimo jádro. Tím dochází k narušení funkčního hodinového mechanismu prostřednictvím negativní zpětnovazebné smyčky založené na proteinech PER (Umemura et al., 2014).

Již víme, že TTFL je tedy potlačena v ES buňkách a v raných stádiích embryí (obrázek 3). K potlačení ale dochází i několika dalšími mechanismy, včetně regulace posttranskripční exprese proteinu CLOCK. V pluripotentních buňkách a v raných embryích je exprimována mRNA *Clock* a represi exprese proteinu CLOCK regulují posttranskripční mechanismy. Mechanismus posttranskripční represe zahrnuje mikroRNA (miRNA) (Chekulaeva et al., 2009; Sonenberg, 2009). Je zvláštní, že zřejmá exprese proteinu CLOCK byla zaznamenána u ES buněk s nedostatkem genů *Dicer* nebo *Dgcr8* (Umemura et al., 2017). Tyto geny *Dicer* a *Dgcr8* jsou nezbytné pro biosyntézu miRNA, což naznačuje, že posttranskripční mechanismy spojené s miRNA mohou ovlivňovat inhibici exprese proteinu CLOCK v ES buňkách. Účinnost translace CLOCK v nediferencovaných myších ES buňkách je nízká a vazba *Clock* mRNA na ribozom je potlačena (Ingolia et al., 2011). Jaderné zadržování *Clock* mRNA závislé na *Dicer/Dgcr8* je tedy klíčovým mechanismem pro potlačení exprese proteinu CLOCK v pluripotentních buňkách „bez hodin“ (Umemura et al., 2017). Striktní potlačení cirkadiálních molekulárních mechanismů v pluripotentních kmenových buňkách a raných embryích, může přispívat k programovanému oddálení vývoje cirkadiálních hodin u savců. To naznačuje, že cirkadiální hodiny nejsou klíčovým faktorem během vývojových procesů savců, jako je například činnost ES buněk během vzniku embrya, ale jejich výskyt může být stěžejní pro regulaci určitých fyziologických funkcí v rámci vývoje (shrnuto v Yagita, 2024).

CLOCK dále také v myších embryonálních fibroblastech omezuje proliferaci a zvyšuje expresi inhibitorů buněčné proliferace, *p21* a *p27* (Miller et al., 2007). Výzkum ukazuje, že myší ES buňky s genetickým vyřazením genu *Clock* vykazují sníženou proliferaci a zvýšenou apoptózu, což naznačuje silnou interakci mezi hodinovými faktory a regulací buněčného cyklu (Lu et al., 2016). Změna stechiometrie hodinových faktorů v těchto buňkách může tedy změnit jejich roli z regulátorů rytmicity na klíčové regulátory buněčného cyklu.



Obrázek 3 - Aktivita TTFL je pevně potlačena v ES buňkách a časných stádiích embryí prostřednictvím několika mechanismů, včetně inhibice exprese proteinu CLOCK, posttranskripční regulace a neobvyklé akumulace proteinu PER v cytoplasmě (Yagita, 2024).

Víme, že exprese BMAL1 je přítomna v ES buňkách. Umemura zjistil, že tento endogenně exprimovaný BMAL1 může být posttranskripčně modifikován tak, že je nefunkční. Toto zjištění se objevilo díky expresi samotného proteinu CLOCK v ES buňkách, jejichž linie nesla gen *Clock* indukovatelný doxycyklinem. Exprese vedla pouze k částečné up-regulaci E-boxem řízených hodinových genů (Umemura et al., 2022).

Ještě před vývojem hodin ES buňky vykazují cirkadiánní rytmy ve využití glukózy a mRNA glukózového transportéru *mGlut8* (Paulose et al., 2012). Nediferencované kmenové buňky projevují spontánní rytmus v příjmu glukózy, který se nesynchronizuje s cirkadiánní expresí hodinových genů. Tento fyziologický rytmus je paralelní s expresí mRNA glukózového

transportéru *mGlu8*, což poskytuje první důkaz o existenci funkčních cirkadiálních hodin v těchto buňkách. Zároveň to zpochybňuje představu, že rytmická transkripce hodinových genů je nezbytná pro cirkadiální fyziologické jevy, naznačující přítomnost fyziologicky řízených hodin v nejranějších fázích vývoje (Paulose et al., 2012). To nás varuje před jednoduchým spojováním absence rytmu hodinových genů s nefunkčním časovým mechanismem. Je klíčové si uvědomit, že existují důkazy o tom, že oscilace v hladině hodinových proteinů nejsou vždy nezbytné pro vznik cirkadiálních rytmů (Hastings et al., 2008; Lakin-Thomas, 2006; Putker and O'Neill, 2016). Tyto poznatky v kombinaci s nedávným objevem cirkadiálních redoxních cyklů, nezávislých na transkripci, naznačují existenci nekanonických hodinových mechanismů, které by mohly tvořit základ cirkadiálních rytmů v ES buňkách (O'Neill and Reddy, 2011; Putker and O'Neill, 2016; Reddy and Rey, 2014).

5.2 Diferenciace kmenových buněk a vývoj hodin

Dospělé kmenové buňky, schopné jak proliferace, tak diferenciace, se odlišují od ES buněk tím, že obsahují funkční cirkadiální hodiny (shrnutí v Weger et al., 2017). Rytmicita těchto buněk přispívá k neustálé obnově buněk v lidských orgánech a aktivuje se při poranění. Proces buněčné diferenciace vytváří síť exprese genů specifickou pro danou buněčnou linii a regulovanou globálními epigenetickými a transkripčními programy (Holmberg and Perlmann, 2012). I když pluripotentní markery mizí do 7. dne diferenciace v kultuře, cirkadiální molekulární oscilace se u těchto buněk ještě neobjevily (Yagita et al., 2010; Umemura et al., 2014). Tyto poznatky naznačují, že k aktivaci cirkadiálních hodin v savčích buňkách jsou pravděpodobně zapotřebí další mechanismy po vytvoření specifické genové sítě pro danou buněčnou linii. Vývoj cirkadiálních hodin spojený s buněčnou diferenciací je v savčích buňkách regulován buněčně autonomním programem (shrnutí v Takahashi, 2016).

Studie odhalila genomická místa obsazená CRY1 unikátní pro pluripotentní kmenové buňky, mnohé z nich byly blízké genům vysoce zastoupených v diferenciaci, embryonálním vývoji a určování linií. To naznačuje, že CRY1 reguluje exprese vývojových genů, včetně *Sox*, *Pax*, *Hox* a *Fox* (Sato et al., 2023).

V diferenciovaných buňkách je pro molekulární oscilace klíčový protein CLOCK a posttranskripční regulace *Clock* hraje roli při stanovení času vzniku cirkadiálních hodinových

oscilací během vývoje savců. Postupný výskyt proteinu CLOCK během diferenciaci ES buněk koreluje se vznikem molekulární oscilace. Nadměrná exprese proteinu CLOCK nemá vliv na proces buněčné diferenciaci. Na druhou stranu, časná exprese proteinu CLOCK, která je způsobena nadměrnou expresí *Clock* během diferenciaci ES buněk, vede k urychlení vývoje cirkadiálních hodin (Umemura et al., 2017).

