

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetik eukaryot



Bc. Klára Janáčová

Úloha glukokortikoidů při synchronizaci fetálních suprachiasmatických jader

Role of glucocorticoids in synchronization of fetal suprachiasmatic nuclei

Diplomová práce

Školitelka: 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, 27.4.2024

Bc. Klára Janáčková

Poděkování

Děkuji své školitelce prof. PharmDr. Aleně Sumové, CSc., DSc. za její pomoc a cenné připomínky. Dále děkuji všem zaměstnancům a studentům Oddělení biologických rytmů Fyziologického ústavu AV ČR za rady při realizaci pokusů a přípravu organotypických explantátů.

Abstrakt

Vývoj a synchronizace fetálních suprachiasmatických jader (SCN) jsou řízeny mateřskými podmínkami, mimo jiné hormony procházející v cirkadiálním rytmu placentou. Nedávná studie poukázala na působení glukokortikoidů (GC) na fetální SCN *in vitro* a *in vivo*, přičemž po aplikaci syntetického GC dexametazonu (DEX) *in vivo* byla zaznamenána regulace genové exprese *c-Fos* (Čečmanová et al., 2019). S využitím organotypických explantátů SCN ze 17. embryonálního dne (E17) transgenního myšího modelu *mPer2^{Luc}* bylo navázáno na prvotní studii s cílem bližšího objasnění působení GC při aplikaci *in vitro*. Záznamem PER2-bioluminiscence E17 SCN explantátů v reálném čase bylo potvrzeno, že DEX zvyšuje amplitudu E17 SCN explantátů a aplikace DEX v CT 15-18 vede k fázovému předběhnutí rytmu. Specificita působení DEX byla potvrzena aplikací antagonisty glukokortikoidových receptorů, mifepristonu. Inhibice signálních drah protein kináz A a C, vedoucích k regulaci genové exprese *c-Fos*, neměla na působení DEX *in vitro* u E17 SCN explantátů žádný vliv. Zaznamenán nebyl ani vliv DEX na dynamiku degradace hodinového proteinu PER2. Pomocí nově zavedené metody izolace RNA následované RT-qPCR byla u E17 SCN explantátů po 1h od aplikace DEX detekována zvýšená hladina *c-Fos* v porovnání s kontrolní skupinou VEH, zatímco při aplikaci DEX v CT 4 nebyl tento rozdíl zaznamenán. Po 3h od aplikace DEX v CT 16 již nebyla zvýšená hladina *c-Fos* detekována. Na expresi dalších z testovaných genů, konkrétně *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1*, *Per1*, *Per2* a *E4bp4*, neměl DEX vliv při aplikaci v CT 4 ani CT 16 po 1h ani 3h působení.

Klíčová slova: fetus, glukokortikoidy, suprachiasmatická jádra, cirkadiální hodiny, synchronizace

Abstract

The development and entrainment of fetal suprachiasmatic nuclei (SCN) are controlled by maternal cues, including hormones that cross through the placenta in a circadian rhythm. A recent study highlighted the effect of glucocorticoids (GC) on fetal SCN both *in vitro* and *in vivo*, where the application of the synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX) *in vivo* regulated the *c-Fos* gene expression (Čečmanová et al., 2019). Using organotypic SCN explants from embryonic day 17 (E17) of a transgenic *mPer2^{Luc}* mouse model, this research built on the initial study to further elucidate the action of GC upon *in vitro* application. Real-time recording of PER2-bioluminescence in E17 SCN explants confirmed that DEX increases the amplitude of E17 SCN explants, and DEX application at CT 15-18 leads to a phase advance of the rhythm. The specificity of the DEX effect was confirmed by application of the glucocorticoid receptor antagonist, mifepristone. Inhibition of the protein kinase A and C signalling pathways, which regulate *c-Fos* gene expression had no effect on DEX action *in vitro* in E17 SCN explants. No effect of DEX on PER2 protein turnover was observed. Using a newly optimized RNA isolation method followed by RT-qPCR, an increased level of *c-Fos* was detected in E17 SCN explants 1h after DEX application at CT 16 compared to the VEH control group, while this difference was not observed when DEX was applied at CT 4. After 3h of DEX application at CT 16, no increased level of *c-Fos* was detected in DEX-treated explants compared to VEH-treated explants. For the other genes tested, namely *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1*, *Per1*, *Per2* and *E4bp4*, DEX had no effect when applied at CT 4 or CT 16 after 1h or 3h of exposure.

Key words: fetus, glucocorticoids, suprachiasmatic nuclei, circadian clock, synchronization

Seznam použitých zkratek

11 β -HSD1,2	11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza 1,2
ADX	adrenaloctemie
AVP	arginin-vazopresin
B2M	beta-2-mikroglobulin
BMAL1	angl. Brain and muscle Arnt-like protein-1
BME	β -Merkaptoethanol
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CCG	hodinami kontrolované geny
CK1	kasein kináza 1
CLOCK	angl. Circadian locomotor output cycles kaput
CORT	kortikosteron
CRE	cAMP responzivní element
CREB	cAMP responzivní element-vázající protein
CRY1,2	angl. Cryptochrome
CT	cirkadiánní čas
DBP	D-box vázající PAR bZIP
DEX	dexametazon
dmSCN	dorzomediální suprachiasmatické jádro
E17	17. embryonální den
E4BP4	jaderný faktor regulovaný interleukinem 3
FKBP4	FK506-vázající protein 52
FKBP5	FK506-vázající protein 51
FM	přední oligonukleotid (angl. forward primer), myš
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	glukokortikoidy
GILZ	glukokortikoidy indukovaný leucinový zip
GR (NR3C1)	glukokortikoidový receptor
GRE	glukokortikoidový responzivní element
GSK3	kináza glykogen syntázy
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HSD1	hydroxysteroid dehydrogenáza 1

CHX	cykloheximid
LBD	ligand vázající doména
LD 12:12	režim 12 hodin světla (L) a 12 hodinách tmy (D)
LL	režim stálého světla
LUC	luciferáza
MIF	mifepriston
MR	mineralokortikoidní receptor
NPAS2	angl. Neuronal PAS domain protein 2
NR1D1,2 (REV-ERB α , β)	jaderný receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 1/2
NR1F1 (ROR α)	retinoidní sirotčí receptor α
P10	10. postnatální den
PER1,2	angl. Period
PGK1	fosfoglycerát kináza 1
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PKG	protein kináza G
RHT	retinohypotalamický trakt
RM	zadní oligonukleotid (angl. reverse primer), myš
SCN	suprachiasmatická jádra
SD	směrodatná odchylka
SGK1	sérem a glukokortikoidy indukovaná kináza 1
TF	transkripční faktor
VEH	vehikulum
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
vlSCN	ventrolaterální SCN
YWHAZ	tyrosin 3-monooxygenáza/ tryptofan 5-monooxygenáza aktivující protein zeta
ZT	Zeitgeber čas
GFAP	gliální fibrilární acidický protein

1	Úvod.....	9
2	Přehled literatury	10
2.1	Cirkadiánní systém savců.....	10
2.1.1	Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin	10
2.1.2	Parametry cirkadiánního rytmu	12
2.1.3	Uspořádání cirkadiánního systému	12
2.2	SCN.....	13
2.2.1	Stavba a struktura SCN	13
2.2.2	Vývoj SCN ve fetálním období.....	14
2.3	GC a cirkadiánní hodiny	17
2.3.1	Regulace syntézy a sekrece GC cirkadiánním systémem	17
2.3.2	Mechanismus působení GC.....	18
2.3.3	GC a hodiny periferních tkání.....	21
2.4	Vliv GCN na SCN.....	23
2.4.1	Vliv GC na SCN v postnatálním období.....	23
2.4.2	Vliv GC na vývoj a synchronizaci fetálních SCN.....	24
3	Cíle diplomové práce	27
4	Materiál a metody.....	28
4.1	Laboratorní zvířata	28
4.2	Použité chemikálie a kity	29
4.3	Příprava roztoků a médií	30
4.4	Příprava organotypických E17 SCN explantátů.....	31
4.5	Nahrávání bioluminiscence E17 SCN explantátů v přístroji LumiCycle	32
4.5.1	<i>In vitro</i> aplikace DEX, MIF, H-89 a Gö-6983 a VEH.....	32
4.5.2	Analýza degradace proteinu PER2.....	33
4.5.3	Měřené parametry a statistická analýza dat z Lumicyclu	33
4.6	Izolace RNA, RT a RT-qPCR z E17 SCN	34
5	Výsledky.....	40
5.1	Vliv aplikace DEX na parametry cirkadiánních hodin E17 SCN	40
5.2	Mechanismy působení GC v E17 SCN	50
5.2.1	Analýza degradace proteinu PER2.....	50
5.2.2	Inhibice PKA a PKC signálních drah.....	51
5.3	RT-qPCR z E17 SCN explantátů.....	53

5.3.1	Expresse hodinových genů v CT 5 a CT 17	55
5.3.2	Aplikace DEX v CT 4 a CT 16 <i>in vitro</i>	56
6	Diskuze	59
6.1	Vliv DEX na parametry cirkadiálních hodin ve fetálních SCN	59
6.2	Mechanismy působení GC ve fetálních SCN	61
6.3	RT q-PCR z E17 SCN explantátů	62
6.3.1	Expresse hodinových genů	63
6.3.2	Vliv aplikace DEX na úrovni transkriptů	64
6.4	Limity práce a možnosti dalšího výzkumu	66
7	Souhrn	68
8	Seznam použité literatury	69

1 Úvod

Za účelem adaptace na pravidelné změny ve vnějším prostředí byly v průběhu evoluce u organismů vyvinuty endogenní biologické hodiny. Hodiny s periodou přibližně 24 hodin se nazývají cirkadiánní. Cirkadiánní hodiny řídí pravidelné opakování mnoha biologických procesů. Jedná se například o cyklus spánku a bdění, řízení tělesné teploty, produkci a sekreci hormonů a další metabolické procesy, jako je například glukozová homeostáza a metabolismus lipidů. U savců jsou centrální hodiny uloženy v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu. Cirkadiánní hodiny v SCN jsou s okolním prostředím synchronizovány pomocí externích časových signálů (něm. Zeitgeber). Pro dospělá SCN jsou dominantním Zeitgeberem světelné signály. Endogenní rytmus cirkadiánního systému však přetrvává i v nepřítomnosti Zeitgeberů, například za stále tmy. V takovém případě hodiny tzv. volně běží. Vývoj cirkadiánního systému a hodin v SCN začíná již v prenatálním období. Pro synchronizaci fetálních SCN jsou dominantními Zeitgebery rytmické signály od matky. Mezi tyto signály patří zejména mateřské hormony rytmicky procházející placentou, mimo jiné steroidní hormony glukokortikoidy (GC). GC významně ovlivňují cirkadiánní hodiny v periferních orgánech a patří mezi hlavní signální molekuly mezi centrálními a periferními hodinami. Nedávná studie prokázala důležitou roli mateřských GC také při vývoji a synchronizaci hodin ve fetálních SCN. *In vitro* aplikace syntetického agonisty glukokortikoidového receptoru, dexametazonu (DEX), zvýšila amplitudu rytmu, a v závislosti na konkrétním čase aplikace významně posouvala fázi cirkadiánních hodin ve fetálních SCN. Při *in vivo* podání DEX březím samicím byla ve fetálních SCN zaznamenána snížená exprese *c-Fos* (Čečmanová et al., 2019). Diplomová práce navazuje na tyto výsledky s cílem podrobněji objasnit mechanismus působení GC při vývoji a synchronizaci hodin fetálních SCN. Pro výzkum jsou využívány organotypické explantáty fetálních SCN odebrané v 17. embryonálním dni (E17) z transgenního myšího modelu *mPer2^{Luc}*.

2 Přehled literatury

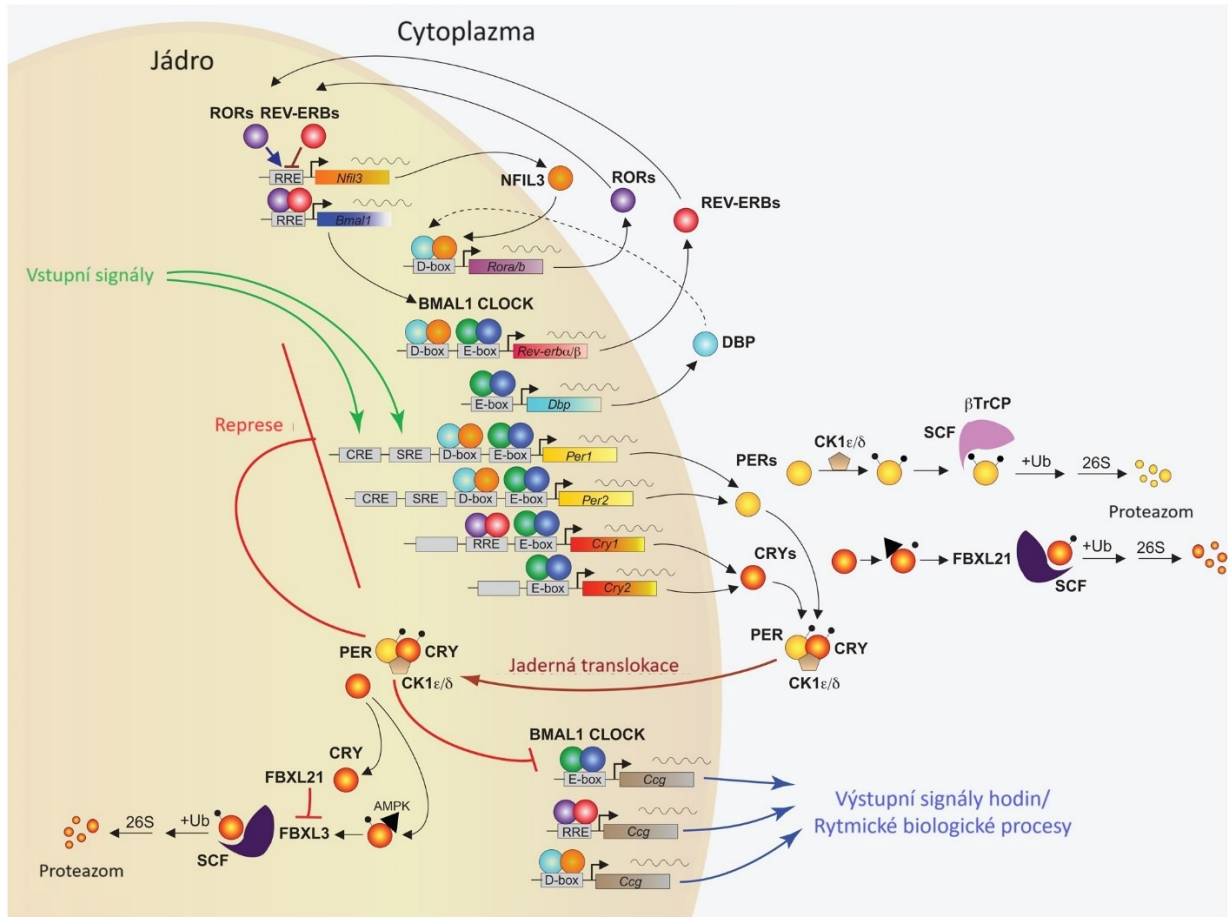
2.1 Cirkadiánní systém savců

2.1.1 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin

U savců se cirkadiánní hodiny nacházejí pravděpodobně v každé jaderné buňce. Základem je tzv. transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka, která reguluje expresi hodinových genů (Obr. 1). U savců tuto smyčku tvoří hodinové geny *Circadian locomotor putput cycles kaput (Clock)* a jeho paralog *Neuronal PAS domain protein 2 (Npas2)*, *Brain and muscle Arnt-like protein-1 (Bmal1)*, *Period1, 2, 3 (Per1, Per2, Per3)* a *Cryptochrome1,2 (Cry1, Cry2)*. Proteiny CLOCK a BMAL1 jsou transkripčními faktory (TF), působícími ve formě heterodiméru CLOCK::BMAL1. V průběhu subjektivního dne CLOCK::BMAL1 aktivuje transkripci proteinů PER a CRY skrze E-box v jejich promotorech (Gekakis et al., 1998). PER a CRY se akumulují v cytoplazmě a na konci subjektivního dne utvářejí společně s kasein kinázou I (CKI) proteinový komplex, který následně translokuje do jádra. V průběhu subjektivní noci tyto proteinové komplexy interagují s heterodimérem CLOCK::BMAL1, inhibují jeho transkripční aktivitu, a tím zpětnovazebně regulují svou vlastní expresi (Lee et al., 2001). Na konci subjektivní noci jsou proteiny CRY a PER degradovány a transkripční aktivita heterodiméru CLOCK::BMAL1 je obnovena (Shearman et al., 2000). Degradace PER a CRY je regulována posttranslačními modifikacemi. Protein PER2 je fosforylován CK1 a následně degradován v proteazomu (Lee et al., 2001). Proteiny CRY1,2 jsou označeny k proteozomální degradaci E3 ubikvitin ligázovým komplexem SCF-*Fbx13* (Busino et al., 2007). Degradaci CRY dále reguluje kináza glykogen syntázy 3 β (GSK3 β) (Harada et al., 2005). GSK3 β je významnou kinázou molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin, dále se podílí například na jaderné translokaci proteinu PER2 (Iitaka et al., 2005).