Umemura ve své studii dále ukázal, že *Dnmt1* je nezbytný pro diferenciacně vázaný vývoj cirkadiálních hodinových oscilací. DNMT1 hraje zásadní roli v diferenciaci savčích buněk tím, že udržuje epigenetické prostředí metylace DNA (Umemura et al., 2014). Narušení jeho funkce během buněčné diferenciaci kriticky ovlivňuje globální transkripční programy a následné změny buněčných struktur (Mikkelsen et al., 2008). Také naznačil nepřímou roli c-Myc v zabránění vývoje cirkadiálních hodin na rozdíl od přímého zrušení exprese hodinových genů. A to díky zkoumání ES buněk s nadměrnou expresí c-Myc, jelikož při buněčné diferenciaci s konstitutivní expresí c-Myc došlo k narušení vývoje cirkadiálních hodin v myších ES buňkách (Mikkelsen et al., 2008).

5.3 Vliv segmentačních hodin na cirkadiální hodiny

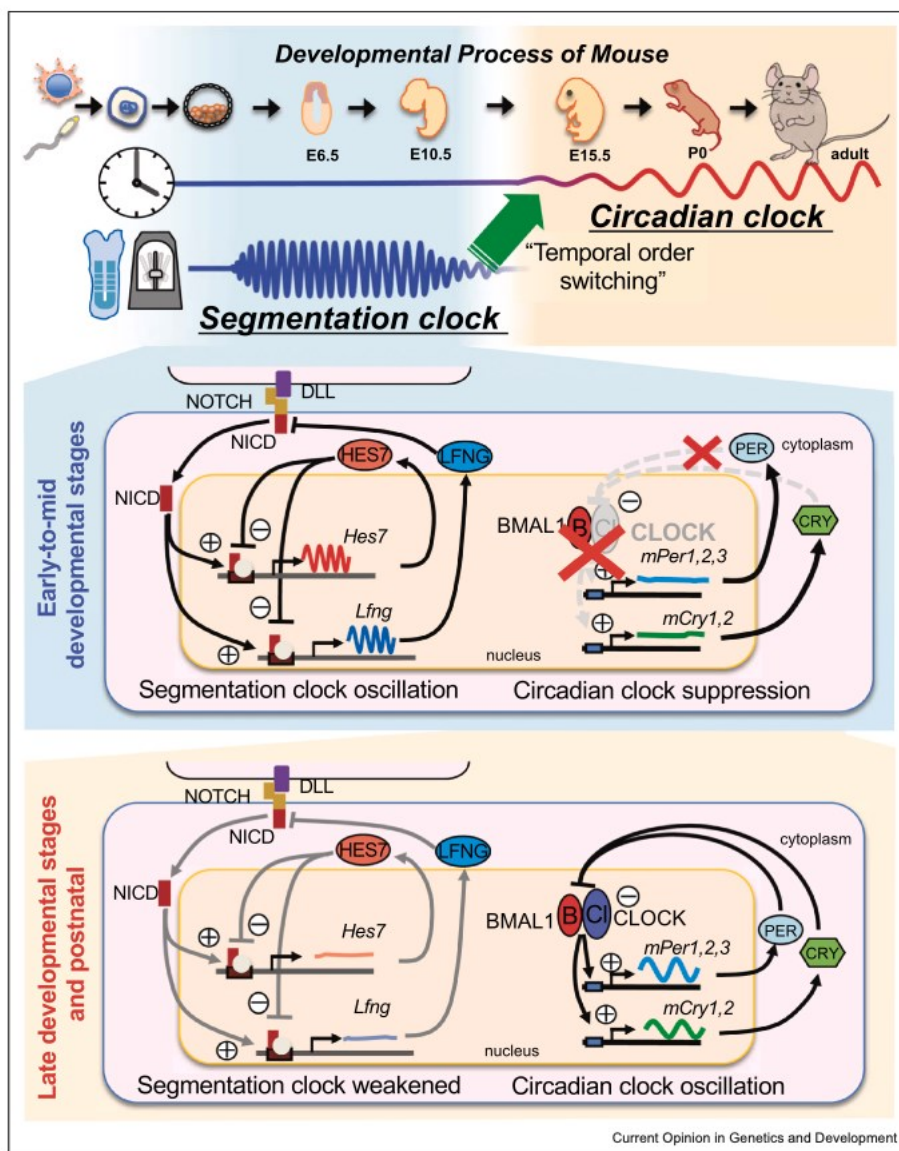
Možným vysvětlením striktního potlačení oscilací cirkadiálních hodin u raných embryí je také vztah mezi oscilacemi cirkadiálních hodin a segmentačními hodinami (Umemura et al., 2022). Raný vývoj vyžaduje neporušený segmentovaný tělní plán a somitogenezi, která je regulována buněčně autonomním oscilátorem, segmentačními hodinami, v zadním presomitickém mezodermu (PSM) (Harima et al., 2014; Hubaud and Pourquié, 2014). Segmentační hodiny jsou autonomním oscilátorem v PSM, řízeným signálními dráhami NOTCH, WNT a fibroblastovým růstovým faktorem (Hubaud and Pourquié, 2014). Ještě před vznikem cirkadiálních hodin je embryo ovládáno ultradiálními rytmy, což představuje další časový řád, jenž je řízen segmentačními hodinami (Matsuda et al., 2020).

Bylo prokázáno, že je zde souvislost mezi klíčovými složkami cirkadiálního rytmu a segmentačními hodinami. Například jeden z klíčových genů, *Per1*, fyzicky sousedí s lokusem *Hes7*, který je stěžejní složkou segmentačních hodin. Studie naznačuje, že exprese genu *Per1* v embryích, kterým chybí cirkadiální hodiny, může být pod kontrolou ultradiálního rytmu, který je řízen segmentačními hodinami. To poskytuje důkaz o tom, že ultradiální rytmus má

v raném až středním stádiu vývoje vliv na globální síť genové exprese embryí (shrnutí v Yagita, 2024).

Jak již bylo zmíněno, transkripční regulace zprostředkovaná BMAL1/CLOCK není funkční v ES buňkách ani v raných stádiích embryí (Yagita et al., 2010). V důsledku toho je rytmická regulace genové exprese cirkadiálních hodin potlačena, aby nedošlo k ovlivnění periodických molekulárních oscilací segmentačních hodin (obrázek 4).

Studie odhalily, že funkční BMAL1/CLOCK ovlivňuje transkripci *Hes7* a jeho regulační dráhy, což může mít vážné důsledky pro somitogenezi (Umemura et al., 2022). Suprese BMAL1/CLOCK během somitogeneze se zdá být nezbytná pro intaktní vývoj savců. Takže programované potlačení cirkadiálních hodin až do dokončení tvorby tělesného plánu a organogeneze může být faktorem způsobující opožděný výskyt cirkadiálních oscilací během vývoje savců (shrnutí v Yagita, 2024).



Obrázek 4 - Dvoje různé biologické hodiny regulují "časový řád" embryí. Během raných až středních vývojových stádií jsou cirkadiánní molekulární hodiny striktně potlačeny, zatímco jiné biologické hodiny, segmentační hodiny, vykazují molekulární oscilaci s ultradiánní délkou periody (Yagita, 2024).

6. Časná ontogeneze cirkadiánních hodin

K vývoji vnitřních buněčných hodin dochází autonomně při procesu buněčné diferenciace, přičemž tento vývoj je úzce propojen s posunem mezi somatickým a pluripotentním buněčným programem (shrnutí v Sato et al., 2023). Rozvoj cirkadiánních hodin spojený s buněčnou diferenciací může probíhat dvoustupňově, kdy dochází nejprve k diferenciaci buněk a poté k vytvoření cirkadiánních zpětnovazebných smyček (shrnutí v Umemura et al., 2017). Postupný vznik synchronizovaných molekulárních oscilací v centrálních a periferních hodinách je charakteristický pro ontogenezi a přesahuje do postnatálního období.

Výzkum u hlodavců odhalil, že cirkadiální rytmy se postupně objevují během střední až pozdní březosti. Na tkáňové nebo buněčné úrovni, oplozená vajíčka a raná embrya postrádají cirkadiální hodiny a molekulární oscilace, ale v pozdějších vývojových stádiích se buněčně autonomně objevují molekulární oscilace s přibližně 24hodinovým cyklem v SCN a periferních orgánech (Carmona-Alcocer et al., 2018; Davis and Gorski, 1988; Inada et al., 2014; Jud and Albrecht, 2006; Reppert and Schwartz, 1986; Sumová et al., 2008).

6.1 Ontogeneze suprachiasmatických jader

V perinatálním období prochází SCN hlodavců několika fázemi vývoje, které obsahují 1) zvýšení počtu autonomních buněčných oscilátorů, což je ovlivněné buněčnou diferenciací, 2) postupné navazování spojení mezi těmito buněčnými oscilátory, 3) vytváření spojení mezi různými buněčnými subpopulacemi a 4) vývoj schopnosti reagovat na vnější stimuly. U laboratorních druhů hlodavců probíhají fáze 2 až 4 v raném postnatálním období (shrnuto v Sumová and Čechmanová, 2020). Dále je třeba poznamenat, že synchronizované molekulární oscilace se v SCN vyvíjejí dříve než v periferních hodinách (Sumová et al., 2008).

6.1.1 Chronologie morfologického vývoje suprachiasmatických jader

U potkana trvá prenatalní období přibližně 22 dní, přičemž neurogeneze SCN začíná mezi E14 – E17. SCN vznikají z určité oblasti ventrálního diencefalického germinálního epitelu, který je součástí periventrikulárních buněčných skupin. V období E15 – E16 se formuje jádro SCN, což je soustředění neuronů ve ventrolaterální části, které jsou citlivé na světelné stimuly. Následně, v období E16 – E17, dochází k formaci obalu SCN, který tvoří neurony dorsomediální části, ty však nereagují na světlo. Proces neurogeneze v SCN končí v E18, kdy se jádro SCN stává samostatným jádrem hypotalamu. Morfologické zrání těchto neuronů pokračuje až do P10, kdy dochází k jejich diferenciaci a specializaci (Sumová et al., 2008). V tomto stádiu P10 je SCN schopna reagovat na světelné a temné signály a udržovat stabilní cirkadiální rytmus.

6.1.2 První projevy cirkadiálních rytmů v embryonálním stádiu

Již v E20 je ve fetálních SCN potkana pozorována vysoká amplituda rytmů *Per1* a *Per2* mRNA (Ohta et al., 2002, 2003). Studie zabývající se denními profily mRNA *Cry1*, *Per1*, *Per2* a *Bmal1*

v E19, tedy v době, kdy jsou fetální SCN potkana již utvořena (Klein and Moore, 1991) a kdy je pozorován rytmus metabolické aktivity (Reppert and Schwartz, 1984), neprokázaly rytmickou existenci žádného z těchto hodinových genů. Kromě toho, hladiny proteinů hodinových genů PER1, PER2 a CRY1 nejenže neprojevují žádné cirkadiální změny, ale ve skutečnosti jsou v E19 nedetekovatelné (Sládek et al., 2004). Nedávná transkriptomická studie potvrdila absenci cirkadiálního rytmu v expresi hodinových genů v SCN potkana v E19 (Greiner et al., 2022). Tato data naznačují, že v této fázi vývoje plodu mohou být cirkadiální hodiny SCN neschopné generovat synchronizované oscilace. Další vývojová studie ukázala, že v E20 se některé rytmy teprve začínají tvořit, avšak amplituda rytmicity je velmi nízká nebo nedosahuje významné úrovně (Kováčiková et al., 2006).

Vývoj rytmů v expresi hodinových genů v postnatálním období probíhá postupně a amplitudy podobné těm v dospělém stádiu jsou dosaženy v P10 (Sládek et al., 2004). Rytmická aktivita s nízkou amplitudou v expresi hodinových genů může být přítomna již v jednotlivých neuronech SCN, avšak není ještě vzájemně synchronizována kvůli nedostatečnému množství synaptických spojení v embryonálních SCN (Klein and Moore, 1991).

Klíčová je vzrůstající amplituda rytmů v expresi *Per1* a *Per2* v rytmických buňkách SCN až do P10 (Sládek et al., 2004), a to spolu s rozvojem synaptogeneze. Tato paralelní dynamika zdůrazňuje význam komunikace mezi jednotlivými hodinovými buňkami pro efektivní generování rytmického signálu.

Hodinový gen *Bmal1* vykazuje u potkanů silnou expresi ve fetálních SCN, zatímco *Per1* a *Cry1* jsou exprimovány pouze slabě (Sládek et al., 2004). SCN potkanů začínají řídit výstupní rytmy až kolem narození, neboť rytmus v AVP heteronukleární RNA je detekovatelný v SCN potkanů v E20, tedy 1-2 dny před narozením, ale v P1 je již zřetelný (Kováčiková et al., 2006). Tyto údaje podporují hypotézu, že potkan se rodí s relativně nezralými hodinami SCN, které se dále vyvíjejí po narození. K tomu přispívají i nedetekovatelné hladiny hodinových proteinů v celém cirkadiálním cyklu v E19 (Sládek et al., 2004).

Většina nalezených výsledků naznačuje, že synchronizované oscilace v genové expresi hodinových genů procházejí postupným vývojem během ontogeneze, přičemž tento proces pokračuje i v postnatálním období. Existuje možnost, že schopnost fungovat jako autonomní hodiny se rozvíjí postupně a nezralé hodiny mohou nejprve operovat jako podřízené

oscilátory. Teprve s dokončením komplexní sady molekulárních oscilací se mohou stát samostatně fungujícími hodinami (shrnutí v Sumová et al., 2008).

6.1.3 První projevy cirkadiánních rytmů ve fetálních explantátech SCN in vitro

Vývoj cirkadiánních hodin a jejich rytmů se díky transgennímu myšínmu modelu *mPer2luc* dá zkoumat v organotypických explantátech tkání pomocí metody in vitro. Tato transgenní myš má hodinový protein PER2 fúzovaný s luciferázou (Yoo et al., 2004), což umožňuje zaznamenání rytmických změn bioluminiscenčního signálu v explantátu fetálních SCN v reálném čase (Dolatshad et al., 2010; Wreschnig et al., 2014).

Pozorování bioluminiscenčních záznamů fetálních SCN, které na počátku nevykazovaly cirkadiánní rytmy, odhalilo, že během dlouhodobé kultivace došlo u těchto SCN k vzniku spontánních rytmických projevů a následné robustní oscilaci. To naznačuje, že hodiny mohou vyvíjet svou rytmickou povahu bez ohledu na vnější signály, jako jsou ty od matky (Čečmanová et al., 2019; Wreschnig et al., 2014).