Kromě proteinů PER a CRY heterodimér CLOCK::BMAL1 iniciuje transkripci *Nr1d1*, kódující jaderný receptor REV-ERB α , *Nr1d2* kódující jaderný receptor REV-ERB β a *Nr1f1* kódující retinoidní sirotčí receptor ROR α . ROR α zpětnovazebně aktivuje expresi *Bmal1*, REV-ERB α naopak jeho expresi inhibuje (Guillaumond et al., 2005). Dalším z genů regulovaným heterodimérem CLOCK::BMAL1 je TF *D-box vázající PAR (DBP)* (Ripperger & Schibler, 2006). DBP a jaderný faktor regulovaný interleukinem 3 (E4BP4) se podílejí na regulaci transkripce tzv. hodinami kontrolovaných genů (CCG). Při vazbě DBP na D-box v promotorech CCG je jejich transkripce aktivována, vazbou E4BP4 naopak inhibována. Vzájemná kooperace mezi DBP a E4BP4 přispívá k rytmické expresi konkrétních CCG (Yoshitane et al., 2019). CCG jsou zapojeny v regulaci mnoha rozličných procesů organismu

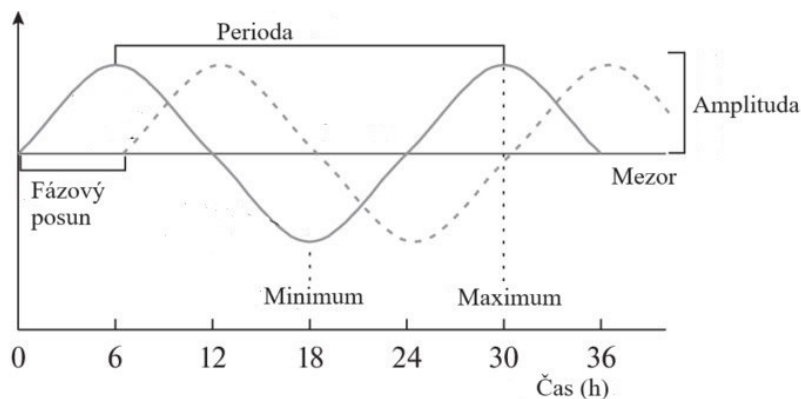
a jejich exprese je silně tkáňově specifická. Jedná se například o geny zapojené v regulaci buněčného dělení, metabolismu, sekreci hormonů, modulaci imunitní odpovědi, atd. (shrnuje v Rijo-Ferreira & Takahashi, 2019).



Obr. 1 **Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin.** Základ tvoří negativní transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka hodinových genů *Clock*, *Bmal1*, *Per* a *Cry*. Přidavná smyčka je tvořena jadernými faktory *REV-ERBa* a *RORa*, které zpětnovazebně regulují expresi *Bmal1*. Důležitou součástí molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin jsou posttranslační modifikace, které mimo jiné regulují degradaci proteinů *PER* a *CRY* a délku periody cyklu. Upraveno z (Cox & Takahashi, 2019).

2.1.2 Parametry cirkadiálního rytmu

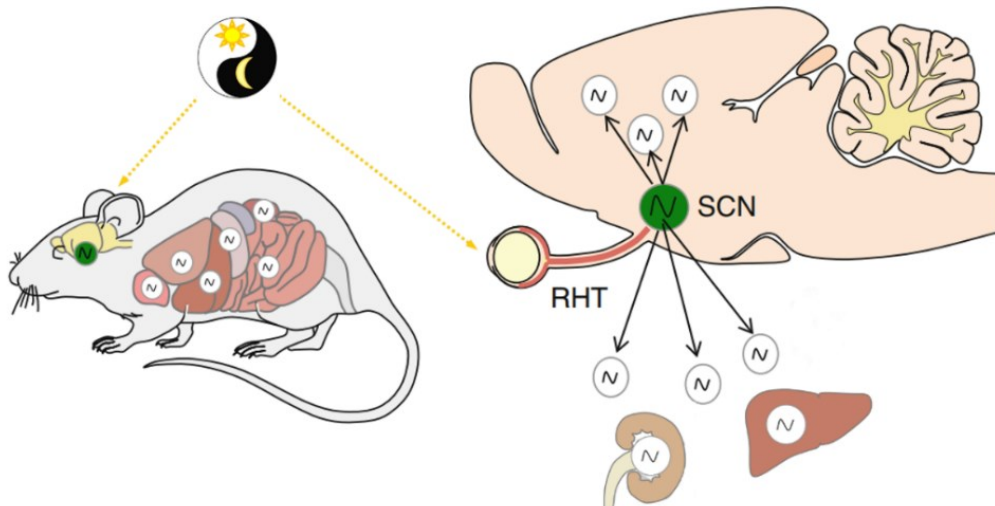
Cirkadiální rytmus je charakterizován čtyřmi základními parametry, a to fází, periodou, amplitudou a mezorem (Obr. 2). Fáze vyjadřuje časový vztah mezi referenčním bodem rytmu, například jeho maximální hodnotou (acropfáze), a fixním externím časovým bodem, například začátkem subjektivní noci. Pokud dojde k posunutí fáze rytmu oproti očekávané fázi, jedná se o tzv. fázový posun. Perioda vyjadřuje časový interval mezi dvěma referenčními body, například mezi dvěma maximy. Délka periody volně běžících hodin je druhově specifická a pohybuje se okolo 24 hodin. Na délku přesně 24 hodin je perioda upravována působením Zeitgeberů. Amplituda je definována jako maximální odchylka od střední hodnoty měřené veličiny, neboli mezoru (shrnutí v Reid, 2019).



Obr. 2 Základní parametry cirkadiálních hodin: amplituda, perioda a fáze. Upraveno z (Khizhkin et al., 2018).

2.1.3 Uspořádání cirkadiálního systému

Cirkadiální systém savců je složen ze vstupních drah zprostředkovávajících přenos informací z externího prostředí, oscilátorů generujících cirkadiální rytmy a výstupních drah pro komunikaci centrálního oscilátoru s dalšími částmi organismu (Obr. 3). Jednotlivé cirkadiální oscilátory jsou v organismech hierarchicky uspořádány (Pittendrigh, 1960). Centrální oscilátor se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu (Stephan & Zucker, 1972). Pomocí výstupních neurálních a hormonálních signálů synchronizují SCN hodiny v ostatních částech mozku a periferních orgánech (Pittendrigh, 1960). Nejedná se však o výhradní kontrolu, rytmus periferních hodin je dále regulován dalšími faktory. Dominantními Zeitgebery v periferních orgánech jsou podmínky související s příjmem potravy. Přijímání potravy v nepřírozenou denní dobu tak vede k posunutí fáze hodin v periferních tkáních a desynchronizaci centrálních a periferních hodin (angl. decoupling) (Le Minh, 2001).



Obr. 3 Schématické znázornění savčího cirkadiálního systému. SCN uložená v hypotalamu jsou s vnějším prostředím synchronizována pomocí světelných signálů. Skrze neuronální a hormonální signály SCN synchronizuje hodiny periferních tkání. Upraveno z (Korf & Von Gall, 2013).

2.2 SCN

2.2.1 Stavba a struktura SCN

SCN jsou bilaterální struktura nacházející se v anteriorní části hypotalamu nad křížením očních nervů. Tato lokace umožňuje vnímání střídání světla a tmy a správnou synchronizaci cirkadiálních hodin s okolním časem (S. T. Inouye & Kawamura, 1979). SCN jsou u hlodavců tvořena přibližně 20,000 neurony a gliovými buňkami oscilujícími ve stejné fázi a rytmu. Synchronizace fáze rytmu mezi jednotlivými neurony vede k signálu pozorovatelnému na tkáňové úrovni. Izolované neurony SCN v *in vitro* podmínkách pokračují ve spontánním generování cirkadiálního rytmu (Welsh et al., 1995).

Každé SCN je rozděleno do dvou prostorově oddělených podoblastí, tvořených strukturálně a funkčně odlišitelnými neurony (R. Y. Moore et al., 2002). Ventrolaterální část (vlSCN), neboli jádro (angl. core) je silně fotosenzibilní. Přijímané světlené signály jsou dále skrze spojení neuronů předávány do části dorsomediální (dmSCN), tzv. obalu (Gu et al., 2016). Neurony každé z podoblastí produkují specifické neurotransmitery (R. Y. Moore et al., 2002). Hlavním neuropeptidem produkovaným neurony vlSCN je vazoaktivní intestinální peptid (VIP). VIP je důležitý zejména pro buněčnou synchronizaci mezi vlSCN a dmSCN. U myši s delecí genu pro VIP a jeho receptor dochází v SCN k arytmicitě a snížení amplitudy signálu na tkáňové úrovni (Aton et al., 2005). Neurony dmSCN produkují jako hlavní neuropeptid arginin-vazopresin (AVP) (S.-I. T. Inouye, 1996). Na synchronizaci neuronů se dále podílí

kyselina γ -aminomáselná (GABA), která je produkována neurony obou podoblastí SCN (Liu & Reppert, 2000).

Světelná synchronizace cirkadiálních hodin SCN

SCN dospělců jsou jediný savčí oscilátor přímo reagující na světelné podmínky. Fotické informace z okolního prostředí jsou přijímány fotosenzitivními gangliovými buňkami sítnice a dále vedeny do SCN přes retinohypotalamický trakt (RHT) (R. Y. Moore et al., 1995). Výlevem neurotransmiteru glutamátu ze synapsí buněk RHT dochází ke zvýšení akčního potenciálu neuronů SCN a navýšení intracelulární koncentrace Ca^{+} (Ding et al., 1998; Irwin & Allen, 2007). Zvýšená hladina intracelulárního vápníku vede ke zvýšené produkci cAMP a aktivaci Ca^{+} /cAMP dependentních kináz. Mezi tyto kinázy patří například protein kináza A (PKA), protein kináza G (PKG), protein kináza C (PKC), Ca^{+} /kalmodulin dependentní kináza (CaMK) a další (Ding et al., 1998; Jakubcakova et al., 2007; Tischkau et al., 2003). Aktivované kinázy fosforylují transkripční faktor (TF) cAMP responzivní element-vázací protein (CREB), který následně translokuje do jádra. Skrze CREB responzivní element (CRE) aktivuje pCREB transkripci hodinových genů *Per1,2* a protoonkogenu *c-Fos*, čímž dochází k posunu fáze hodin (Kornhauser et al., 1990; Tischkau et al., 2003).

2.2.2 Vývoj SCN ve fetálním období

SCN je derivováno z neuroepitelu preoptických výklenků třetí mozkové komory (Altman & Bayer, 1978). Anatomický vývoj savčích SCN probíhá v několika fázích. Neurony SCN jsou formovány prenatálně, u potkanů mezi 13. a 17. embryonálním dnem (E13-E17). Samostatně rozlišitelnou strukturou se stávají v E18, tedy zhruba tři až pět dní před narozením (R. Moore & Bernstein, 1989). U myši probíhá cytogeneze neuronů SCN mezi E12 a E15. Vývoj začíná u neuronů vlSCN a dále pokračuje do okolních neuronů (Kabrita & Davis, 2008). Fetální SCN obsahují pouze malé množství synapsí a většina synaptických spojení je tvořena až v postnatálním období. Nejvíce probíhá synaptogeneze mezi 4. a 10. postnatálním dnem (P4 a P10), přičemž ve snížené míře pokračuje v dospělosti (R. Moore & Bernstein, 1989).

Vývoj cirkadiálního rytmu ve fetálních SCN

Cirkadiální rytmus je v SCN detekovatelný již v prenatálním období. Výzkumy založené na detekci hladin transkriptů hodinových genů ve fetálních SCN odebraných během 24 hodin ukázaly, že u potkanů začíná rytmická exprese hodinových genů v E20. Rytmus v expresi hodinových genů je pravděpodobně generován snížením původně vysoké transkripce *Per2* a *Bmal1* a zvýšením původně nízké transkripce *Per1* a *Cry1* (Houdek & Sumová, 2014;

Sládek et al., 2004). U myši byl metodou *in situ* hybridizace prvně detekován rytmus v expresi *Per1* ve fetálním SCN v E17 (Shimomura et al., 2001). Pozdější studie poukázaly na přítomnost cirkadiálního rytmu SCN v ještě dřívějším vývojovém stádiu. Metodou nahrávání bioluminiscence explantátů SCN transgenního myšního modelu *mPer2^{Luc}* je na tkáňové úrovni rytmus pozorovatelný již v E15 (Wreschnig et al., 2014). Přestože jedna z prvotních studií uvádí počátek oscilace u explantátů v ještě dřívějším období E13, žádné další studie rytmus v tomto období nepotvrdily (Landgraf et al., 2015). Explantáty E17 SCN, které byly použity v této studii pravděpodobně obsahovaly také ventrální část dorzálního hypotalamu, ve které je v tuto dobu protein PER2 silně exprimován. V pozdějších fázích vývoje již exprese PER2 nebyla v okolí SCN zaznamenána (Carmona-Alcocer et al., 2018).

Rytmická exprese začíná u menší populace buněk v SCN a dále se šíří mezi okolní neurony (Wreschnig et al., 2014). Na úrovni jednotlivých neuronů byl slabý cirkadiální rytmus v hladině proteinu PER2 u některých explantátů zaznamenán už v E14,5 a to u zhruba 10 % neuronů. V E15,5 byl synchronizovaný rytmus pozorován u všech buněk SCN (Carmona-Alcocer et al., 2018). Jedním z možných proteinů odpovědných za rozvoj cirkadiální rytmicity mezi jednotlivými neurony je ROR α , který je ve fetálních SCN exprimován ve vysoké míře (Carmona-Alcocer et al., 2018; Greiner et al., 2022).

S postupným vývojem se rytmus stává robustnější a v postnatálním období dochází k dalšímu výraznému zvýšení amplitudy (Carmona-Alcocer et al., 2018; Sládek et al., 2004). V P10 dosahují SCN stejných vlastností, jako SCN dospělců (Kováčiková et al., 2006). Některé ze studií dále uvádějí vývoj rytmu také v *in vitro* podmínkách, tedy za absence mateřských podmětů. Spontánní vývoj rytmu *in vitro* po přibližně 5 dnech v kultuře byl zaznamenán u E14 SCN explantátů (Wreschnig et al., 2014). Stejný trend byl pozorován u E15 SCN explantátů, které byly čerstvě po explantaci arytmičné (Čečmanová et al., 2019). V jiné studii naproti tomu u E14 SCN explantátů nebyla zaznamenána žádná změna v parametrech cirkadiálního rytmu ani po 7 dnech v kultuře (Carmona-Alcocer et al., 2018). Zřejmé je, že organotypické explantáty jsou ovlivňovány procesy v *in vitro* podmínkách a zcela nenapodobují *in vivo* situaci (Sumová & Čečmanová, 2020).

Vliv mateřských signálů na vývoj a synchronizaci hodin ve fetálním SCN

Pro správný vývoj a synchronizaci fetálních SCN je nezbytná přítomnost rytmických signálů řízených mateřským SCN (Greiner et al., 2022; Reppert & Schwartz, 1983). Komunikace mezi cirkadiálním systémem matky a plodu probíhá skrze velké množství

vzájemně propojených drah. Jedná se především o hormonální signály a signály spojené s režimem bdění a aktivity a příjmem potravy (Čečmanová et al., 2019; Greiner et al., 2022; Houdek et al., 2015). Chronodisrupce matky má za následek narušení genové exprese ve fetálních SCN na úrovni celého genomu. Při narušení světelného režimu březích matek dochází ke snížené expresi jak hodinových genů, tak CCG (Lužná et al., 2021).

Mateřské signály jsou důležité pro vývoj rytmické exprese ve fetálních SCN. Rytmus v genové expresi se objevuje nejdříve u genů *c-Fos*, *Vip*, *Avp* a *Nr1dl*. U potkanů byla zaznamenána rytmická exprese těchto genů již v E19, tedy v době, kdy je exprese hodinových genů arytmiická a fetální SCN nemohou autonomně řídit expresi zmíněných genů. Rytmická exprese *c-Fos* a neurotransmiterů *Vip* a *Avp* v dřívějších stádiích vývoje fetálních SCN je pravděpodobně pod kontrolou mateřských signálů (Houdek & Sumová, 2014). Narušení cirkadiálního rytmu matky vede k narušení rytmu *c-Fos* a *Nr1dl* ve fetálních SCN. Nejcitlivější je vůči mateřským signálům *c-Fos*, jehož expresní profil nejrychleji odpovídá na změnu fáze mateřského SCN. Rytmus v expresi *Vip* a *Avp* v SCN ve fetech zůstává zachován i u březích matek chovaných ve stálém světle (LL) režimu či opožděném LD režimu. Exprese neurotransmiterů a *c-Fos* je tedy pravděpodobně regulována skrze odlišné signalizační dráhy (Lužná et al., 2021). Jak neurotransmitery *Vip* a *Avp*, tak *c-Fos* obsahují ve své promotorové sekvenci CRE a je tedy možné, že exprese těchto genů je regulována skrze pCREB. Na regulaci exprese *Nr1dl* ve fetálním SCN mohou mít vliv rytmické mateřské signály metabolismu skrze vazbu hemu na promotor tohoto genu (Houdek & Sumová, 2014).

Mateřské signály se dále podílejí na mezibuněčné synchronizaci neuronů fetálních SCN (Greiner et al., 2022). Synchronizace neuronů fetálního SCN pravděpodobně není závislá na neurotransmiterech VIP a AVP jako u dospělých SCN. Přestože patří mezi první z rytmických genů ve fetálních SCN, delece genu pro VIP receptor ani blokace jeho receptoru neměly vliv na normální vývoj rytmu u fetálních SCN. K normálnímu rozvoji došlo také v případě blokace GABA receptoru a mezerových spojů (angl. gap junction) (Carmona-Alcocer et al., 2018).

Fáze SCN fetálních SCN je řízená mateřským SCN. Fetální SCN nepřijímají časové informace skrze RHT a jejich synchronizace je tak závislá na nesvětelných signálech řízených mateřským SCN. Změna světelného režimu a posunutí fáze hodin u březí matky vyvolává fázový posun u SCN řízené aktivity plodu (El-Hennamy et al., 2008; Lužná et al., 2021; Reppert & Schwartz, 1983). K synchronizaci fáze světelnými podmínkami dochází až v postnatálním období. K fotoperiodě se SCN stávají citlivé mezi P4 a P10, tedy v období, kdy v SCN dochází k zvýšené synaptogenezi (Bendová et al., 2004).

Hormonální regulace

Hormonální signalizace je významný komunikační prostředek mezi mateřským a fetálním SCN. Hormony, které v cirkadiánním rytmu procházejí placentou a ve fetálním SCN je pro ně v dostatečné míře exprimován receptor, mohou potenciálně ovlivňovat vývoj fetálních SCN. Jedním z hormonů procházejícím v cirkadiánním rytmu placentou je melatonin (Okatani et al., 1998). Odstranění epifýzy produkující melatonin u březích matek narušilo rytmus v expresi *c-Fos* a *Avp* v SCN jedno denních mlád'at těchto samic. Farmakologické podání melatoninu zabránilo narušení rytmu (Houdek et al., 2015). Melatoninové receptory *Mtnr1* a *Mtnr2* však byly ve fetálních SCN detekované jen ve velmi nízké hladině (Greiner et al., 2022). Mezi další z kandidátních hormonů patří dopamin. Dopaminový receptor *Drd1* je na rozdíl od melatoninových receptorů ve fetálních SCN rytmicky exprimován ve vysokých hladinách (Greiner et al., 2022). Aplikace agonisty dopaminového receptoru vedla ve fetálních SCN ke zvýšené míře transkripce *c-Fos* (Weaver & Reppert, 1995). Dlouhodobá role dopaminu ve vývoji a synchronizaci fetálních SCN však zatím nebyla prokázána. Vlivu dalších z kandidátních hormonů, glukokortikoidů, při vývoji a synchronizaci fetálních SCN se věnují následující kapitoly.

2.3 GC a cirkadiánní hodiny

2.3.1 Regulace syntézy a sekrece GC cirkadiánním systémem

Glukokortikoidy, u hlodavců kortikosteron (CORT) a u člověka převážně kortizol, jsou hormony produkované v dřeni nadledvinek (Hench & Kendall, 1949). Jedná se o steroidní hormony syntetizované řadou enzymatických procesů z prekurzorové molekuly cholesterolu. Nově nasyntetizované GC jsou uvolňovány do krevní plazmy a modulují velké množství fyziologických procesů. GC jsou zapojeny ve vývoji, udržení tělesné homeostázy, reakce organismu na vnější stres, regulaci metabolismu a protizánětlivých procesech (shrnuto v Arlt & Stewart, 2005).

Produkce GC je zahájena aktivací hypotalamo-hypofyzární-nadledvinové osy (HPA osy). HPA osa je neuroendokrinní systém skládající se z neuronů hypotalamického paraventriculárního jádra (PVN), neuronů hypofýzy a nadledvin. Neurony PVN jsou aktivovány limbickou oblastí reagující na stres, zahrnující mimo jiné amygdalu (Van De Kar & Blair, 1999). Aktivované neurony PVN koexprimují kortikotropin uvolňující faktor (CRF) a AVP. Uvolnění CRF a AVP do neuronů anteriorní hypofýzy má za následek sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) kortikotropními buňkami hypofýzy (Vale et al., 1981). Cirkulující ACTH aktivuje v kůře nadledvin melanocortionový receptor typu 2, což vede

k zahájení nové syntézy glukokortikoidů (Gallo-Payet et al., 2017). Po syntéze jsou GC uvolněny do krevního oběhu, kde se vyskytují převážně v neaktivní formě v komplexu s plazmatickými proteiny. Zhruba 95 % GC je vyvázáno v komplexu s globulinem vázajícím kortikosteroid (CBG) či jinými plazmatickými proteiny a 5 % GC se v plazmě vyskytuje volně (Nenke et al., 2017). Díky své lipofilní povaze CORT pasivně difunduje nejen všemi buněčnými membránami, ale také hematoencefalickou bariérou (Mason et al., 2010).

Aktivita HPA osy je dále regulována cirkadiálním systémem, což umožňuje optimalizaci odpovědi na stres a adaptaci na střídající se podmínky vnějšího okolí (Windle, Wood, Shanks, et al., 1998). Selektivní odstranění SCN narušuje denní rytmus v hladině GC a výrazně snižuje jeho amplitudu (R. Y. Moore & Eichler, 1972). Při absenci stresu vykazuje sekrece CORT robustní cirkadiální rytmus s několikanásobným rozdílem mezi minimální a maximální hladinou. Hladina cirkulujících GC dosahuje maximální hodnoty na začátku aktivní fáze, u člověka v brzkém ránu, u hlodavců s nástupem večera (Guillemin et al., 1959; Windle, Wood, Lightman, et al., 1998). Kromě cirkadiálního rytmu vykazuje hladina GC ultradiální oscilace s maximy přibližně každých 60-90 min (Windle, Wood, Lightman, et al., 1998).

Aktivita HPA osy je SCN regulována skrze synaptická spojení s neurony PVN a další nepřímá spojení mezi neurony. Pravděpodobně se zde nevyskytuje žádný excitační mechanismus a regulace je založena na inhibici neuronů PVN neurony SCN během dne. Komunikace mezi SCN a PVN probíhá skrze neurotransmitery VIP a AVP (Jones et al., 2021; Kalsbeek et al., 2008). Pro udržení cirkadiálního rytmu v hladině glukokortikoidů je nezbytná koordinace hodin v vlSCN, dmSCN a PVN. Denní rytmus v AVP je se světlem synchronizován skrze VIP signalizaci z vlSCN, což umožňuje řízení aktivity neuronů v PVN v závislosti na světelných podmínkách (Li & Androulakis, 2021). Funkční cirkadiální hodiny v PVN jsou pro udržení vysoké cirkadiální amplitudy GC zcela nezbytné. Delece *Bmal1* v neuronech PVN vede ke snížení amplitudy a narušení rytmu v hladině GC (Jones et al., 2021).

2.3.2 Mechanismus působení GC

Glukokortikoidové receptory (GR)

GC působí skrze svou vazbu na ubikvitně exprimované glukokortikoidové (GR) a mineralokortikoidní (MR) receptory (Arriza et al., 1987). Tyto receptory jsou intracelulární a membránově vázané (Bamberger et al., 1996). V neaktivním stavu se intracelulární GR nacházejí v cytoplazmě ve vazbě s chaperonem Hsp90, což je nezbytné pro vazbu CORT na GR

(Kirschke et al., 2014). Součástí proteinového komplexu je dále ko-chaperon FK506-vázající protein 52 (FKBP4) nebo ko-chaperon FK506-vázající protein 51 (FKBP5). Při vazbě FKBP5 je snížena vazba GR ke CORT a zpomalena translokace do jádra. Exprese FKBP5 je aktivována GR signalizací a jedná se tak o zpětnovazebný mechanismus pro ukončení glukokortikoidové odpovědi (Vermeer et al., 2003; Wochnik et al., 2005). Aktivace GR probíhá skrze interakci steroidního jádra CORT s ligand vážící doménou (LBD) (Bledsoe et al., 2002). GC se na GR a MR váží pouze ve své metabolicky aktivní formě. Neaktivní forma, u hlodavců 11-dehydrokortikosteron a u člověka kortizon, je na aktivní formu konvertován pomocí enzymu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 1 (11 β -HSD1). Opačnou roli zastává enzym 11 β -HSD2, který konvertuje aktivní formu na inaktivní. Konverze mezi aktivní a neaktivní formou CORT umožňuje regulaci aktivní formy CORT na úrovni jednotlivých buněk a tkání (Diederich et al., 2002). Kromě CORT s LBD s vysokou afinitou interaguje syntetický GC dexametazon (DEX). GR jsou blokovány vazbou syntetického agonisty mifepristonu (MIF) (Bledsoe et al., 2002). CORT má 6-10 krát vyšší afinitu k MR než ke GR. Cca 90% MR je CORT nasyceno při minimální denní hladině. GR jsou saturovány až při vyšších koncentracích, jakých je dosahováno při akutním stresu a cirkadiálním maximu, tedy přibližně 25ug/100ml (Reul & Kloet, 1985).

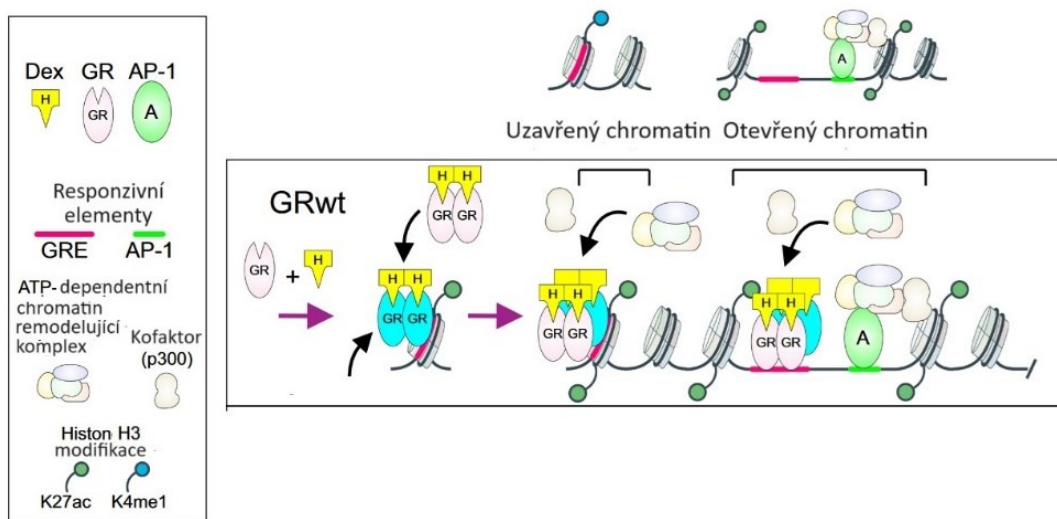
Genomické působení GC

Po vazbě CORT na LBR intracelulárního receptoru dochází ke změně konformace GR, uvolnění z chaperonového komplexu a jeho translokaci do jádra (Wochnik et al., 2005). V jádře se GR ve formě tetramerů specificky váže na glukokortikoidový responzí element (GRE) nebo poloviční GRE v promotorech a enhancerech GC responzivních genů, a tím aktivuje nebo inhibuje jejich transkripci (Obr. 4) (Johnson et al., 2021). Na genomové úrovni bylo identifikováno více GRE než regulovaných genů a pouze na základě sekvence tedy nelze regulaci předvídat (A. B. Reddy et al., 2007). Působení glukokortikoidů je vysoce buněčně a tkáňově specifické, čehož je dosaženo pomocí rozličných mechanismů. Negativní i pozitivní regulace genové exprese závisí na struktuře promotoru a dostupnosti chromatinu, epigenetických modifikacích, přítomnosti koregulátorů a dalších TF a celkovém stavu buňky (Goldberg et al., 2022; Oster et al., 2006; Polman et al., 2012; Quagliarini et al., 2019).

Umístění GRE v promotoru, a to zejména přítomnost vazebných míst pro specifické TF v blízkosti GRE, je důležitý mechanismus specificity regulace na úrovni jednotlivých genů. Přestože jsou možné protein-proteinové interakce mezi GR a dalšími TF, pro regulaci genové exprese je pravděpodobně vždy nutná přímá vazba GR na DNA (Johnson et al., 2021). Mezi TF

koregulační genovou expresi společně s GR patří například NFκB, AP-1 a CREB (Biddie et al., 2011; Rao et al., 2011). Interakce s dalšími TF je silně tkáňově specifická. V neuronálních P12 buňkách byly v blízkosti vazby GR rozpoznány vazebné sekvence pro jiné TF než například v játrech (Polman et al., 2012; Quagliarini et al., 2019).

Mezi geny, jejichž exprese je aktivována v brzké odpovědi na GC patří například ubikvině exprimovaná *sérem a glukokortikoidy indukovaná kináza 1* (*Skg1*) (Webster et al., 1993). Další z genů, jehož exprese je zvýšena v odpovědi na GC nebo syntetického dexametazonu je protizánětlivý *glukokortikoidy indukovaný leucinový zip* (*Gilz*) (D'Adamio et al., 1997). Zvýšená transkripce *Gilz*, *Skg1*, *Fkbp5* po aplikaci CORT nebo DEX souvisí s genomickým mechanismem působení GR v dané tkáni.



Obr. 4 Model GRwt při vazbě na chromatin. Vazba ligandem aktivovaného GR na DNA indukuje tranzici dimeru na tetramer. GRwt se váže jak na otevřený chromatin s již navázanými kofaktory, tak na uzavřený chromatin, kde indukuje vazbu dalších kofaktorů a TF. Upraveno z (Johnson et al., 2021).

Negenomický mechanismus působení GC

Působení GC genomickým mechanismem se projevuje v řádu desítek minut až hodin. Některé účinky GC jsou však pozorovatelné již v řádu několika minut. Mechanismus působení GR, při kterém není GR translokován do jádra a není vyžadována *de novo* syntéza proteinů, se nazývá negenomický. Negenomický mechanismus působení GR zahrnuje specifickou vazbu s intracelulárními a membránovými GR a přímým kontaktem s plasmatickou membránou (J. Han et al., 2005; Sotelo-Rivera et al., 2017). Jedním z příkladů negenomického působení glukokortikoidů je interference s dalšími extracelulárními signálními drahami. Jedná se například o PKA signalizační dráhu. V hypotalamických neuronech byla zaznamenána přímá

protein-protein interakce GR a PKAc. Tato interakce vedla ke snížení fosforylace CREB a nižší hladinu pCREB v jádře (Sotelo-Rivera et al., 2017). V HT4 neuroblastomových buňkách DEX snížil ATP dependentní intracelulární hladinu Ca⁺. Vliv DEX byl zcela odstraněn, pokud byl k buněčné kultuře aplikován společně s DEX inhibitor PKA, H-89 (J. Han et al., 2005). Hladina intracelulárního Ca⁺ byla snížena také v neuroblastomech B103. V B103 buňkách byl vliv DEX blokován při aplikaci inhibitorů PKC (J.-Z. Han et al., 2002). Interference CG s PKC byla dále zaznamenána v PC12 (Lou & Chen, 1998). Další z kináz zapojených do GC signalizace je ERK. V neuronech hipokampu DEX aktivuje ERK signální dráhu a následně zvyšuje proud v draslíkových Kv2.2 kanálkách (Wang et al., 2024). Zapojení PAK-ERK dráhy v GC signalizaci bylo dále prokázáno v choroidním plexu (Liška et al., 2021).

2.3.3 GC a hodiny periferních tkání

GC patří mezi významné signální molekuly zprostředkovávající kontakt mezi centrálními a periferními hodinami. *In vitro* a *in vivo* aplikace DEX posouvá a synchronizuje fázi v buněčné kultuře fibroblastů a mnoha dalších periferních tkáních (Balsalobre et al., 2000). V kultuře primárních fibroblastů stimuloval DEX oscilaci v 10 hlavních hodinových genech (So et al., 2009). GC modulují chod hodin například v ledvinách, játrech, srdci a tukové tkáni (Balsalobre et al., 2000; Soták et al., 2016). U hlodavců s lézí SCN jednorázová aplikace DEX postačuje k synchronizaci zhruba 60 % cirkadiálního transkriptomu v játrech (A. B. Reddy et al., 2007). V mozkových oblastech mimo SCN byl významný vliv GC zaznamenán například v hipokampu, choroidním plexu a kortexu (Liška et al., 2021, 2022; Tahara et al., 2015).

U zvířat s mutovanými GR nebo selektivním odstraněním nadledvin, adrenalektomií (ADX), přetrvává rytmičnost a fáze v oscilaci hodinových genů, přestože je v závislosti na orgánu a typu tkáně rozdílně ovlivněna jejich amplituda a fáze. GC tak mají vliv převážně na udržení vysoké amplitudy hodinových genů v periferních hodinách (Soták et al., 2016). Skrze regulaci periferních hodin GC napomáhají adaptaci na časovou změnu v potravním režimu (angl. restricted feeding) a krátkodobě zmírňují desynchronizaci fáze periferních hodin a hodin SCN (Le Minh, 2001). Dlouhodobě zvýšená hladina, například při opakovaném stresu naopak způsobuje desynchronizaci mezi periferními tkáněmi a SCN. Největší efekt je pozorovatelný, pokud jsou zvířata stresu vystavována v období mimo GC cirkadiální maximum (Ota et al., 2020; Tahara et al., 2015).

Molekulární mechanismus působení GC na hodiny periferních tkáních

Glukokortikoidová signalizace probíhá skrze několik hierarchicky uspořádaných a propojených mechanismů. Chod cirkadiálních hodin je regulován skrze aktivaci a potlačení exprese konkrétních genů v různých časových intervalech. Transkripce je regulována v několika vlnách, některé geny jsou akutně regulovány již po několika málo hodinách od aplikace DEX, další až po přibližně 30 hodinách od aplikace (Oster et al., 2006). Zhruba dvě třetiny hodinových genů a CCG, jejichž transkripce je regulována GC, má ve svém promotoru GRE a mohou tak být GC regulovány přímo. Většina těchto genů má ve svém promotoru navíc vazebné sekvence pro další TF. CCG, které ve svém promotoru neobsahují GRE, jsou GC regulovány nepřímo skrze přímo regulované hodinové geny. Jedním z těchto genů je *Dbp*, jehož míra exprese je v důsledku GC signalizace významně snížena, přestože ve svém promotoru neobsahuje GRE (A. B. Reddy et al., 2007). Promotory hodinových genů obsahují mimo GRE také CRE sekvenci a jsou regulovány jak vazbou GR, tak vazbou pCREB na promotor (Doi et al., 2019; Cheon et al., 2013).