Pozoruhodné je, že bioluminiscenční rytmy byly zaznamenány již čtyři dny před porodem (Landgraf et al., 2015; Carmona-Alcocer et al., 2018), tedy v době, kdy hladiny transkriptů *Per2* (Shimomura et al., 2001) a protein PER2 nebyly u in vivo fetálních SCN imunohistochemicky detekovatelné (Ansari et al., 2009; Sládek et al., 2004). Tato nepřítomnost proteinu PER2 v in vivo modelech se velmi odlišovala od bioluminiscence, která byla spojena s proteinem PER2 v in vitro modelech (Carmona-Alcocer et al., 2018; Landgraf et al., 2015; Wreschnig et al., 2014). Interpretace výsledků získaných pomocí in vitro modelu má ale jistá omezení, jelikož explantát fetálních SCN je vystaven mnoha nesespecifickým stimulům, jako jsou mechanické vlivy během jeho přípravy a kultivace či chemické látky obsažené v médiu, které nejsou ve stejných koncentracích přítomny v podmínkách in vivo. Oproti dospělým SCN jsou fetální SCN, kde ještě není vyvinuta mezibuněčná komunikace, na takové stimuly citlivější. Proces kultivace může poskytnout nevázaným oscilátorům počáteční signál v resetování ve stejný čas, což může vést k synchronizaci rytmů v rámci buněčné populace nebo dokonce k spuštění rytmů na buněčné úrovni (shrnutí v Sumová and Čečmanová, 2020). To znamená, že časování disekce tkáňového explantátu a expozice tkáně in vitro podmínkám média určuje počáteční fázi hodin v explantátech SCN plodu (Carmona-Alcocer et al., 2018; Wreschnig et al., 2014).

6.1.4 Synaptogeneze SCN

Proces synaptogeneze v SCN je pomalejší než proces neurogeneze. Ve vývojovém stádiu E19 jsou v SCN pozorovány pouze občasné synapse mezi neurony (Klein and Moore, 1991). Toto stádium přináší začátek diurnálních variací v metabolické aktivitě SCN (Reppert and Schwartz, 1984), což signalizuje počátek cirkadiálního chování, zahrnující denní a noční fluktuační některých parametrů. Mezi tyto parametry patří v E21 diurnální rozdíl v hladině mRNA Avp (Reppert and Uhl, 1987) a v E22 přichází diurnální rozdíl ve frekvenci výbojů neuronů (Shibata and Moore, 1987). Tyto poznatky naznačují, že v prenatálním období mohou být cirkadiální hodiny SCN neschopny generovat synchronizované oscilace (Sumová et al., 2008; Sumova et al., 2012).

Během prenatálního období obsahují SCN pouze malý počet synapsí, což je podobné in vitro kulturám disociovaných buněk SCN. V těchto in vitro kulturách jsou spoje mezi neurony také řídké či vůbec neexistují (Klein and Moore, 1991).

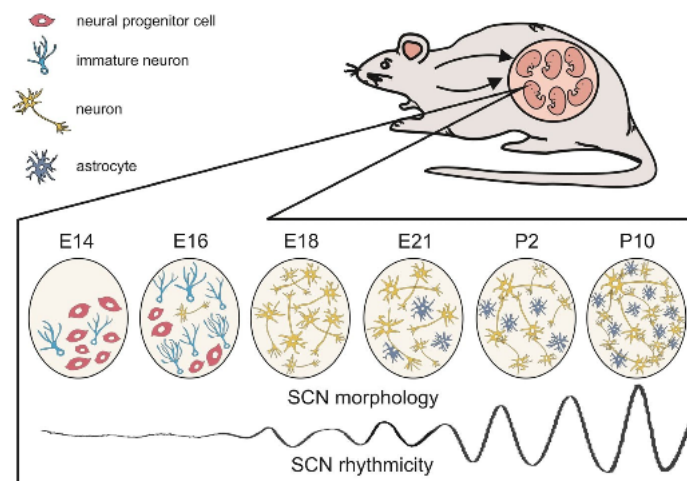
Zrychlení synaptogeneze se vyskytuje v pozdním prenatálním a brzkém postnatálním období (obrázek 5), kdy dochází k nárůstu počtu a hustoty synaptických spojení. Synaptogeneze se zvyšuje od P4 do P10, kdy také dosahuje svého maxima (Moore and Bernstein, 1989). První významné rytmy v expresi genů v populaci neuronů SCN potkana se tedy objevují paralelně s vývojem SCN.

Ve stádiu E19 u potkanů je neuropil v SCN řídký, převážně obsahující dendritické profily a pouze okrajové svazky malých nemyelinizovaných axonů a několik gliových buněk. Postupně od stadia E21 do P6 dochází k nárůstu počtu dendritických a axonálních profilů, stejně jako k nárůstu počtu synapsí. Růst počtu axonových zakončení je pomalý až do stadia P2, kdy stále představuje asi 10 % počtu u dospělých zvířat (Moore and Bernstein, 1989).

Podobně jako v jiných oblastech mozku následuje v SCN po neurogenезi proces astrogliogeneze. Astrocytární marker gliální fibrilární kyselý protein (Gfap) je poprvé detekovatelný krátce před narozením, u potkanů se jedná o E20 (Munekawa et al., 2000).

V prenatálním období jsou neurony SCN přítomny, ale jejich mezibuněčné spojení ještě není plně funkční (Weinert, 2005). K efektivnímu fungování cirkadiálních oscilátorů je třeba

dalšího vývoje genetických a molekulárních mechanismů, které umožní generování a synchronizaci vnitřních rytmů v SCN.



Obrázek 5 - Během perinatálního období se postupně vyvíjí morfologie a rytmičnost SCN u potkanů. Matčiny signály ovlivňují nezralá SCN plodu, což nastavuje fázi vývoje těchto cirkadiálních hodin. Ovály v řadě znázorňují SCN ve vyvíjejícím se embryonálním nebo postnatálním mozku potkana. Neurogenese SCN začíná kolem E14 a končí v E18, zatímco astrocyty se objevují až kolem E20 nebo E21. Na druhou stranu, proces synaptogeneze začíná těsně před porodem a pokračuje až do P10. Schematická křivka znázorňuje vývoj rytmu ve fetálních SCN, přičemž amplituda rytmu koreluje s morfologickým zráním SCN (Sumová and Čečmanová, 2020).

6.2 Ontogeneze periferních oscilátorů

Výzkum vývoje periferních hodin začal po objevu, že rytmy v expresi hodinových genů jsou přítomné v buňkách periferních orgánů, což naznačuje, že tyto rytmy nejsou omezeny pouze na centrální hodiny v SCN (Abe et al., 2001; Balsalobre, 2002; Schibler and Sassone-Corsi, 2002). Vývoj periferních hodin závisí na zrání orgánu, kde jsou hodiny umístěny, a také na vývoji molekulárního hodinového mechanismu. První projevy molekulárních oscilací mohou být velmi specifické pro daný orgán a druh organismu (Sakamoto et al., 2002; Shimomura et al., 2001; Sládek et al., 2004).