Mezi časně aktivované geny GC signalizace patří v periferních orgánech hodinové geny *Per1,2*. Tyto geny jsou zřejmě důležité pro regulaci dalších hodinových genů v periferních tkáních. Zvýšená hladina mRNA *Per1,2* byla detekována již po cca 3-4 hodinách po aplikaci DEX, následované snížením exprese po 4 a 8 hodinách (Balsalobre et al., 2000; A. B. Reddy et al., 2007; So et al., 2009). *Per1* je ke GC vysoce responzivní (Johnson et al., 2021). Jako jediný z celého genomu je aktivován již při koncentraci 0,5nM DEX, tedy koncentraci odpovídající nejnižším hladinám CORT v průběhu dne (T. E. Reddy et al., 2012). *Per2* je aktivován skrze překryv GRE s E-boxem v jeho promotoru. Pro regulaci transkripce *Per2* v důsledku GC je dále důležitý *Bmal1*, jelikož citlivost *Per2* vůči GC je narušena při delecí genu *Bmal1* (Doi et al., 2019; Cheon et al., 2013). Mezi časně indukované geny, jejichž transkripce je zvýšena po cca 3-4 hodinách patří dále *E4bp4* (T. E. Reddy et al., 2012; So et al., 2009). Kromě hodinových genů dochází v krátkém časovém horizontu v periferních tkáních také ke zvýšené expresi *Sgk1*, což poukazuje na genomické působení glukokortikoidů (A. B. Reddy et al., 2007). Zvýšenou expresi *Per1,2* následuje zvýšení exprese *Cry1*. Ve stejnou dobu jsou regulovány *Bmal1* a *Nr1d1* (Balsalobre et al., 2000; A. B. Reddy et al., 2007).

Kromě genomického působení byl zaznamenán také negenomický mechanismus působení GC na cirkadiální hodiny. V choroidním plexu vyvolala injekce DEX v závislosti na čase podání výrazný fázový posun a zvýšení amplitudy. Tento fázový posun byl částečně blokován blokací PAK-ERK dráhy. Na transkripční úrovni byla pozorována zvýšená exprese

v *Gilz* a *Per1*. Aplikace DEX dále v choroidním plexu snížila poločas života proteinu PER2 a urychlila jeho degradaci (Liška et al., 2021).

2.4 Vliv GCN na SCN

2.4.1 Vliv GC na SCN v postnatálním období

Expres *Nr3c1* v dospělých SCN a jejich citlivost vůči GC je kontroverzní. První imunohistochemická studie zabývající se expresí GR v mozku během prenatálního a postnatálního období uvádí přítomnost GR v SCN pouze v prvním postnatálním týdnu. V SCN dospělců nebyly GR vůbec detekovány (Rosenfeld et al., 1988). V nedávno zveřejněném přehledovém článku naproti tomu byla detekována přítomnost GR i v dospělých SCN, v kolokalizaci s gliálním fibrilárním acidickým proteinem (GFAP) (Lehmann et al., 2023). Vliv GC na astrocyty v dospělých SCN byl pozorován již dříve. Podle jedné ze studií GC regulují hladinu GFAP v dospělém SCN a dalších mozkových oblastech a u ADX zvířat dochází ke snížené expresi GFAP (Maurel et al., 2000). Na úrovni mRNA byly v dospělých SCN detekovány MR i GR. Hladina *Nr3c1* byla navíc zvýšena u zvířat s provedenou ADX (Su et al., 2015). Jednorázová aplikace DEX však neovlivňuje genovou expresi hodinových genů v dospělém SCN a nezpůsobuje posun fáze hodin (Balsalobre et al., 2000). Regulace genové exprese hodinových genů a fázi hodin v dospělém SCN neovlivňuje ani dlouhodobý stres (Ota et al., 2020; Tahara et al., 2015). Jedna ze studií uvádí změny v expresi VIP v SCN v genové expresi po dlouhodobém podávání DEX (Larsen et al., 1994). Další ze studií uvádí změny v genové expresi v důsledku GC také u AVP (Su et al., 2015). Není tedy zcela jasné, jakým mechanismem působí GC na dospělá SCN, jelikož GR jsou zde exprimovány v poměrně nízké hladině. Je možné, že v důsledku stresu může docházet ke změně neuroplasticity v SCN, ale pro přesné pochopení působení GC na dospělá SCN je nutné provést další studie (Maurel et al., 2000).

V časně postnatálním období jsou GR exprimovány ve vyšším množství než u dospělých SCN a fetální hodiny jsou vůči GC vysoce senzitivní. V P4 je v SCN exprimován *Nr3c1* v biologicky relevantní hladině (Olejníková et al., 2018). GR byl v prvním postnatálním týdnu detekován i na úrovni proteinu (Rosenfeld et al., 1988). U stresovaných mláďat dochází ke zvýšené hladině GC ve fetální plazmě a narušení rytmu v *Bmal1* (Olejníková et al., 2018).

2.4.2 Vliv GC na vývoj a synchronizaci fetálních SCN

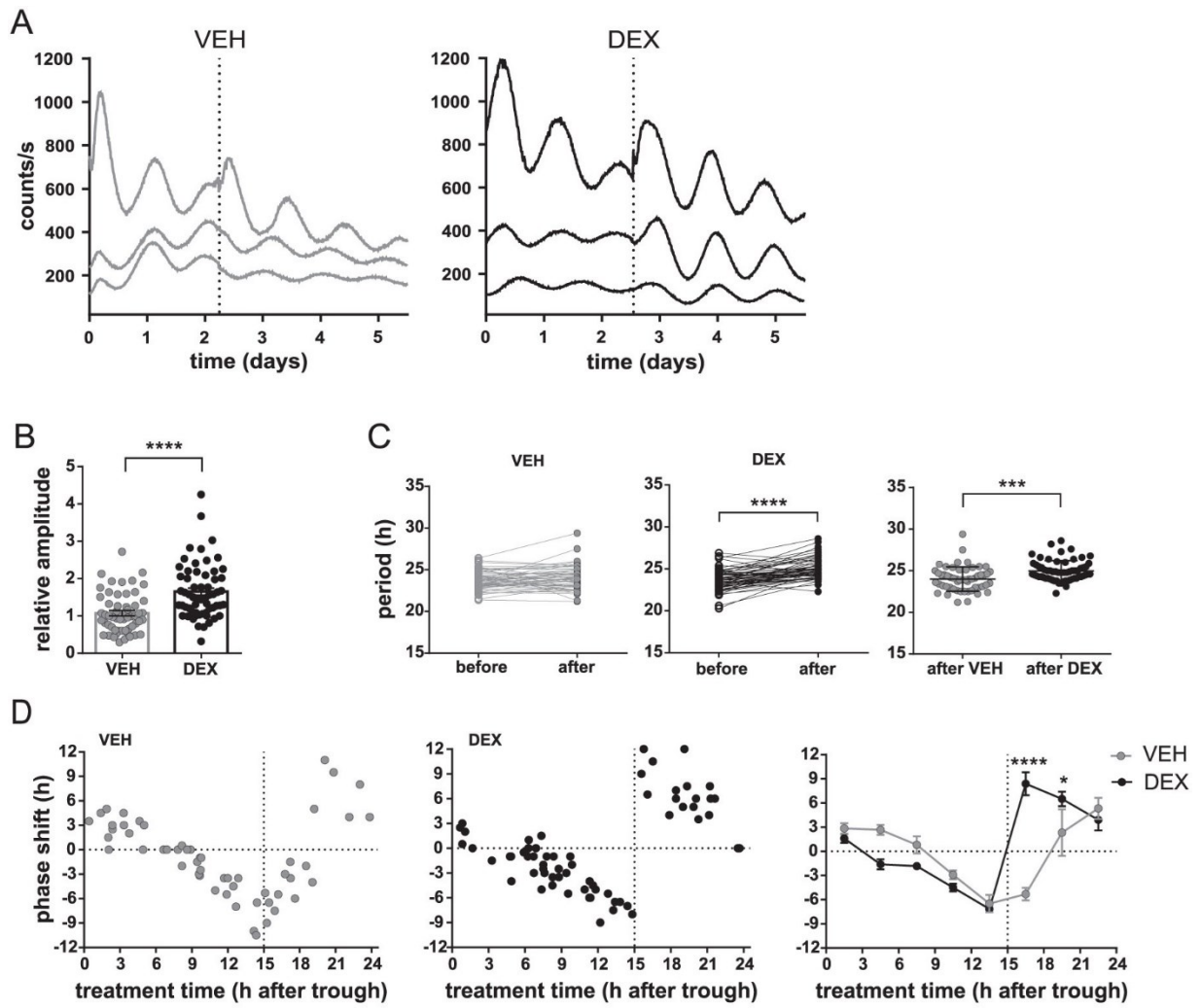
GC jsou nezbytné pro normální vývoj plodu a to zejména pro vývoj plic, mozku, jater a ledvin. Během březosti se hladina volných GC v plazmě samice výrazně zvyšuje (Wieczorek et al., 2019). Těhotným ženám, u nichž hrozí předčasný porod, jsou GC farmakologicky podávány pro urychlení vývoje plodu, zejména plic. Nadměrná expozice GC během fetálního období však vede k množství závažných zdravotních problémů. Jedná se například o kardiovaskulární a metabolická onemocnění a behaviorální a psychiatrické poruchy (shrnutí v Reynolds, 2013). U potomků samic, kterým byl v průběhu času opakovaně podáván DEX v době mimo přirozené cirkadiánní maximum GC v krvi, došlo v dospělosti k rozvoji úzkostí a špatné regulaci stresu (Astiz et al., 2020). Vliv nadměrné expozice GC je pohlavně závislý, u samců dochází především k rozvoji depresí, zatímco u samic ADHD (Elberling et al., 2023).

V normálním případě odpovídá hladina GC ve fetálním oběhu přibližně 10 % mateřské hladiny GC a vykazuje cirkadiánní rytmus (Astiz et al., 2020). K nadměrné expozici fetů GC dochází v případě nedostatečnosti obranných mechanismů bránící průchodu GC k plodu. Hlavní obranný mechanismus je u březích samic zvýšení hladiny CBD vyvazující volný CORT, čímž je zabráněno jeho nadměrnému průchodu placentou (Wieczorek et al., 2019). Další stupeň regulace je na úrovni placenty. Regulačním enzymem je zde 11β -HSD2 (Burton & Waddell, 1999). 11β -HSD2 je exprimována nejvíce v prvních dvou třetinách těhotenství, poté je exprese snížena. Snížení hladiny 11β -HSD2 souvisí s vyšším množstvím GC ve fetální plazmě v poslední třetině těhotenství. Exprese 11β -HSD2 v placentě při zvýšené hladině GC je regulována v závislosti na pohlaví plodu. Při indukovaném stresu u březích samic je zvýšena exprese 11β -HSD2 v placentě pouze u samičích potomků, zatímco u samic zůstává nezměněna. Hladina GC v plazmě je tedy zvýšena převážně u placenty samic, zatímco u samic zůstává hladina neovlivněna (Wieczorek et al., 2019). DEX není vzhledem ke své struktuře 11β -HSD2 inaktivován a volně prochází placentou (Diederich et al., 2002). Reakce na nadměrnou hladinu GC je dále regulována fetálními hodinami. V případě, že fetálního oběhu dosáhla zvýšená hladina GC mimo přirozené cirkadiánní maximum, došlo ve fetu ke zvýšené indukci *Sgkl* a *Fkbp5*. Pokud bylo zvýšení dosaženo ve fázi, ke zvýšené expresi nedošlo (Astiz et al., 2020).

GR jsou v mateřské i fetální části placenty exprimovány v cirkadiánním rytmu (Čečmanová et al., 2019). V relativně vysoké míře je *Nr3c1* exprimován také ve fetálních SCN (Greiner et al., 2022). Exprese *Nr3c1* je ve fetálních SCN pravděpodobně rytmická (Čečmanová et al., 2019). V SCN fetů, jejichž matky byly během březosti vystaveny omezené době příjmu potravy (angl. restricted feeding) dochází k narušení exprese *Nr3c1* (Lužná et al., 2021).

V nedávné studii Čečmanové (2019) byl testován vliv GC při vývoji a synchronizaci fetálních hodin. DEX byl *in vitro* aplikován k explantátům z mateřské a fetální části placenty, E17 SCN explantátů a E15 SCN explantátů *mPer2^{Luc}* myši. K explantátům byl po cca třech dnech nahrávání PER2-bioluminescence aplikován DEX ve výsledné koncentraci 100nM. Po dalších třech dnech bylo nahrávání ukončeno a byla provedena analýza vlivu DEX na parametry cirkadiálních hodin. Vliv DEX na cirkadiální hodiny byl pozorován v obou částech placenty i fetálním SCN. V mateřské části placenty aplikace 100nM DEX vyvolala fázové posuny. Ve fetálních částech placenty, které byly před aplikací arytmičné, indukoval DEX slabý rytmus. Pokud byl DEX aplikován do média k E15 SCN, došlo u nich k rychlejšímu rozvoji rytmu oproti kontrolní skupině. Aplikace DEX k E17 SCN explantátům zvýšila jejich amplitudu a zpomalovala ztrátu amplitudy (angl. damping). DEX měl dále vliv na délku periody, přičemž u explantátů s aplikovaným DEX došlo oproti vehikulu k prodloužení periody. Aplikace mezi CT 15 a CT 18 navíc vedla k výrazné fázové předběhnutí oproti kontrolám VEH (Obr. 5). Tento fázový posun byl zcela vyblokován působením MIF, což poukazuje na specifické působení GC.

Vliv GC při vývoji a synchronizaci fetálních SCN byl dále testován *in vivo*. Březím matkám v ZT 15, tedy tři hodiny po setmění, byl injekčně aplikován DEX a kontrolní skupině PBS. Vzorky fetálních SCN byly odebírány po 1, 2, 4 a 8 hodinách od aplikace DEX. Následně byla pomocí metody RT-qPCR ve fetálních SCN měřena exprese *Nr3c1*, *Nr1d1*, *Sgkl*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Avp* a *Vip*. Překvapivě, ani v jednom časovém bodě nebyla detekována změna v expresi žádného z hodinových genů ani genů souvisejících s působením GC. V SCN fetů jejichž matkám byl aplikován DEX však byla již po 1h působení detekována snížená hladina *c-Fos*. V obou částech placenty byla naproti tomu detekována zvýšená hladina *c-Fos*. Vzhledem k tomu, že exprese hodinových ani dalších testovaných genů nebyla *in vivo* po aplikaci DEX ovlivněna, je ve studii navržen negenomický mechanismus působení GC při vývoji a synchronizaci fetálních SCN. Vzhledem k přítomnosti CRE v promotoru *c-Fos*, autoři studie navrhují při GC signalizaci ve fetálních SCN regulaci *c-Fos* skrze pCREB. Jako možné vysvětlení rozdílu v ovlivnění exprese *c-Fos* ve fetálním SCN oproti placentě je zde poukázáno na rozdílnou strukturu promotru pro *c-Fos* v těchto tkáních (Čečmanová et al., 2019).



Obr. 5 *In vitro* působení DEX na E17 SCN explantáty. 100nM DEX zvyšuje amplitudu, prodlužuje periodu a v CT 15-18 významně posouvá fázi oproti VEH. Převzato z (Čečmanová et al., 2019).

3 Cíle diplomové práce

Diplomová práce má za cíl rozšířit dosavadních poznatky o mechanismu působení GC na fetální SCN při aplikaci *in vitro*. Na základě dosavadních výsledků, a to především výsledků Čečmanové (2019), byly stanoveny následující cíle:

1. Potvrzení vlivu GC na parametry cirkadiánní hodiny ve fetálních SCN při aplikaci *in vitro*
2. Ověření potenciálních mechanismů působení GC na fetální SCN
3. Zavedení metody izolace RNA z E17 SCN organotypických explantátů *mPer2^{Luc}* pro následné použití v RT-qPCR
4. Detekce vlivu GC na úrovni transkriptů v E17 SCN explantátech při aplikaci *in vitro*

4 Materiál a metody

4.1 Laboratorní zvířata

K pokusům byl použit transgenní myší model *mPer2^{Luc}* (kmen. B6.129S6-Per2tm1Jt/J, JAX, USA) z chovu Oddělení biologických rytmů na Fyziologickém ústavu AV ČR. *mPer2^{Luc}* je myší model exprimující fúzní protein PER2::LUC. Tento model byl vytvořen transfekcí embryonálních kmenových buněk myši vektorem pKO Scrambler 916 s fúzovaným genem pro světluškovou luciferázu (*Luc*) na 3' konec genu *Per2* (Yoo et al., 2004). Umístěním tkání *mPer2^{Luc}* myšího modelu do média obsahujícího luciferin dochází k oxidaci luciferinu luciferázou a světelné emisi (Gates & DeLuca, 1975). Nahrávání emitované bioluminiscence umožňuje sledovat cirkadiánní dynamiku proteinu PER2 v reálném čase.

Pro získávání E17 SCN explantátů byly *mPer2^{Luc}* samice plánovaně připouštěny tak, aby byl přesně znám den počátku jejich březosti. U samic byly prováděny pravidelné vaginální výplachy a určována fáze estrálního cyklu. Během ovulace byly samice na noc připuštěny k samcům. V případě nálezu spermií den po páření byla samice označena jako březí a tento den označen jako E0 embryonálního vývoje. Březí samice byly chovány oddělně, s volným přístupem k vodě a krmivu, při světleném režimu LD 12:12. Teplota v chovu byla udržována na 23±2°C. 17. den od zabřeznutí byly samice a jejich plody usmrceny pro experimentální účely.

Všechny pokusy na zvířatech byly schváleny Komisí pro péči o zvířata a jejich použití Fyziologického ústavu. Provedené pokusy byly v souladu se Zákonem č. 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, Vyhláškou č. 419/12 Sb. o ochraně pokusných zvířat České republiky a Směrnicí Rady evropského společenství 86/609/EEC.

4.2 Použité chemikálie a kity

Použité chemikálie

- **B27**, B-27™ Supplement (50X), serum free, (Gibco, USA)
- **Dexametazon**, Dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA)
- **DMEM**, Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM, (Sigma-Aldrich, USA)
- **DPBS**, Dulbecco's phosphate buffered saline DPBS (Sigma-Aldrich, USA)
- **Etanol 96%** (Penta, Česká republika)
- **Glukóza**, D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, USA)
- **GlutaMAX**, GlutaMAX™ Supplement (100×) (Gibco, USA)
- **Gö 6983**, (Sigma-Aldrich, USA)
- **H-89**, H-89 dihydrochloride hydrate, (Sigma-Aldrich, USA)
- **HCl**, Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- **HEPES**, HEPES solution, (Sigma-Aldrich, USA)
- **Luciferin**, D-Luciferin (Biosynth, Švýcarsko)
- **Mifepriston**, Mifepristone (Sigma-Aldrich, USA)
- **NaCl**, Chlorid sodný (Penta, Česká republika)
- **NaHCO₃** Sodium bicarbonate solution 7,5% (Sigma-Aldrich, USA)
- **Penicilin-streptomycin**, Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- **β-Merkaptoethanol**, 2-Mercapthoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- **Cykloheximid**, Cycloheximide (Sigma-Aldrich, USA)
- **RNAlater** (Qiagen, Německo)

Použité kity

- **Kit na izolaci RNA**, RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Německo)
RLT lyzační pufr , RW1 pufr, RPE pufr, Voda bez RNáz
- **DNáza I**, RNase-Free DNase Set (Qiagen, Německo)
RDD pufr bez RNáz, Voda bez RNáz, DNáza I bez RNáz
- **Kit pro RT**, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, USA)
10X RT pufr, 25X 100mM dNTP mix, 10X RT náhodné oligonukleotidy, MultiScribe reverzní transkriptáza
- **Kit na q-PCR**, Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Česká republika)

4.3 Příprava roztoků a médií

Z důvodu minimalizace kontaminace byla všechna média připravována v laminárním boxu Safe Flow 1.2-Biohazard box (Bioair, Itálie).

AIR médium STOCK (zásobní roztok vzduchem pufrovaného nahrávacího média)

Zásobní roztok AIR média byl připravován následovně (Tab. 1), upraveno podle (Yamazaki & Takahashi, 2005):

Tab. 1 Složení AIR média STOCK.

Složka	m/v
DMEM	0,83 %
D-glukóza	0,45 %
NaHCO ₃ (7,5%)	0,51 %
1mM HEPES	1 %
Penicilin-streptomycin	1,01 %
ddH ₂ O	96,2 %

pH média bylo změřeno pomocí pH metru pHenomenal pH 1100L (VWR, USA) a podle potřeby upraveno na pH 7,2 postupným přidáváním 2M HCl nebo 2M NaOH. Pomocí vakuového odsávání bylo médium přefiltrováno přes nádobu s 0,2 μm póry a uschováno v 6 °C pro další použití.

AIR médium pro SCN (vzduchem pufrované nahrávací médium pro SCN)

Nahrávací AIR médium pro SCN bylo připravováno následovně (Tab 2.), upraveno podle (Yamazaki & Takahashi, 2005):

Tab. 2 Složení AIR média pro SCN.

Složka	v/v
0,1M Luciferin	0,10%
GlutaMAX (100x)	1,01%
B27 (50x)	2,02%
AIR médium STOCK	96,86%

Osmolalita média byla změřena pomocí osmometru Osmomat 3000basic (Gonotec, Německo). V případě potřeby byla osmolalita přidáním 5,3 NaCl upravena na 300mOsm/kg. Médium bylo přefiltrováno přes kruhového filtru s 0,22 μm póry. Pro okamžité použití bylo médium zahřáto ve vodní lázni předeřáté na 37°C. Pro pozdější použití bylo médium uchováno při 6 °C.

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

HBSS bylo připravováno následovně (Tab. 3), upraveno podle (Yamazaki & Takahashi, 2005):

Tab. 3 Složení HBSS.

Složka	v/v
NaHCO ₃ (7,5%)	0,25%
HEPES	0,99%
DPBS	98,76%

pH roztoku bylo změřeno pomocí pH metru pH metru pHenomenal pH 1100L (VWR, USA) a podle potřeby upraveno na pH 7,2 postupným přidáváním 2M HCl nebo 2M NaOH. Pro pozdější použití bylo médium uchovááno při 6 °C.

4.4 Příprava organotypických E17 SCN explantátů

Březi samice *mPer2^{Luc}* myši byly 17. den od početí v čase 7:00-15:00 usmrceny rychlým zlomením vazy a následnou dekapitací. Usmrceným samicím byla rozříznuta dutina břišní a vyjmuty fety s placentami. Nůžkami byla fetům postupně provedena dekapitace a odhalena lebka. Po nastřížení lebky byl vyňat fetální mozek a umístěn do Petriho misky s HBSS médiem. Následně byly mozky po jednom krájeny mechanickým sekáčkem Tissue Slicer 51425 (Stoelting Co., USA) na řezy o šířce 500 μm. Řez obsahující SCN byl určen podle morfologie křížení optických nervů. Řez obsahující SCN byl žiletkou zredukován na oblast obsahující pouze SCN a nejbližší okolí. Takto připravené explantáty byly přeneseny na inzerty samostatně umístěny v 1 ml čerstvého Air média pro SCN a ihned použity nebo uloženy do inkubátoru Incubator BD 53 (Binder, Německo) udržujícího teplotu na 37 °C. Každé 2 až 3 týdny byly inzerty s explantáty přeneseny do čerstvého AIR média pro SCN a uloženy zpět do inkubátoru

Usmrcování zvířat a příprava organotypických E17 SCN explantátů byla prováděna odborným personálem Oddělení biologických rytmů. Vzhledem k tomu, že nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi pohlavími při působení GC na fetální SCN (nepublikovaná data), nebylo pohlaví fetů dále určováno.

4.5 Nahrávání bioluminiscence E17 SCN explantátů v přístroji LumiCycle

Před začátkem nahrávání PER2-bioluminiscence byly inzerty s E17 SCN explantáty umístěny do Petriho misek obsahující 1 ml čerstvě připraveného AIR média pro SCN zahřátého na 37 °C. Petriho misky byly zalepeny pomocí vazelíny kruhovým sklíčkem a v maximálním počtu 32 misek vloženy do přístroje nahrávajícího bioluminiscenci LumiCyclu 32 (Actimetrics, USA). Jedná se o systém se 4 fotonásobiči (ang.photon mutliplying tubes, PMTs) a karuselovým nosičem pro 32 Petriho misek. Buněčné kultury nebo tkáňové explantáty se inkubují v živném médiu pufrovaném vzduchem obsahujícím luciferin a fotonásobiče počítají každých 8 minut emitované fotony po dobu 1 minuty; záznam se ukládá a analyzuje pomocí programu LumiCycle Analysis (Actimetrics), který umožňuje analýzu časových sérií.

4.5.1 *In vitro* aplikace DEX, MIF, H-89 a Gö-6983 a VEH

V závislosti na konkrétním pokusu byly DEX, MIF, H-89 a Gö-6983 nebo jejich kombinace (Tab 4., 5.) po třech dnech nahrávání aplikovány do nahrávacího média k polovině E17 SCN explantátům. K druhé polovině explantátů byl aplikován VEH, sloužící jako negativní kontrola. Při aplikaci byly Petriho misky s explantáty po čtyřech vyjímány z LumiCyclu a přenášeny do laminárního boxu na vyhřátý varný blok za účelem minimalizace změny teploty a možnosti kontaminace. Po odlepení sklíčka byl pinzetou nadzvednut inzert s explantátem a do média byly aplikovány testované látky následujícím způsobem:

Tab. 4 Aplikace VEH a DEX v různých koncentracích.

Aplikace DEX			
Aplikovaná látka	Roztok testované látky	Aplikovaný V	c v 1 ml média
DEX	1mM DEX (rozpuštěn v DMSO), naředěno v AIR médium STOCK	1 μ l	1 μ M
DEX	10mM DEX (rozpuštěn v DMSO)	1 μ l	10 μ M
DEX	10mM DEX (rozpuštěn v DMSO)	10 μ l	1 μ M
VEH pro DEX	DMSO, naředěno v AIR médiu STOCK	1 μ l	

Tab. 5 Aplikace MIF, H-89, Gö-6983 a VEH před aplikací DEX.

Aplikace antagonistů před aplikací 1 μ M DEX				
Aplikovaná látka	Roztok testované látky	Aplikovaný V	c v 1 ml média	Zdroj
MIF (antagonista GR)	1mM MIF (rozpuštěn v 96% EtOH)	1 μ l	1 μ M	(Čečmanová et al., 2019)
VEH pro MIF	96% EtOH	1 μ l		
H-89 (antagonista PKA)	10mM H-89 (rozpuštěn v H ₂ O)	1 μ l	10 μ M	(Liška et al., 2021)
VEH pro H-89	H ₂ O	1 μ l		
Gö-6983 (antagonista PKC)	1mM Gö-6983 (rozpuštěn v DMSO)	1 μ l	1 μ M	(Bhattarai et al., 2014; Vasefi et al., 2013)
VEH pro Gö-6983	DMSO	1 μ l		

Po aplikaci a promíchání média byl inzert vložen zpět do média, Petriho misky zalepeny a vloženy zpět do LumiCyclu. Nahrávání bioluminiscence pokračovalo po dobu minimálně tři následujících dnů. Po ukončení pokusu byly explantáty se stabilním rytmem 2x promyty v 1 ml vyhřátého PBS po dobu 5 minut. Poté byly inzerty s explantáty vloženy do čerstvého média a uloženy do inkubátoru pro případné opakované použití. Jednotlivé explantáty byly použity maximálně třikrát.

4.5.2 Analýza degradace proteinu PER2

Analýza degradace proteinu PER2 probíhala podle dříve popsaného metodického postupu (Liška et al., 2021). Po 1 dni nahrávání, v maximu PER2-bioluminiscence, byl ke všem E17 SCN explantátům přidán 1 μ l 40 μ g/ml CHX. Společně s CHX byl k explantátům přidán 1 μ l 0,1mM DEX, nebo 1 μ l VEH. Po aplikaci a promíchání média byl inzert vložen zpět do média, Petriho misky zalepeny a vloženy zpět do LumiCyclu. Po přibližně 24 hodinách od aplikace CHX byly explantáty 2x promyty v 1 ml vyhřátého PBS po dobu 5 minut, inzerty byly vloženy do čerstvého média a Petriho misky vloženy zpět do LumiCyclu. Nahrávání bioluminiscence následně probíhalo minimálně po dobu dalších 24 hodin. Poté byly inzerty s explantáty vloženy do čerstvého média a uloženy do inkubátoru pro opakované použití.

4.5.3 Měřené parametry a statistická analýza dat z Lumicyclu

Pro analýzu primárních dat z LumiCycle byl použit program LumiCycle Analysis (Actimetrics). Z programu LumiCycle Analysis byl odečítán průměr periody tří cyklů před aplikací a tří cyklů po aplikaci. Poměr periody po a před aplikací byl vyjádřen jako relativní perioda. Dále byla odečítána amplituda rytmu posledního cyklu před aplikací a prvního po aplikaci a jejich poměr byl vyjádřen jako akutní změna v relativní amplitudě. Pro statistickou analýzu dat byl použit program GraphPad Prism a změna v relativní periodě a akutní změna v relativní amplitudě byly

mezi jednotlivými skupinami porovnány s využitím nepárového t-testu. Amplitudy jednotlivých cyklů byly vypočítány z primárních dat v programu Microsoft Excel podle vzorce: $(\max n\text{-tého cyklu} - \min n\text{-tého cyklu})/2$. Amplitudy jednotlivých cyklů daného explantátu byly dále normalizovány podle amplitudy prvního cyklu, jemuž byla přidělena hodnota 1. Pro srovnání normalizovaných amplitud jednotlivých cyklů byla použita dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidákovým vícečetným srovnávacím testem. Pro určení změny fáze rytmu byla v programu LumiCycle Analysis do prvních 3 dnů záznamu luminiscence (před aplikací testované látky nebo VEH) vložena sinusoida, která se poté extrapolovala, a časový bod prvního maxima cyklu extrapolované části sinusoidy se porovnal s korespondujícím maximem cyklu bioluminiscenčního záznamu po aplikaci testované látky nebo VEH. Fázový posun byl určen rozdílem v předpokládané fázi (extrapolovaná sinusoida) a skutečně naměřené fázi (záznam luminiscence po aplikaci testované látky). Do statistické analýzy byly zahrnuty pouze takové vzorky, jejichž rytmus nevykazoval přílišné nepravidelnosti a jejichž amplituda z LumiCycle Analysis neklesla v průběhu pokusu pod hodnotu 3. Vyřazeny byly také vzorky, u kterých po aplikaci došlo k akutnímu poklesu relativní amplitudy pod hodnotu 0,5. Pro analýzu dat z degradační eseje byla použita primární data z LumiCycle Analysis z úseku mezi aplikací CHX a následujících 12 hodin nahrávání. Tato data byla dále znormalizována v programu GraphPad Prism a proložena regresní křivkou jednofázového exponenciálního rozpadu podle rovnice:

$y = (y_0 - \lambda)e^{-Kx} + \lambda$, kde K = degradační konstanta, y_0 = počáteční hladina PER2 a x = čas. Doba k prvnímu maximu PER2-bioluminiscence po odmytí CHX mezi DEX a VEH byla porovnána nepárovým t-testem v programu GraphPad Prism. Do statistické analýzy degradační eseje byly zahrnuty pouze takové vzorky, u nichž bylo jasně zřetelné maximum prvního cyklu po domytí z CHX, indikující životaschopnost explantátů.

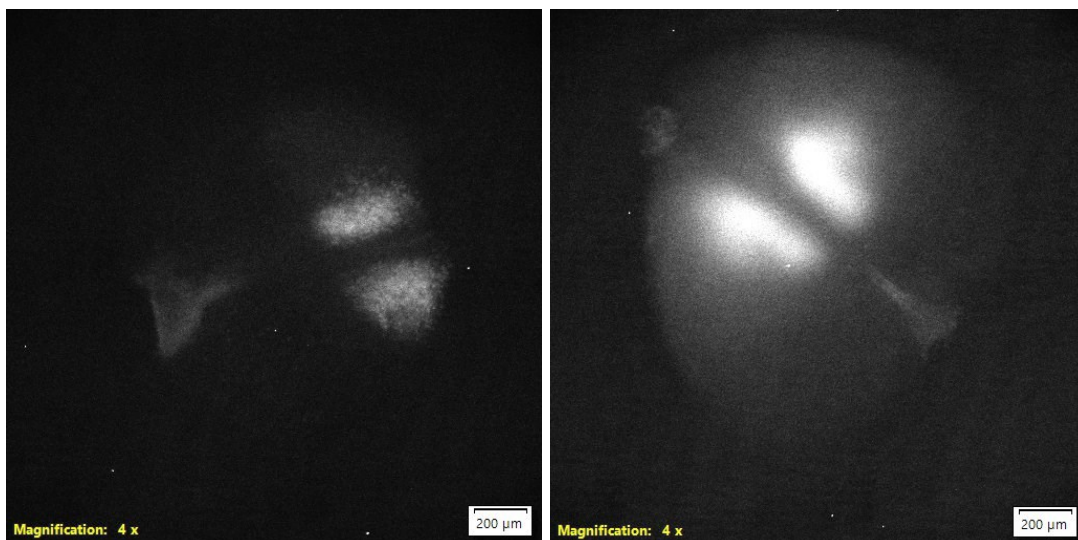
4.6 Izolace RNA, RT a RT-qPCR z E17 SCN

Příprava explantátů

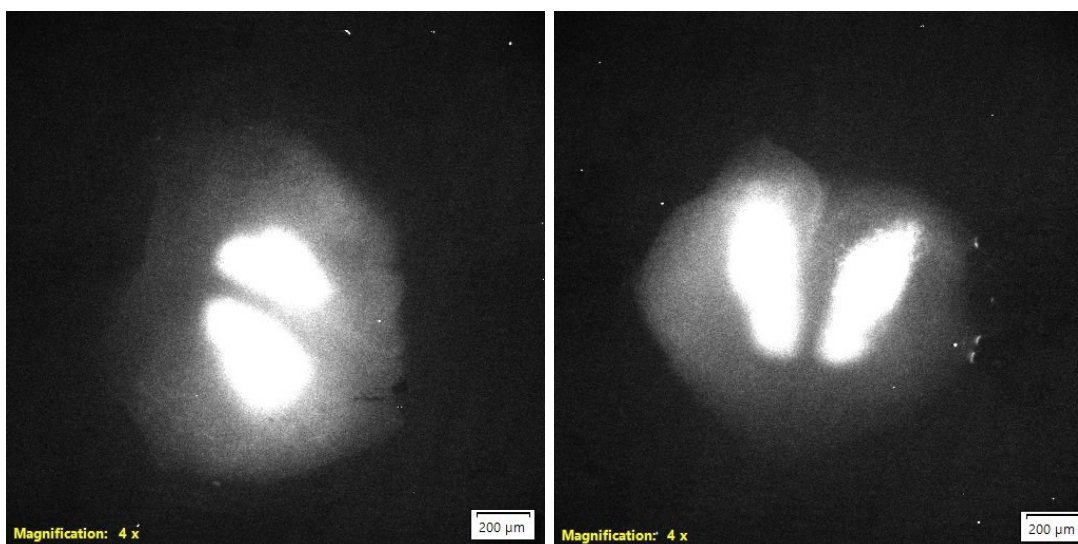
Pro použití v RT-qPCR byly explantáty pomocí skalpelu a binokulární lupy oříznuty co nejbližší SCN tak, aby byla minimalizována okolní tkáň. Na základě vyhodnocení fotografií E17 SCN explantátů z mikroskopu Luminoview LV200 (Olympus, Japonsko); jedná se o specializovaný invertovaný mikroskop s extrémní numerickou aperturou, zkrácenou optickou drahou s 0,2x zvětšující tubusovou čočkou a 20x objektivem; umožňuje zobrazování bioluminiscence pomocí několikaminutových expozičních časů EM-CCD kamerou od firmy Hamamatsu chlazenou na $-91\text{ }^{\circ}\text{C}$), byl při přípravě explantátu změněn směr řezu tak, aby explantáty obsahovaly co

nejméně okolní tkáň, a to především ve směru 3.mozkové komory. Takto připravené explantáty byly zkontrolovány v mikroskopu LV200 (Obr. 6).