Propojení SCN a periferních tkání se zesiluje během prvního týdne po narození, kdy se zvyšuje aktivita a síla cirkadiálních genů (Sumová et al., 2008). V periferních tkáních savců ovlivňuje genovou expresi a funkci periferních tkání jak jejich vlastní buněčný oscilátor, tak signály z centrálního hodinového pacemakeru v SCN (Pando et al., 2002; Sumova et al., 2012).

Jako příklad uvedu pokusy na kardiomyocytech hlodavců:

Výzkum pomocí cirkadiálních genových reportérů a analýza časového sekvenování RNA (RNA-seq) odhalili absenci TTFL ve fetálních srdcích E10 – E12 a v raných stádiích diferenciaci ESC. Naopak u srdcí E18 byla oscilace jasně zaznamenána. Tato časová analýza RNA-seq na myších fetálních srdcích odhalila mnohem menší počet rytmických genů v srdcích E10 – E12 ve srovnání se srdci E17 – E19, což naznačuje nedostatek funkčních TTFL u základních cirkadiálních genů v myších fetálních srdcích E10. To může znamenat, že samotná diferenciaci buněčné linie, například kardiomyocytů nestačí k vytvoření genových oscilací a že k dokončení vývoje cirkadiálních hodin savců je nutný dodatečný mechanismus. I když buněčně autonomní cirkadiální hodiny v srdečních tkáních E10 nebyly aktivní, je možné, že mateřské cirkadiální rytmy ovlivňují nebo řídí fetální cirkadiální hodiny in vivo (Umemura et al., 2017).

7. Synchronizace během časné ontogeneze

Otázkou tedy zůstává, jak dochází k synchronizaci mezi buňkami nezralých SCN, jež ještě nemají rozvinutou synaptickou síť, což je klíčové pro rozpoznání rytmů na tkáňové úrovni. Víme, že u dospělých hodin je nejdůležitějším synchronizátorem diurnální proces, během perinatálního období to tak není. V tomto období jsou hodiny synchronizovány mateřskými signály, tedy nesvětelnými podněty.

7.1 Vliv mateřských faktorů na ontogenezi cirkadiálních hodin

Plod vyvíjející se v mateřském prostředí, je ovlivněn vnitřními rytmy matky, jako je teplota a denní spojené s příjmem potravy a hladinou melatoninu (shrnutí v Serón-Ferré et al., 2012). Předpokládáme, že v době, kdy mezibuněčné synchronizace ve fetálních SCN nejsou ještě úplně vyvinuty, mateřské signály mohou ovlivňovat tyto prenatální buněčné rytmické procesy (Davis and Gorski, 1988; Reppert and Schwartz, 1986; Serón-Ferré et al., 2012; Sumová et al., 2008), ale vývoj cirkadiálních rytmů není závislý na funkčních hodinách matky (Jud and Albrecht, 2006).

Zmíněný melatonin je jeden z mála hormonů mateřského těla, který prochází placentou v nezměněné podobě a vytváří cirkadiální rytmus v krevním oběhu plodu. To může

poskytovat plodu informaci o cyklech světla a tmy (Deguchi, 1975; Kennaway et al., 1992; Kennaway et al., 1996; McMillen and Nowak, 1989). Mezi další známé synchronizátory patří kromě hormonu melatoninu i dopamin. Receptory pro oba tyto hormony se nachází již v buňkách SCN plodu (Duncan and Davis, 1993; Reppert et al., 1988; Weaver et al., 1992). Melatonin je signálem noci a dopamin je naopak signál pro světelnou část dne. Bylo však zjištěno, že hormony nejsou jediným podnětem pro synchronizaci fetálních SCN.

Fetální cirkadiální hodiny oproti dospělým reagují na glukokortikoidy (GC), jak bylo dokázáno ve studii Čechmanová et al., 2019. Tyto GC jsou produkovány těhotnými samicemi, jejichž mateřská část placenty obsahuje vlastní cirkadiální hodiny. Tyto hodiny ovlivňují množství GC, které se dostávají k plodu, a to prostřednictvím genu *Hsd11b2* kódujícího enzym HSD2, který má klíčovou úlohu v metabolismu GC. Dále studie potvrzuje přítomnost receptorů GC ve fetálních SCN a jejich reakci na GC. Experimenty prokázaly, že GC mohou ovlivňovat expresi genů a fáze rytmů ve fetálních SCN. Výzkum ukazuje, že fetální SCN jsou citlivá na změny hladin GC in vivo i in vitro, což naznačuje, že fetální SCN mohou být citlivá na signály GC matky.

Pro podporu teorie o jevu, při kterém mateřský oscilátor působí na nevyvinutý fetální oscilátor byla analyzována data RNA-seq pro srdce plodu v období E17 – E19, což odhalilo synchronizované rytmy s podobnými vrcholovými fázemi. Tato pozorování naznačují silnou synchronizaci globální genové exprese s mateřskými signály. Nicméně, počet fluktuujících genů byl výrazně nižší a fáze jejich rytmů se více lišily u srdcí E10 – E12 než u srdcí E17 – E19, což naznačuje, že u plodů v ranějším stádiu reagoval na mateřské signály nevyvinutý fetální systém (Umemura et al., 2017).

Další studie se zaměřila na identifikaci reakcí fetálních SCN na různé rytmické signály matek. Studie využila transkriptomických a proteomických analýz dat odebraných z fetálních SCN v časech, kdy ještě nedošlo k plnému vývoji rytmů v expresi hodinových genů na úrovni buněčných populací (Greiner et al., 2022). Tímto způsobem se snažila rozluštit jaké mechanismy jsou zodpovědné za komunikaci mezi matkou a plodem a jak tyto signály ovlivňují vývoj SCN během prenatálního období.

Výzkum odhalil, že ve fetálních SCN potkanů ve věku E18 – E19 existuje malá skupina funkčně si blízkých genů a proteinů, které vykazují různé závislosti na analyzovaných podmínkách (Greiner et al., 2022). Tato zjištění naznačují, že vývoj fetálních SCN je ovlivněn jak vnitřními

signály vycházejícími z mateřského SCN, tak i vnějšími signály, jako jsou rytmické projevy chování nebo krmení matek (Nováková et al., 2010; Olejníková et al., 2015, 2018). Je důležité si uvědomit, že výsledky naznačují existenci komplexní sítě interakcí mezi matkou a plodem, které ovlivňují vývoj fetálních SCN.

Analýza také ukázala, že ve fetálních SCN jsou mateřskými signály řízeny rytmicky dvě skupiny genů, z nichž každá je spojena s různými biologickými procesy. Jedna skupina genů je hlavně zapojena do neuronální aktivity a signalizačních drah, zatímco druhá skupina je spojena s vývojem neuronů. Tato rozmanitost genů poukazuje na komplexnost procesů probíhajících ve fetálních SCN během prenatálního vývoje. Bylo zjištěno, že exprese většiny genů s neuronální aktivitou dosahuje vrcholu během fáze aktivity nebo krmení matky. To naznačuje, že stav aktivity a krmení matky může mít vliv na neuronální aktivity ve fetálních SCN a tím ovlivnit denní změny v expresi daných genů. Geny související s tvorbou neuronů reagují na metabolické účinky specifické stravy matky s vrcholy exprese ve stavu aktivity a začátku neaktivity. To poukazuje na další úroveň interakce mezi životním stylem matky a vývojem jejich potomků (Greiner et al., 2022).