A)



B)



Obr. 6 Reprezentativní fotografie E17 SCN explantátů v luminiscenčním mikroskopu Luminoview LV200, zvětšeno 4x. A) snímky nevhodně připravených explantátů obsahující větší část okolní tkáň a třetí mozkové komory, B) snímky vhodněji připravených explantátů s menší částí okolní tkáň a bez třetí mozkové komory.

V den odběru byly explantáty vloženy do LumiCyclu a bylo započato nahrávání jejich PER2-bioluminiscence. Pro sledování vlivu GC na fetální SCN byly použity explantáty po dvou dnech kultivace. Ve zvolený cirkadiánní čas explantátů (CT 4, CT16) v závislosti na konkrétním pokusu byly explantáty buď přímo sejmuty z inzertu, nebo k nim byl aplikován 1 μ M DEX, případně VEH a explantáty byly z inzertu sejmuty po uplynutí 1h nebo 3h od aplikace. CT 12 bylo určeno jako maximum PER2-bioluminiscence a CT 0 jako minimum PER2-bioluminiscence. V době působení DEX nebo VEH byly explantáty udržovány při teplotě 37 °C. Pro sejmutí explantátu z inzertu byly Petriho misky přeneseny do laminárního boxu a uvolněny z inzertu kapkou PBS tak, aby nedošlo k porušení jemné struktury explantátu a ztrátě buněk na inzertu. Následně byly explantáty s PBS 1000 μ l pipetou přeneseny do RLT lyzačního pufru s přidaným BME. V pilotních pokusech byly explantáty homogenizovány pomocí rotor-stator homogenizátoru. Díky malé velikosti explantátů a struktuře nervové tkáně však dochází k úplnému rozpuštění explantátů již při vložení do RLT lyzačního pufru a nebylo nutné rotor-stator homogenizátor dále používat. Po okem pozorovatelném rozpuštění explantátu v RLT lyzačním pufru byly vzorky pouze krátce promíchány za použití stolního vortexu. Následně bylo okamžitě pokračováno v procesu izolace RNA, případně byly vzorky v závislosti na typu pokusu zamrazeny na suchém ledu a uchovávány v -80 °C až do dokončení procesu izolace RNA. Pro uchovávání explantátů bez nutnosti okamžité izolace po jejich sejmutí z inzertu byly v pilotních pokusech některé z explantátů do izolace RNA uchovávány v RNAlateru při teplotě 6 °C. Vzhledem k technicky vyšší náročnosti, než při mražení v RLT pufru, nebyl tento postup dále používán.

RNA byla z explantátů vyizolována s použitím RNeasy® Mini kitu podle protokolu *Purification of Total RNA from Animal Tissues* v *RNeasy® Mini Handbook*. Pro odstranění gDNA kontaminace byl přidán krok štěpení DNázou I na izolační kolonce za použití RNase-Free DNase Setu podle protokolu *RNase-Free DNase Set Product Sheet*. Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Vyizolovaná RNA byla do RT skladována v -80 °C.

Reverzní transkripce (RT)

RT probíhala v 96 jamkové destičce v přístroji Eppendorf Vapo.Protect Mastercycler® Pro (Eppendorf, Německo) v objemu 10 μ l na jeden vzorek v reakci (Tab. 6):

Tab. 6 Složení reakce RT.

High-Capacity cDNA Reverse Transcription	V
10X RT pufr	1 μ l
25X dNTP Mix (100 mM)	0,4 μ l
10X náhodné RT oligonukleotidy (primery)	1 μ l
Reverzní transkriptáza	0,5 μ l
RNA	7,1 μ l

za následujících podmínek (Tab. 7):

Tab. 7 Podmínky reakce RT.

T	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
t	10 min	120 min	5 min	---

cDNA byla skladována v -20 °C pro následné použití v RT-qPCR. Pro použití v RT-qPCR byla cDNA 9x zředěna.

RT-qPCR

V RT-qPCR byly použity následující oligonukleotidy (angl, primery) (Tab. 8),
KiCqStart® SYBR® Green Primers (Sigma Aldrich, USA):

Tab. 8 Sekvence použitých oligonukleotidů v RT-qPCR z E17 SCN explantátů.

Sekvence použitých oligonukleotidů (primerů)	
FM <i>Bmal1</i>	AAATCCACAGGATAAGAGGG
RM <i>Bmal1</i>	ATAGTCCAGTGGAAGGAATG
FM <i>Per1</i>	GTTCTCATAGTTCCTCTTCTG
RM <i>Per1</i>	GTGAGTTTGTACTCTTGCTG
FM <i>Nr1d1</i>	AGTCTCAGTGATGATAGCTC
RM <i>Nr1d1</i>	ATTCAGCTTGGTAATGTTGC
FM <i>Per2</i>	CTTTCAGTGAAGAAGGACG
RM <i>Per2</i>	CTGAGTGAAAGAATCTAAGCC
FM <i>Nr3c1</i>	GAAAACCTTACTGCTTCTCTC
FM <i>Nr3c1</i>	GATTTTCAACCACATCATGC
FM <i>Vip</i>	ATGATGTGTCAAGAAATGCC
RM <i>Vip</i>	GGTGTAGTTATCTGTGAAGAC
FM <i>Pgk1</i>	CTATCATAGGTGGTGGAGAC
RM <i>Pgk1</i>	ACACTAGGTTGACTTAGGAG
FM <i>Ywhaz</i>	ACTTAACATTGTGGACATCG
RM <i>Ywhaz</i>	GGATGACAAATGGTCTACTG
FM <i>E4bp4</i>	GCCCTTTCTTTTCCCCCTCA
RM <i>E4bp4</i>	TGTCCGGCACAGGGTAAATC
FM <i>Hprt</i>	AGGGATTTGAATCACGTTTG
RM <i>Hprt</i>	TTTACTGGCAACATCAACAG
FR <i>c-Fos</i>	AAAACCTGGAGTTTATTTTGGC
RR <i>c-Fos</i>	CACAGACATCTCCTCTGG
FM <i>Fkbp5</i>	CAATGCTGAGCTTATGTACG
RM <i>Fkbp5</i>	CTTTTCTTTGGTGTCCATCTC
FM <i>Sgk1</i>	ATCCTGAAGAAGAAAGAGGAG
RM <i>Sgk1</i>	ATGTAGTCCAGGACAAAGTAG
FM <i>Gilz</i>	CAAGCTGAACAACATAATGC
RM <i>Gilz</i>	GCTCAATCTTGTGTCTAGG
FM <i>B2m</i>	TCTCACTGACCGGCCTGTATGCTATC
RM <i>B2m</i>	AATGTGAGGCGGGTGGAACTGTG

RT-qPCR probíhala v 384 jamkové destičce v přístroji LightCycler 480 Roche® (Qiagen, Německo) v objemu 7 μ l na jeden vzorek podle reakce (Tab. 9):

Tab. 9 Složení reakce RT-qPCR.

Xceed qPCR	<i>V</i>
SYBR Green mastermix	3,5 μ l
Voda bez RNáz	1,22 μ l
10 μ M F+R oligonukleotidy (primery)	0,28 μ l
10ng cDNA	2 μ l

za následujících podmínek (Tab. 10):

Tab. 10 Podmínky reakce RT-qPCR.

Počet	Cyklus	<i>T</i>	<i>t</i>
1x	Preinkubace	95 °C	120s
45 x	Denaturace	90 °C	20s
45 x	Amplifikace	60 °C	30s
1x	Stanovení křivky tání	95 °C	15s
		60 °C	60s
		60 °C - 95 °C	318s
1x	Zchlazení	95 °C - 40 °C	22s

Jako referenční geny byly navrženy geny pro *beta-2-mikroglobulin (B2m)*, *hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu (Hppt)*, *fosfoglycerát kinázu 1 (Pgk1)* a *tyrosin 3-monooxygenáza/ tryptofan 5-monooxygenáza aktivující protein zeta (Ywhaz)*. Účinnost použitých oligonukleotidů byla pomocí sestavení standardní křivky ověřena na fetálních SCN *mPer2^{Luc}* myši připravených laserovou mikrodisekcí (osobní sdělení).

Analýza probíhala v programu LightCycler® 480 SW1.5. Po každém RT-qPCR proběhla analýza křivek tání za účelem detekce nespecifických produktů. Pro výpočet relativní exprese v Microsoft Excel byla použita metoda $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001) s využitím průměru tří referenčních genů *Hppt*, *Pgk1* a *Ywhaz*. Kontrolní vzorek byl připraven z E17 SCN explantátu vykazující pravidelný rytmus a vysokou amplitudu.

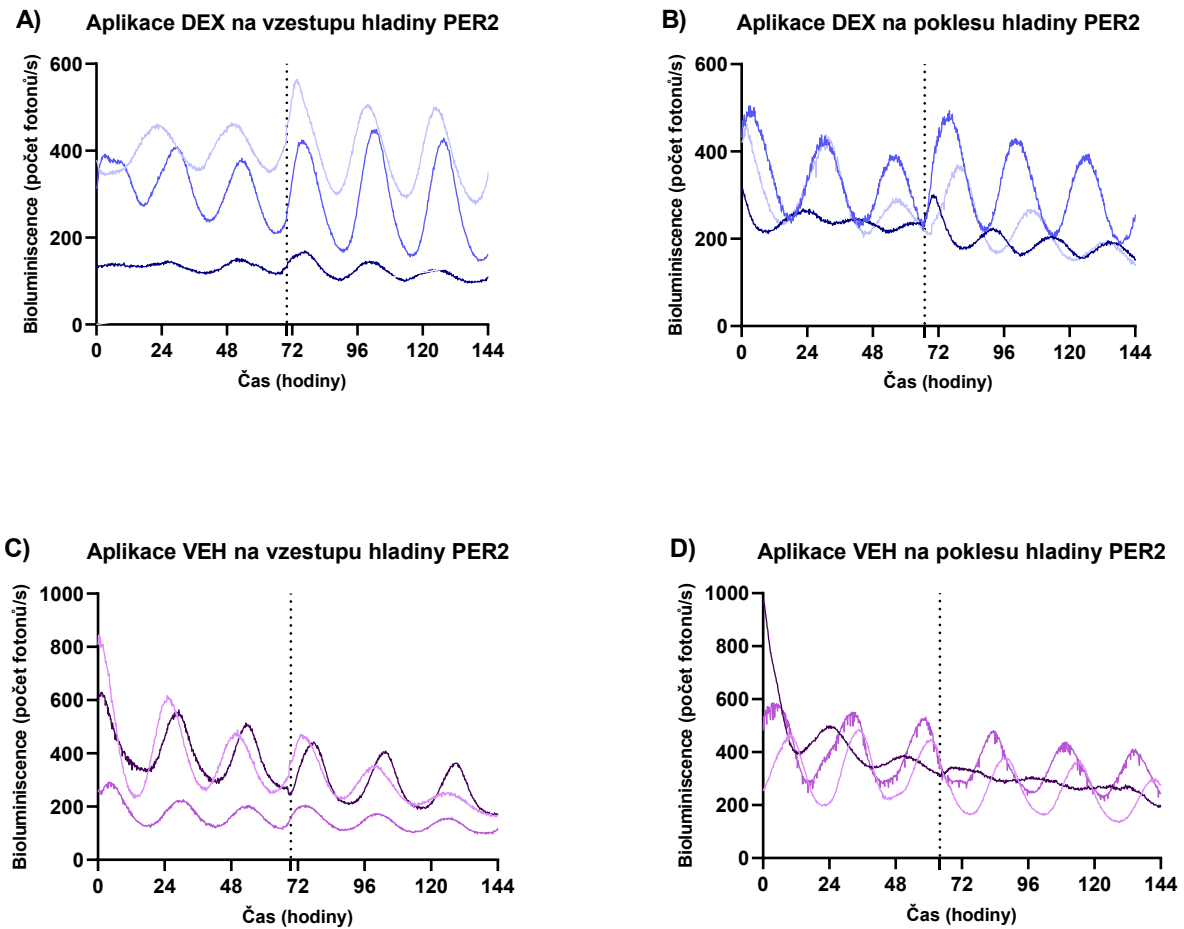
$\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct testovaného vzorku – Δ Ct kontrolního vzorku, kde

Δ Ct testovaného vzorku = Ct cílového genu – Ct průměru referenčních genů

5 Výsledky

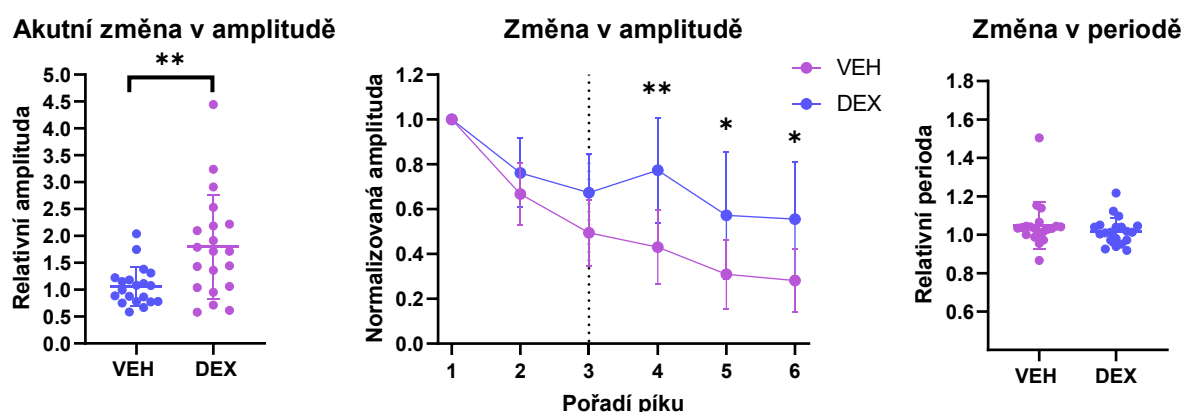
5.1 Vliv aplikace DEX na parametry cirkadiálních hodin E17 SCN

Pro stanovení vlivu GC na fetální SCN *in vitro*, byl k E17 SCN explantátům aplikován VEH nebo 1 μ M DEX. Reprezentativní křivky (Obr. 7) znázorňující záznamy PER2-bioluminiscence explantátů při aplikaci DEX nebo VEH na vzestupu hladiny proteinu PER2, mezi CT 0-12 a aplikací na poklesu hladiny proteinu PER2, mezi CT 12-24.



Obr. 7 Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence E17 SCN s aplikací A) DEX v CT 0-12, B) DEX v CT 12-24 C) VEH v CT 0-12, D) VEH v CT 12-24. Na ose x je vyneseno čas vyjádřený v hodinách nahrávání PER2-bioluminiscence v přístroji LumiCycle. Osa y představuje naměřenou bioluminiscenci vyjádřenou počtem emitovaných fotonů za sekundu. Svislá přerušovaná čára značí aplikaci 1 μ M DEX, nebo VEH.

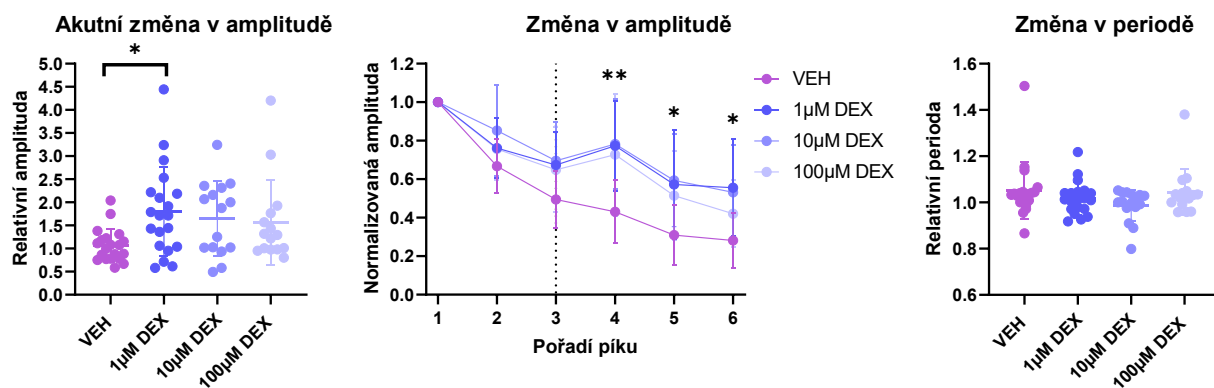
Statistické porovnání prokázalo rozdílný vliv aplikace 1 μ M DEX ($n = 20$) oproti VEH ($n = 20$) (Tab. 11). Po aplikaci DEX v porovnání s VEH došlo k signifikantnímu zvýšení amplitudy prvního cyklu následujícího aplikaci (akutní změně v amplitudě). Zvýšení amplitudy po aplikaci DEX přetrvávalo po další dva cykly. Na délku periody neměla aplikace DEX vliv (Obr. 8). DEX byl následně aplikován v koncentracích 10 μ M ($n = 16$) DEX a 100 μ M DEX ($n = 16$). Zvýšení koncentrace nevedlo ke zvýšení vlivu DEX na amplitudu E17 SCN (Obr. 9). Signifikantní rozdíl nebyl zaznamenán ani ve změně periody (Tab. 11).



Obr. 8 Porovnání rozdílu v akutní změně amplitudy, změně amplitudy jednotlivých cyklů a ve změně v periodě po aplikaci VEH nebo 1 μ M DEX. Nepárový t-test prokázal signifikantní zvýšení amplitudy po 1 μ M DEX oproti VEH (** $p < 0,005$). Dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidákovým vícečetným srovnávacím testem prokázala signifikantní zvýšení amplitudy prvního cyklu po aplikaci DEX (** $p < 0,005$) a dvou následujících cyklů (* $p < 0,05$). Nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl v periodě při aplikaci 1 μ M DEX oproti VEH ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 11 Statistická analýza dat z LumiCycle Analysis při aplikaci VEH, nebo 1 μ M DEX

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Dvoufaktorová ANOVA, Šidákov srovnávací test	Změna v normalizované amplitudě jednotlivých cyklů		
	4. cyklus	VEH vs. 1 μ M DEX	**0,001
	5. cyklus	VEH vs. 1 μ M DEX	*0,0206
	6. cyklus	VEH vs. 1 μ M DEX	*0,014
Nepárový t-test	Akutní změna v amplitudě	VEH vs. 1 μ M DEX	**0,0028
	Akutní změna v periodě	VEH vs. 1 μ M DEX	0,3185

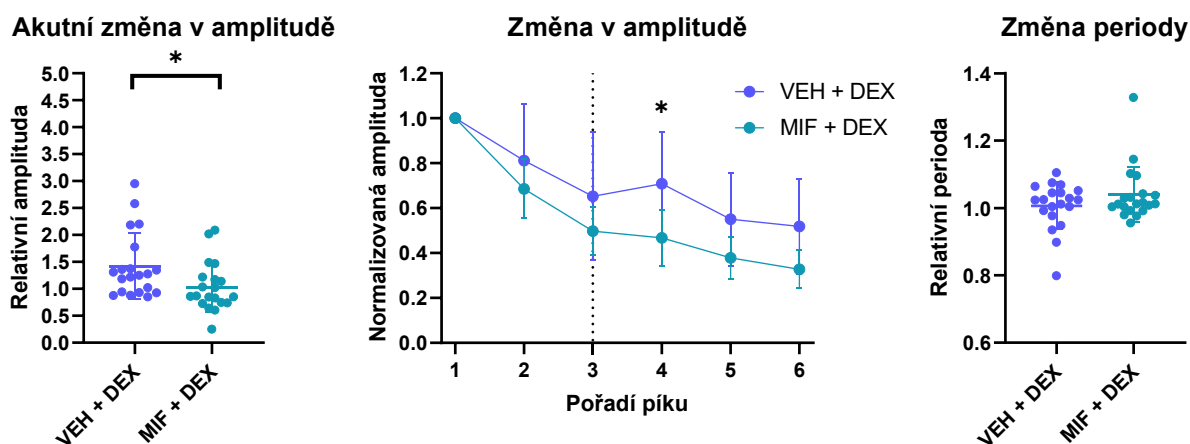


Obr. 9 Porovnání rozdílu v akutní změně amplitudy, amplitudy jednotlivých cyklů a ve změně v periodě po aplikaci VEH, nebo 1µM, 10µM, 100µM DEX. Jednofaktorová ANOVA následovaná Dunnettovým vícečetným srovnávacím testem prokázala zvýšení amplitudy při aplikaci 1µM DEX oproti VEH (* $p < 0,05$). Dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidakovým vícečetným srovnávacím testem prokázala zvýšení amplitudy prvního cyklu po aplikaci 1µM, 10µM, 100µM DEX a následujících dvou cyklů (* $p < 0,05$). Nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl v periodě 1µM DEX oproti VEH ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 12 Statistická analýza dat z LumiCycle Analysis po aplikaci VEH, nebo 1µM, 10µM, 100µM DEX

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Dvoufaktorová ANOVA, Dunnettův srovnávací test	Změna v normalizované amplitudě jednotlivých cyklů		
	4. cyklus	VEH vs. 1µM DEX	**0,0015
		VEH vs. 10µM DEX	**0,0011
		VEH vs. 100µM DEX	**0,007
	5. cyklus	VEH vs. 1µM DEX	*0,0201
		VEH vs. 10µM DEX	*0,0106
		VEH vs. 100µM DEX	0,0922
	6. cyklus	VEH vs. 1µM DEX	*0,0144
		VEH vs. 10µM DEX	*0,029
VEH vs. 100µM DEX		0,3481	
Jednofaktorová ANOVA, Dunnettův srovnávací test	Akutní změna v amplitudě	VEH vs. 1µM DEX	*0,0124
		VEH vs. 10µl DEX	0,0853
		VEH vs. 100µl DEX	0,1649
	Změna v periodě	VEH vs. 1µl DEX	0,5813
		VEH vs. 10µl DEX	0,125
		VEH vs. 100µl DEX	0,9952

Specificita působení DEX byla ověřena pomocí blokády GR aplikací 1 μ M MIF. Statistické porovnání prokázalo rozdílný vliv aplikace MIF ($n = 20$) oproti aplikaci VEH ($n = 20$) (Tab. 13). V případě aplikace MIF došlo ke snížení vlivu DEX na amplitudu E17 (Obr. 10)

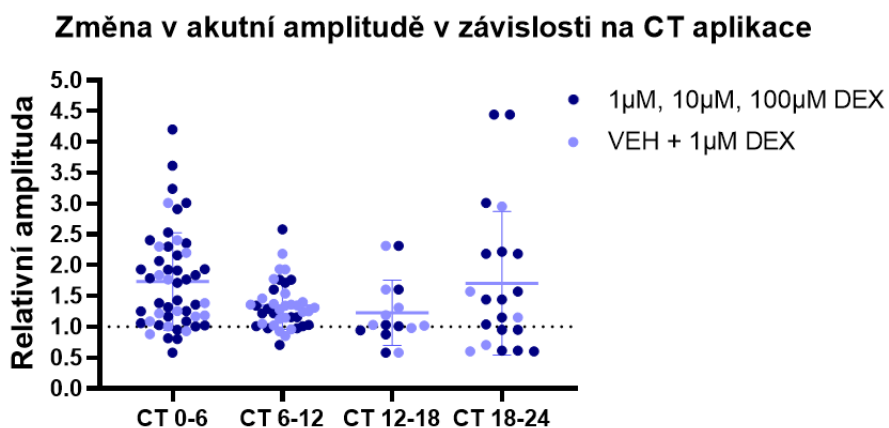


Obr. 10 Porovnání rozdílu v akutní změně amplitudy, změně v amplitudy a v změně v periodě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, nebo 1 μ M MIF + 1 μ M DEX. Nepárový t-test prokázal signifikantní snížení amplitudy při aplikaci 1 μ M MIF oproti VEH (* $p < 0,05$). Dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidákovým vícečetným srovnávacím testem prokázala signifikantní snížení amplitudy prvního cyklu při aplikaci 1 μ M MIF oproti VEH (* $p < 0,05$). Nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl v periodě při aplikaci 1 μ M MIF oproti VEH ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 13 Statistická analýza dat z LumiCycle Analysis po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, nebo 1 μ M MIF + 1 μ M DEX

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Dvoufaktorová ANOVA, Šidákov srovnávací test	Změna v normalizované amplitudě jednotlivých cyklů		
	4. cyklus	VEH + DEX vs. MIF + DEX	*0,0346
	5. cyklus	VEH + DEX vs. MIF + DEX	0,2481
	6. cyklus	VEH + DEX vs. MIF + DEX	0,1524
Nepárový t-test	Akutní změna v amplitudě	VEH + DEX vs. MIF + DEX	*0,0262
	Akutní změna v periodě	VEH + DEX vs. MIF + DEX	0,184

Reprezentativní křivky (Obr. 13) představují dvoudenní úsek záznamu PER2-bioluminiscence při aplikaci DEX v různých fázích cirkadiálního cyklu. Reprezentativní křivky (Obr. 14) představují dvoudenní úsek záznamu PER2-bioluminiscence při aplikaci VEH nebo MIF + DEX. Signifikantní rozdíl zvýšení amplitudy v závislosti na CT aplikaci (Obr. 11) nebyl pozorován (Tab. 14). Míra odpovědi se mezi jednotlivými explantáty lišila (Obr. 12).

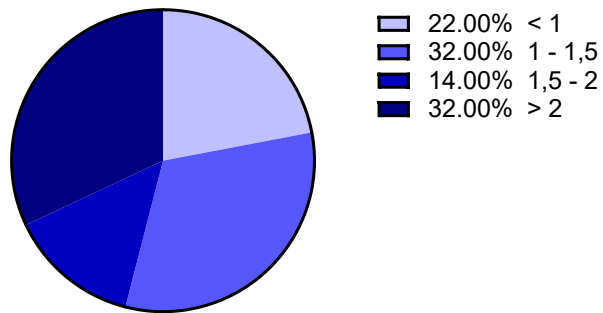


Obr. 11 Změna v akutní amplitudě při aplikaci DEX nebo VEH + DEX v CT 0-6, CT 6-12, CT 12-18, CT 18-24. Jednofaktorová ANOVA s Turkeyho testem nepotvrdila signifikantní rozdíl v závislosti na CT aplikaci ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

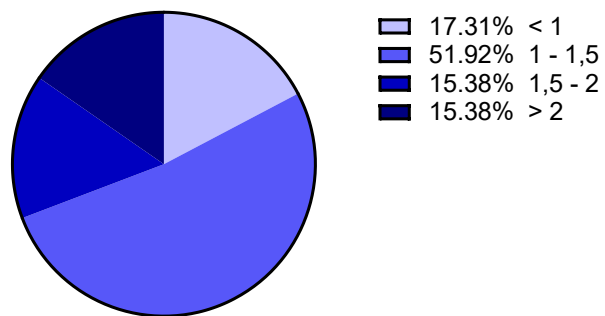
Tab. 14 Statistické porovnání změny v amplitudě při aplikaci DEX v CT 0-6, CT 6-12, CT 12-18, CT 18-24

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Jednofaktorová ANOVA, Turkeyho test	Akutní změna v amplitudě	CT 0-6 vs. CT 6-12	0,0668
		CT 0-6 vs. CT 12-18	0,0983
		CT 0-6 vs. CT 18-24	0,9990
		CT 6-12 vs. CT 12-18	0,9551
		CT 6-12 vs. CT 18-24	0,2680
		CT 12-18 vs. CT 18-24	0,2274

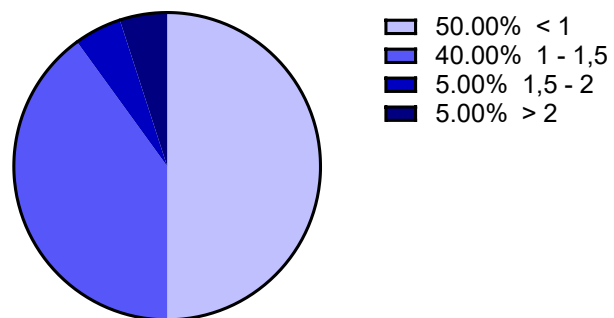
Akutní změna v amplitudě při aplikaci DEX



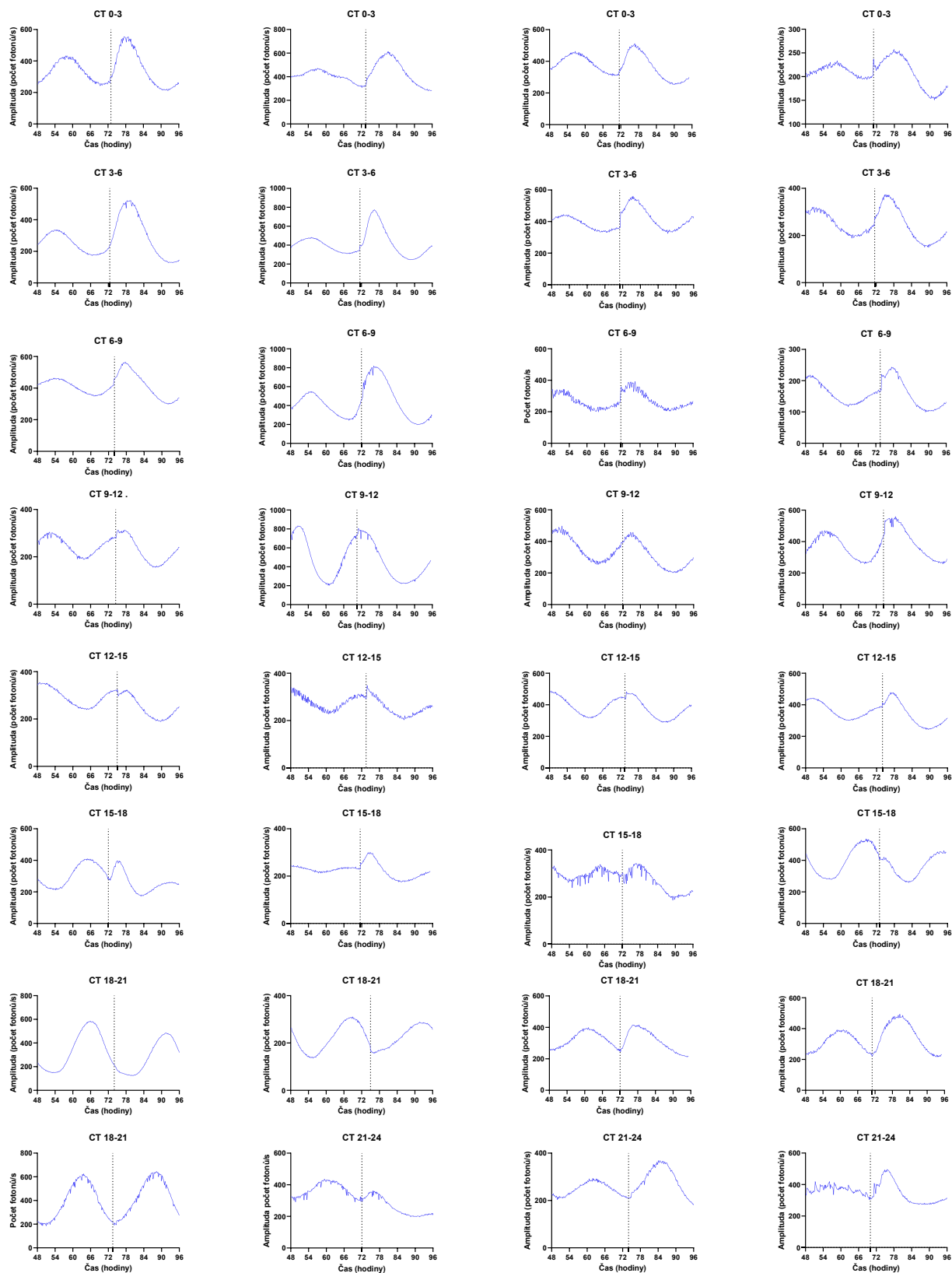
Akutní změna v amplitudě při aplikaci VEH + DEX



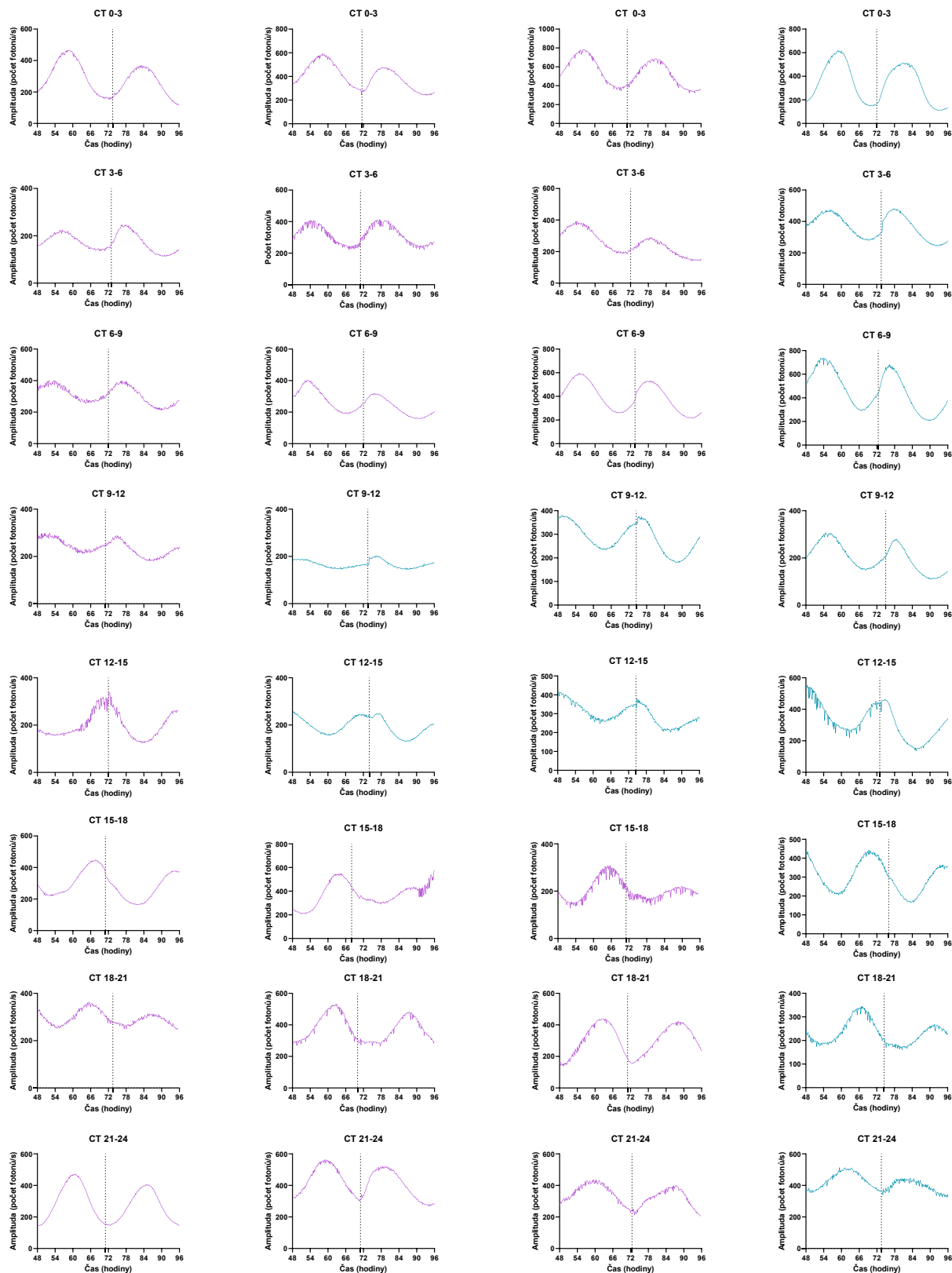
Akutní změna v amplitudě při aplikaci VEH



Obr. 12 Míra akutní změny amplitudy u jednotlivých explantátů při aplikaci DEX, VEH + DEX a VEH.