Data z této studie naznačují, že v počáteční fázi vývoje fetálních SCN mohou mateřské podněty plnit funkci chybějící mezibuněčné sítě synapsí a ovlivňovat rytmy buněčných populací, dokud se hodiny SCN zcela nevyvinou. Většina periodicky se měnících genových aktivit dosahuje svého vrcholu ve fetálních SCN v době, která koresponduje s aktivitou nebo krmením matky. Toto naznačuje, že tyto časně se objevující rytmické změny v expresi určitých genů ve fetálních SCN jsou pravděpodobně odpovědí na signály pocházející od matky (Greiner et al., 2022).

Je tedy možné, že v průběhu vývoje plodu funguje cirkadiánní uspořádání tak, že SCN plodu a orgány jsou vnímány jako periferní oscilátory matky, které reagují na různé signály z matčina těla (Sumová et al., 2008).

8. Závěr

V mé práci jsem se zaměřila na buněčné cirkadiánní hodiny, zejména na jejich časnou ontogenezi a faktory ovlivňující tento proces. Cílem mé práce bylo zjistit, jak dochází k formování cirkadiánních hodin a jejich oscilacím v raném embryu, zejména v embryonálních kmenových buňkách, které se diferenciují do všech buněčných typů a mají již tyto buněčné hodiny plně vyvinuté. ES buňky jsou v raném vývoji ovlivňovány mnoha faktory, které mají dopad na jejich nefunkční cirkadiánní hodiny. Mezi tyto faktory můžeme zahrnout vliv ultradiánních rytmů segmentačních hodin a molekulární mechanismy udržující pluripotentní stav buněk.

Ukázalo se, že cirkadiánní hodiny a jejich oscilace v hladině hodinových genů nejsou nezbytné pro vznik cirkadiánních rytmů, jak dokazuje spontánní rytmus v příjmu glukózy u ranných embryí. Synchronizované oscilace v genové expresi hodinových genů procházejí postupným vývojem během ontogeneze, přičemž tento proces pokračuje i v postnatálním období. Pomocí in vitro metody bylo zjištěno, že hodiny mohou vyvíjet svou rytmickou povahu bez ohledu na vnější signály, jako jsou ty od matky. Přesto však matčiny signály pomáhají při synchronizaci hodin během časné ontogeneze a po jistou dobu nahrazují absenci mezibuněčných spojů. Během vývoje plodu mohou tedy fetální SCN být vnímána jako matčin periferní oscilátor.

Z mé práce vyplývá, že cirkadiánní hodiny nehrají zásadní roli v procesech, jako je vývoj ES buněk u savců, ale mohou být důležité pro regulaci některých fyziologických funkcí během vývoje. Ontogeneze buněčných hodin v ES buňkách probíhá postupně a vývoj cirkadiánních rytmů není zcela závislý na matce.

Prostor pro nové studie vidím například ve využití znalosti cirkadiánních rytmů v ES buňkách pro regenerační účely či ve zkoumání exprese a regulačních mechanismů hodinových genů a jejich proteinů v diferenciaci kmenových buněk in vivo.

9. Seznam použité literatury

(* - označení pro sekundární citace)

- Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Masubuchi, S., Ikeda, M., Ebihara, S., & Honma, K. ichi. (2001). Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice. *Molecular Brain Research*, 87(1), 92–99. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00295-3)
- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., & Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 350–356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00350.2002>
- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, 916(1-2), 172–191. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02890-6)
- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H., & Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current biology: CB*, 12(7), 540–550. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00759-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00759-5)
- Albrecht U. (2004). The mammalian circadian clock: a network of gene expression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9, 48–55. <https://doi.org/10.2741/1196>
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1986). The development of the rat hypothalamus. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 100, 1–178. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3788679/>
- Alvarez, J. D., Chen, D., Storer, E., & Sehgal, A. (2003). Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biology of reproduction*, 69(1), 81–91. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.011833>
- Amano, T., Matsushita, A., Hatanaka, Y., Watanabe, T., Oishi, K., Ishida, N., Anzai, M., Mitani, T., Kato, H., Kishigami, S., Saeki, K., Hosoi, Y., Iritani, A., & Matsumoto, K. (2009). Expression and functional analyses of circadian genes in mouse oocytes and preimplantation embryos: Cry1 is involved in the meiotic process independently of circadian clock regulation. *Biology of reproduction*, 80(3), 473–483. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069542>
- Ansari, N., Agathagelidis, M., Lee, C., Korf, H. W., & von Gall, C. (2009). Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars

- tuberculosis during mouse ontogeny. *The European journal of neuroscience*, 29(3), 477–489. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06605.x>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Hattar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature neuroscience*, 8(4), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn1419>
- Aton, S. J., Huetttner, J. E., Straume, M., & Herzog, E. D. (2006). GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19188–19193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607466103>
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30(2), 525–536. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00302-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00302-6)
- Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929–937. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81199-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81199-x)
- Balsalobre A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and tissue research*, 309(1), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0585-0>
- Besharse, J. C., & Iuvone, P. M. (1983). Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*, 305(5930), 133–135. <https://doi.org/10.1038/305133a0>
- Buijs, R. M., van Eden, C. G., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *The Journal of endocrinology*, 177(1), 17–26. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1770017>
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., & Bradfield, C. A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), 1009–1017. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00205-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00205-1)
- Carmona-Alcocer, V., Abel, J. H., Sun, T. C., Petzold, L. R., Doyle, F. J., 3rd, Simms, C. L., & Herzog, E. D. (2018). Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 38(6), 1326–1334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-17.2017>
- Čečmanová, V., Houdek, P., Šuchmanová, K., Sládek, M., & Sumová, A. (2019). Development and Entrainment of the Fetal Clock in the Suprachiasmatic Nuclei: The Role of Glucocorticoids. *Journal of biological rhythms*, 34(3), 307–322. <https://doi.org/10.1177/0748730419835360>

- Davis, F. C., & Gorski, R. A. (1988). Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 162(5), 601–610. <https://doi.org/10.1007/BF01342635>
- Deguchi T. (1975). Ontogenesis of a biological clock for serotonin:acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(7), 2814–2818. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.7.2814>
- Dierickx, P., Vermunt, M. W., Muraro, M. J., Creyghton, M. P., Doevendans, P. A., van Oudenaarden, A., Geijsen, N., & Van Laake, L. W. (2017). Circadian networks in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *EMBO reports*, 18(7), 1199–1212. <https://doi.org/10.15252/embr.201743897>
- Dolatshad, H., Cary, A. J., & Davis, F. C. (2010). Differential expression of the circadian clock in maternal and embryonic tissues of mice. *PLoS one*, 5(3), e9855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009855>
- Duncan, M. J., & Davis, F. C. (1993). Developmental appearance and age related changes in specific 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamsters. *Brain research. Developmental brain research*, 73(2), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90140-6)
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., & Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iε. *The Journal of biological chemistry*, 277(19), 17248–17254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111466200>
- Eide, E. J., & Virshup, D. M. (2001). Casein kinase I: another cog in the circadian clockworks. *Chronobiology international*, 18(3), 389–398. <https://doi.org/10.1081/cbi-100103963>
- *Foster, R. G., Hughes, S., & Peirson, S. N. (2020). Circadian Photoentrainment in Mice and Humans. *Biology*, 9(7), 180. <https://doi.org/10.3390/biology9070180>
- Greiner, P., Houdek, P., Sládek, M., & Sumová, A. (2022). Early rhythmicity in the fetal suprachiasmatic nuclei in response to maternal signals detected by omics approach. *PLoS biology*, 20(5), e3001637. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001637>
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms*, 20(5), 391–403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>

- Harima, Y., Imayoshi, I., Shimojo, H., Kobayashi, T., & Kageyama, R. (2014). The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes. *Seminars in cell & developmental biology*, 34, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.038>
- *Hastings M. H. (1997). Circadian clocks. *Current biology : CB*, 7(11), R670–R672. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00350-2)
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & O'Neill, J. S. (2008). Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Current biology : CB*, 18(17), R805–R815. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.021>
- Hastings, M. H., Reddy, A. B., & Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(8), 649–661. <https://doi.org/10.1038/nrn1177>
- Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y., & Tei, H. (2004). Temporal Precision in the Mammalian Circadian System: A Reliable Clock from Less Reliable Neurons. *Journal of Biological Rhythms*, 19(1), 35–46. <https://doi.org/10.1177/0748730403260776>
- Holmberg, J., & Perlmann, T. (2012). Maintaining differentiated cellular identity. *Nature reviews. Genetics*, 13(6), 429–439. <https://doi.org/10.1038/nrg3209>
- Hubaud, A., & Pourquié, O. (2014). Signalling dynamics in vertebrate segmentation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(11), 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrm3891>
- *Huber, G. C. (1915). The development of the albino rat, *Mus norvegicus albinus*. *Journal of Morphology*, 26(2), 247–358. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1050260205>
- Chekulaeva, M., & Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology*, 21(3), 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.009>
- Inada, Y., Uchida, H., Umemura, Y., Nakamura, W., Sakai, T., Koike, N., & Yagita, K. (2014). Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS letters*, 588(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.007>
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., & Weissman, J. S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147(4), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.002>
- Jud, C., & Albrecht, U. (2006). Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *Journal of biological rhythms*, 21(2), 149–154. <https://doi.org/10.1177/0748730406286264>

- Karman, B. N., & Tischkau, S. A. (2006). Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, *75*(4), 624–632. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.050732>
- Kennaway, D. J., Goble, F. C., & Stamp, G. E. (1996). Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *81*(4), 1525–1532. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.4.8636362>
- Kennaway, D. J., Stamp, G. E., & Goble, F. C. (1992). Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *75*(2), 367–369. <https://doi.org/10.1210/jcem.75.2.1639937>
- *Klein, D. C., Moore, R. Y., and Reppert, S. M. (1991). *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-506250-2
- Kováčiková, Z., Sládek, M., Bendová, Z., Illnerová, H., & Sumová, A. (2006). Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(2), 140–148. <https://doi.org/10.1177/0748730405285876>
- Lakin-Thomas, P. L. (2006). Transcriptional feedback oscillators: Maybe, maybe not... *Journal of Biological Rhythms*, *21*(2), 83–92. <https://doi.org/10.1177/0748730405286102>
- Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2005). The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(11), 4180–4184. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500901102>
- Landgraf, D., Achten, C., Dallmann, F., & Oster, H. (2015). Embryonic development and maternal regulation of murine circadian clock function. *Chronobiology International*, *32*(3), 416–427. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.986576>
- Leak, R. K., & Moore, R. Y. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of comparative neurology*, *433*(3), 312–334. <https://doi.org/10.1002/cne.1142>
- Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, *107*(7), 855–867. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00610-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00610-9)
- Lu, C., Yang, Y., Zhao, R., Hua, B., Xu, C., Yan, Z., Sun, N., & Qian, R. (2016). Role of circadian gene Clock during differentiation of mouse pluripotent stem cells. *Protein & cell*, *7*(11), 820–832. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0319-9>
- Matsuda, M., Yamanaka, Y., Uemura, M., Osawa, M., Saito, M. K., Nagahashi, A., Nishio, M., Guo, L., Ikegawa, S., Sakurai, S., Kihara, S., Maurissen, T. L., Nakamura, M., Matsumoto,

- T., Yoshitomi, H., Ikeya, M., Kawakami, N., Yamamoto, T., Woltjen, K., ... Alev, C. (2020). Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells. *Nature*, *580*(7801), 124–129. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2144-9>
- Pando, M. P., Morse, D., Cermakian, N., & Sassone-Corsi, P. (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, *110*(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00803-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00803-6)
- McMillen, I. C., & Nowak, R. (1989). Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *The Journal of endocrinology*, *120*(3), 459–464. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1200459>
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S., & Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, *454*(7200), 49–55. <https://doi.org/10.1038/nature07056>
- Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., Hayes, K. R., Zhang, J., Andrews, J. L., Antoch, M. P., Walker, J. R., Esser, K. A., Hogenesch, J. B., & Takahashi, J. S. (2007). Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3342–3347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611724104>
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., & Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes & development*, *15*(8), 995–1006. <https://doi.org/10.1101/gad.873501>
- Moore, R. Y., & Bernstein, M. E. (1989). Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *9*(6), 2151–2162. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-02151.1989>
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience letters*, *150*(1), 112–116. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90120-a](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90120-a)
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and tissue research*, *309*(1), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>
- Morishige, W. K., Pepe, G. J., & Rothchild, I. (1973). Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, *92*(5), 1527–1530. <https://doi.org/10.1210/endo-92-5-1527>

- Morse, D., Cermakian, N., Brancorsini, S., Parvinen, M., & Sassone-Corsi, P. (2003). No circadian rhythms in testis: Period1 expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(1), 141–151. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0184>
- Munekawa, K., Tamada, Y., Iijima, N., Hayashi, S., Ishihara, A., Inoue, K., Tanaka, M., & Ibata, Y. (2000). Development of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of the rat: with special reference to the involvement of the optic nerve. *Experimental neurology*, *166*(1), 44–51. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7490>
- Nováková, M., Sládek, M., & Sumová, A. (2010). Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light-dark regime. *Journal of Biological Rhythms*, *25*(5), 350–360. <https://doi.org/10.1177/0748730410377967>
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., & Honma, K. (2002). Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *The European journal of neuroscience*, *15*(12), 1953–1960. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02016.x>
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., & Honma, K. (2003). Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *The European journal of neuroscience*, *17*(8), 1628–1634. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02584.x>
- Olejníková, L., Polidarová, L., Behuliak, M., Sládek, M., & Sumová, A. (2018). Circadian alignment in a foster mother improves the offspring's pathological phenotype. *The Journal of physiology*, *596*(23), 5757–5775. <https://doi.org/10.1113/JP275585>
- Olejníková, L., Polidarová, L., Paušlyová, L., Sládek, M., & Sumová, A. (2015). Diverse development and higher sensitivity of the circadian clocks to changes in maternal-feeding regime in a rat model of cardio-metabolic disease. *Chronobiology international*, *32*(4), 531–547. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1014095>
- O'Neill, J. S., & Reddy, A. B. (2011). Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, *469*(7331), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature09702>
- Paulose, J. K., Rucker, E. B., 3rd, & Cassone, V. M. (2012). Toward the beginning of time: circadian rhythms in metabolism precede rhythms in clock gene expression in mouse embryonic stem cells. *PloS one*, *7*(11), e49555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049555>
- Pittendrigh, C.S., Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J. Comp. Physiol.* *106*, 333–355. <https://doi.org/10.1007/BF01417860>

- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00825-5)
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(2), 600–605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00600.2000>
- Putker, M., & O'Neill, J. S. (2016). Reciprocal Control of the Circadian Clock and Cellular Redox State - a Critical Appraisal. *Molecules and cells*, *39*(1), 6–19. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2323>
- Reddy, A. B., & Rey, G. (2014). Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. *Annual review of biochemistry*, *83*, 165–189. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035623>
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1984). The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *4*(7), 1677–1682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-07-01677.1984>
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1986). Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *6*(9), 2724–2729. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-09-02724.1986>
- Reppert, S. M., & Uhl, G. R. (1987). Vasopressin messenger ribonucleic acid in supraoptic and suprachiasmatic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinology*, *120*(6), 2483–2487. <https://doi.org/10.1210/endo-120-6-2483>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Rivkees, S. A., & Stopa, E. G. (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science (New York, N.Y.)*, *242*(4875), 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.2845576>
- Rosenblatt, J. S., Mayer, A. D., & Giordano, A. L. (1988). Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, *13*(1-2), 29–46. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(88\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0306-4530(88)90005-4)
- Sakamoto, K., Oishi, K., Nagase, T., Miyazaki, K., & Ishida, N. (2002). Circadian expression of clock genes during ontogeny in the rat heart. *Neuroreport*, *13*(10), 1239–1242. <https://doi.org/10.1097/00001756-200207190-00003>

- *Sato, S., Hishida, T., Kinouchi, K., Hatanaka, F., Li, Y., Nguyen, Q., Chen, Y., Wang, P. H., Kessenbrock, K., Li, W., Izpisua Belmonte, J. C., & Sassone-Corsi, P. (2023). The circadian clock CRY1 regulates pluripotent stem cell identity and somatic cell reprogramming. *Cell reports*, 42(6), 112590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112590>
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
- *Serón-Ferré, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F. J., Reynolds, H. E., Llanos, A. J., Rojas, A., Valenzuela, G. J., & Torres-Farfan, C. (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.039>
- 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. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), 1013–1019. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1013>
- Shibata, S., & Moore, R. Y. (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, 431(2), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90220-3)
- Shimomura, H., Moriya, T., Sudo, M., Wakamatsu, H., Akiyama, M., Miyake, Y., & Shibata, S. (2001). Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *The European journal of neuroscience*, 13(4), 687–693. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01438.x>
- Schibler, U., Ripperger, J., & Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *Journal of biological rhythms*, 18(3), 250–260. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003007>
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111(7), 919–922. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01225-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01225-4)
- Sládek, M., Rybová, M., Jindráková, Z., Zemanová, Z., Polidarová, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pácha, J., & Sumová, A. (2007). Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 133(4), 1240–1249. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.053>
- Sládek, M., Sumová, A., Kováčiková, Z., Bendová, Z., Laurinová, K., & Illnerová, H. (2004). Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6231–6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401149101>

- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, *136*(4), 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- *Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., & Franklin, C. L. (2005). Embryology and Teratology. In *The Laboratory Rat*. Elsevier Science & Technology. <https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50031-5>
- Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., El-Hennamy, R., Laurinová, K., Jindráková, Z., & Illnerová, H. (2006). Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS letters*, *580*(12), 2836–2842. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.023>
- *Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., El-Hennamy, R., Matejů, K., Polidarová, L., Sosniyenko, S., & Illnerová, H. (2008). Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiological research*, *57 Suppl 3*, S139–S148. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931458>
- *Sumová, A., & Čečmanová, V. (2020). Mystery of rhythmic signal emergence within the suprachiasmatic nuclei. *The European journal of neuroscience*, *51*(1), 300–309. <https://doi.org/10.1111/ejn.14141>
- Sumova, A., Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M., & Houdek, P. (2012). Circadian system from conception till adulthood. *Progress in brain research*, *199*, 83–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00005-8>
- *Takahashi, J. S. (2016). Molecular architecture of the circadian clock in mammals. *Research and Perspectives in Endocrine Interactions*, *0*, 13–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27069-2_2/FIGURES/7
- Umemura, Y., Koike, N., Matsumoto, T., Yoo, S. H., Chen, Z., Yasuhara, N., Takahashi, J. S., & Yagita, K. (2014). Transcriptional program of Kpna2/Importin- α 2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), E5039–E5048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419272111>
- *Umemura, Y., Koike, N., Ohashi, M., Tsuchiya, Y., Meng, Q. J., Minami, Y., Hara, M., Hisatomi, M., & Yagita, K. (2017). Involvement of posttranscriptional regulation of *Clock* in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(36), E7479–E7488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703170114>
- Umemura, Y., Koike, N., Tsuchiya, Y., Watanabe, H., Kondoh, G., Kageyama, R., & Yagita, K. (2022). Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 119(1), e2114083119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2114083119>

- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), 627–630. <https://doi.org/10.1038/19323>
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5159), 719–725. <https://doi.org/10.1126/science.8171325>
- Weaver, D. R., Rivkees, S. A., & Reppert, S. M. (1992). D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9201–9204. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9201>
- *Weger, M., Diotel, N., Dorsemans, A. C., Dickmeis, T., & Weger, B. D. (2017). Stem cells and the circadian clock. *Developmental biology*, 431(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.012>
- Weinert D. (2005). Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiology international*, 22(2), 179–205. <https://doi.org/10.1081/cbi-200053473>
- *Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, 551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Wreschnig, D., Dolatshad, H., & Davis, F. C. (2014). Embryonic development of circadian oscillations in the mouse hypothalamus. *Journal of biological rhythms*, 29(4), 299–310. <https://doi.org/10.1177/0748730414545086>
- *Yagita K. (2024). Emergence of the circadian clock oscillation during the developmental process in mammals. *Current opinion in genetics & development*, 84, 102152. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102152>
- Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J., & Uchiyama, Y. (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3846–3851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913256107>

- Yamajuku, D., Shibata, Y., Kitazawa, M., Katakura, T., Urata, H., Kojima, T., Takayasu, S., Nakata, O., & Hashimoto, S. (2011). Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS letters*, *585*(14), 2217–2222. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.038>
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., & Takumi, T. (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC molecular biology*, *5*, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-5-18>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5466), 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yasuhara, N., Yamagishi, R., Arai, Y., Mehmood, R., Kimoto, C., Fujita, T., Touma, K., Kaneko, A., Kamikawa, Y., Moriyama, T., Yanagida, T., Kaneko, H., & Yoneda, Y. (2013). Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Developmental cell*, *26*(2), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.022>
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yoshitane, H., Asano, Y., Sagami, A., Sakai, S., Suzuki, Y., Okamura, H., Iwasaki, W., Ozaki, H., & Fukada, Y. (2019). Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Communications biology*, *2*, 300. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0522-3>
- Zhang, Y., Meng, N., Bao, H., Jiang, Y., Yang, N., Wu, K., Wu, J., Wang, H., Kong, S., & Zhang, Y. (2019). Circadian gene PER1 senses progesterone signal during human endometrial decidualization. *The Journal of endocrinology*, JOE-19-0284.R2. Advance online publication. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0284>