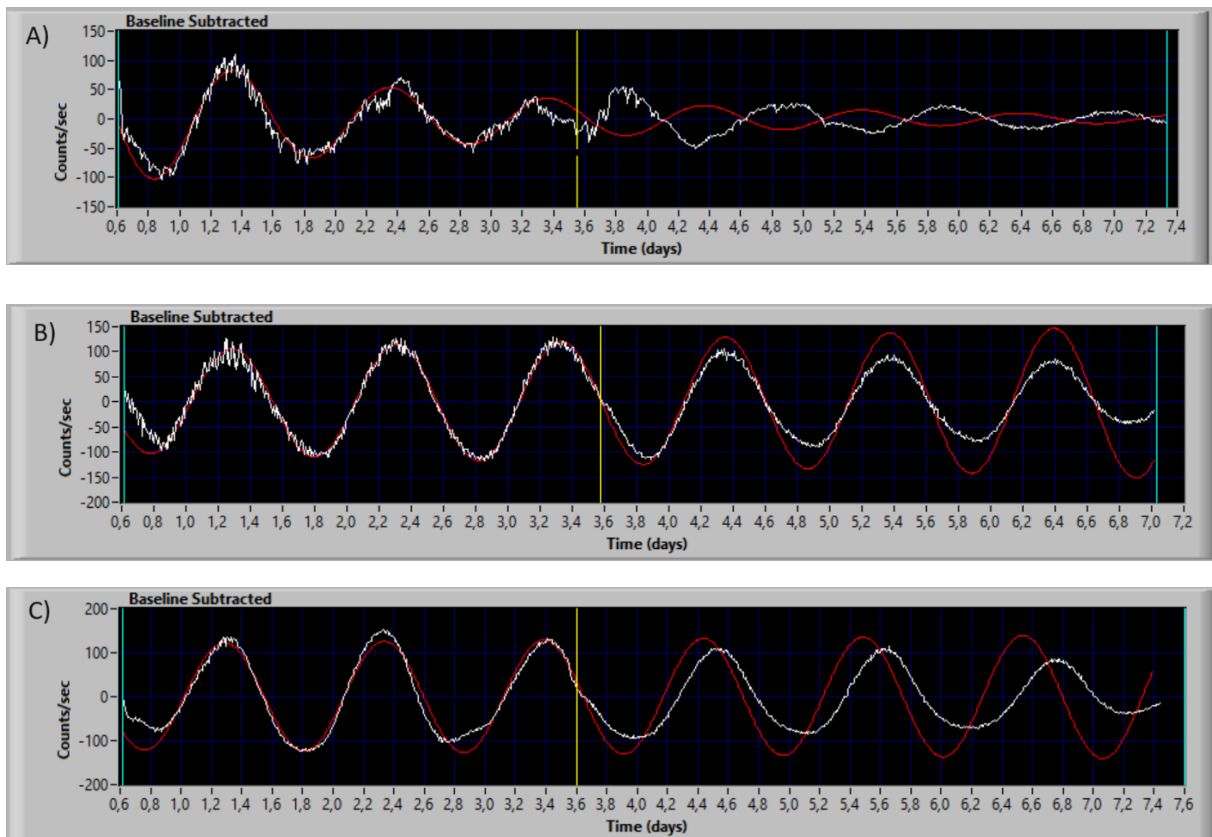


Obr. 13 *Reprezentativní záznamy PER2-bioluminescence E17 SCN s aplikací DEX v 8 úsecích cirkadiálního cyklu: CT 0-3, CT 3-6, CT 6-9, CT 9-12, CT 12-15, CT 15-18, CT 18-21, CT 21-24.*



Obr. 14 Reprezentativní záznamy *PER2*-bioluminiscence *E17 SCN* s aplikací *VEH* (fialová) nebo *MIF + DEX* (tyrkysová) v 8 úsecích cirkadiánního cyklu: CT 0-3, CT 3-6, CT 6-9, CT 9-12, CT 12-15, CT 15-18, CT 18-21, CT 21-24.

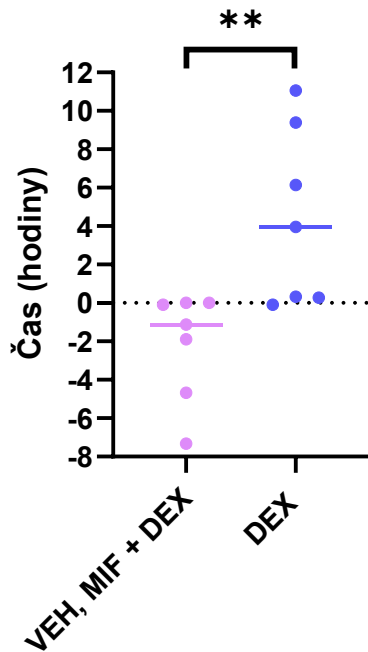
U explantátů, u nichž proběhla aplikace DEX, VEH nebo MIF + DEX v CT 15-18,5, byl změřen fázový posun. Fázový posun byl určen rozdílem v předpokládané fázi (extrapolovaná sinusoida) a skutečně naměřené fázi (záznam luminiscence po aplikaci) (Obr 15.)



Obr. 15 Záznamy PE2-bioluminiscenčního rytmu E17 SCN explantátů v přístroji LumiCycle. Bílá sinusoida představuje zaznamenanou bioluminiscenci, žlutá příčná čára čas aplikace (CT 15-18,5) a červená sinusoida předpokládané přirozené pokračování rytmu bez jakékoliv manipulace s explantáty, A) aplikace vyvolala fázové předběhnutí, B) aplikace nevyvolal fázový posun, C) aplikace vyvolala fázové zpoždění.

Aplikace DEX ($n = 7$) v CT 15-18,5 u E17 SCN nevyvolala žádný fázový posun nebo vyvolala fázové předběhnutí. Aplikace VEH nebo MIF + DEX ($n = 7$) nevyvolala žádný posun nebo vyvolala fázové zpoždění (Obr. 15) (Tab. 15).

Fázový posun při aplikaci v CT 15 - 18,5



Obr. 16 Fázový posun rytmu E17 SCN po aplikaci DEX, VEH nebo MIF + DEX v CT 15-18,5. Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

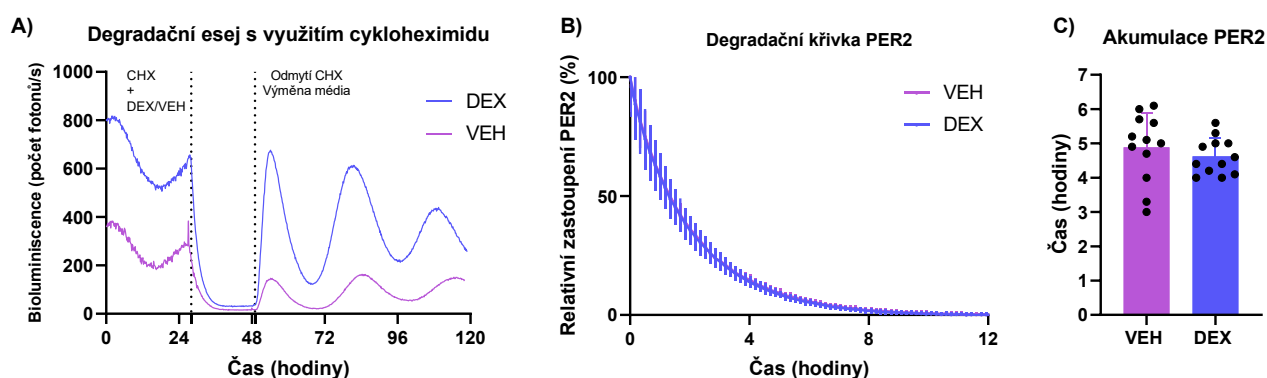
Tab. 15 Statistická analýza fázového posunu při aplikaci v CT 15-18,5.

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Nepárový t-test	Fázový posun	DEX vs. VEH, MIF + DEX	**0,0070

5.2 Mechanismy působení GC v E17 SCN

5.2.1 Analýza degradace proteinu PER2

Pro detekci vlivu DEX na dynamiku degradace proteinu PER2 byla s využitím CHX inhibována *de novo* transkripce. Reprezentativní bioluminiscenční křivky (Obr. 17 A)), dokumentující průběh pokusu. Statistické porovnání (Tab. 16) nepoukázalo na signifikantní rozdíl v rychlosti degradace PER2 ani maximální doby akumulace PER2 po odmytí CHX při aplikaci DEX ($n = 12$) oproti aplikaci VEH ($n = 12$)



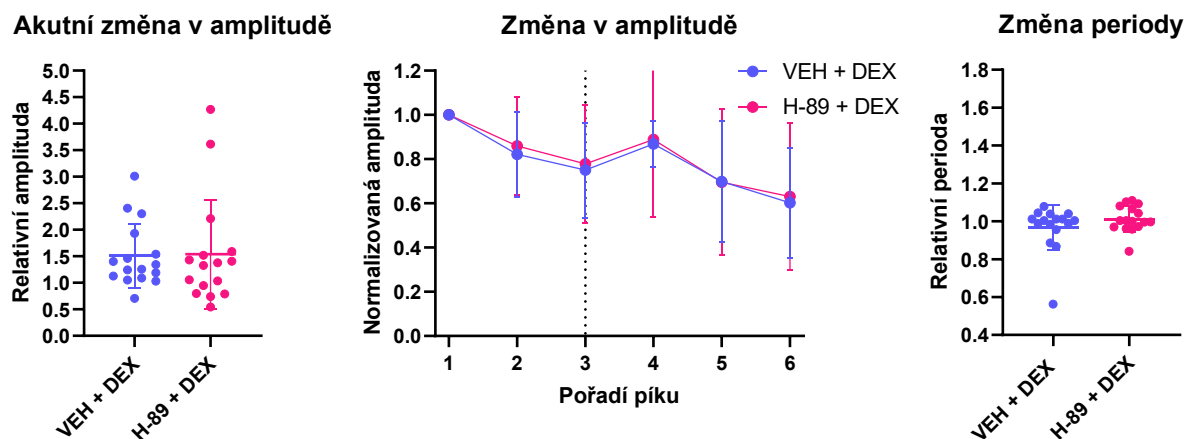
Obr. 17 **Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence E17 SCN v průběhu degradační esaje.** A) Reprezentativní záznamy PER2-bioluminiscence E17 SCN v průběhu degradační esaje První svislá přerušovaná čára značí aplikaci CHX + VEH, nebo DEX, druhá přerušovaná čára značí odmytí CHX a výměnu média, B) Degradační křivka proteinu PER2 s výsledky z 1. a 2. opakování, F-test nepoukázal na signifikantní rozdíl ($p > 0,05$) C) Doba, za kterou je dosaženo maximální akumulace proteinu PER2 po odmytí CHX, nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl ($p > 0,05$).

Tab. 16 Statistická analýzy dat z LumiCyclu z degradační esaje.

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota	K (DEX)	K (VEH)
F-test	Degradační křivka PER2				
	1. opakování	CHX + VEH vs. CHX + DEX	0,5845	0,5279	0,5627
	2. opakování	CHX + VEH vs. CHX + DEX	0,4016	0,4639	0,4275
	1.+2. opakování	CHX + VEH vs. CHX + DEX	0,9433	0,4893	0,4869
Nepárový t-test	Akumulace proteinu PER2				
	1.+ 2. opakování	CHX + VEH vs. CHX + DEX	0,4367		

5.2.2 Inhibice PKA a PKC signálních drah

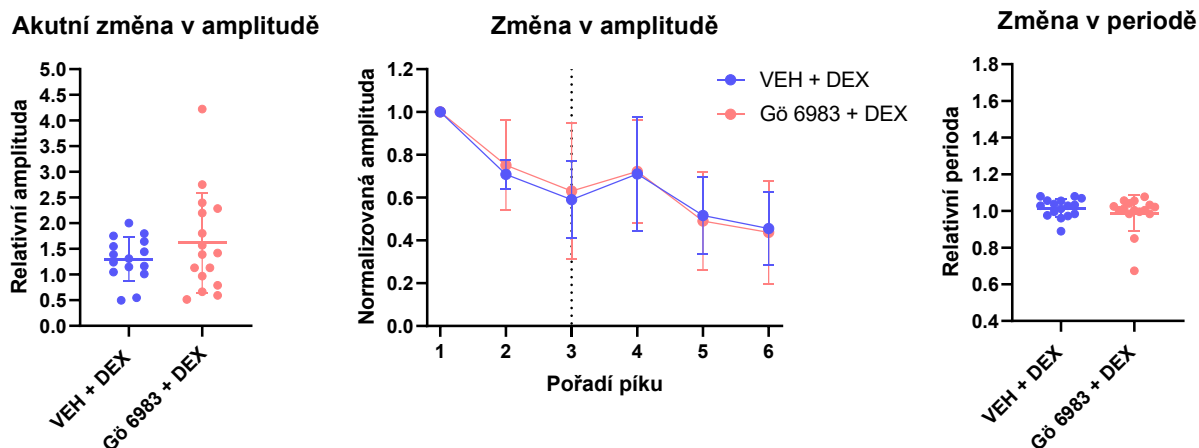
Jako další z potenciálních mechanismů působení GC ve fetálních SCN byla navržena interference DEX se signálními drahami PKA a PKC. Inhibice PKA (Obr. 18) (Tab. 17) ani PKC (Obr. 19) (Tab. 18) nevedlo ve fetálních SCN ke snížení vlivu DEX na zvýšení amplitudy.



Obr. 18 Porovnání rozdílů v akutní změně amplitudy, změně amplitudy a změně v periodě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, nebo 1 μ M H-89 + 1 μ M DEX. Nepárový t-test neprokázal změnu v amplitudě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, oproti 1 μ M H-89 + 1 μ M DEX ($p > 0,05$). Dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidákovým vícečetným srovnávacím testem neprokázala signifikantní zvýšení amplitudy prvního cyklu amplitudě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, oproti 1 μ M H-89 + 1 μ M DEX ($p > 0,05$). Nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl v periodě při aplikaci VEH + 1 μ M DEX, oproti 1 μ M H-89 + 1 μ M DEX ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 17 Statistická analýza dat z LumiCyclu po aplikaci VEH + DEX, nebo H-89 + DEX.

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Dvoufaktorová ANOVA, Šidákov srovnávací test	Změna v normalizované amplitudě jednotlivých cyklů		
	4. cyklus	H-89 + DEX vs. VEH + DEX	>0,9999
	5. cyklus	H-89 + DEX vs. VEH + DEX	0,9997
	6. cyklus	H-89 + DEX vs. VEH + DEX	0,9975
Nepárový t-test	Akutní změna v amplitudě	H-89 + DEX vs. VEH + DEX	0,9069
	Akutní změna v periodě	H-89 + DEX vs. VEH + DEX	0,2054



Obr. 19 Porovnání rozdílů v akutní změně amplitudy, změně amplitudy a změně v periodě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, nebo 10 μ M Gö 6983+1 μ M DEX. Nepárový t-test neprokázal změnu v amplitudě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, oproti 10 μ M Gö 6983+1 μ M DEX ($p > 0,05$). Dvoufaktorová ANOVA následovaná Šidakovým vícečetným srovnávacím testem neprokázala signifikantní zvýšení amplitudy prvního cyklu amplitudě po aplikaci VEH + 1 μ M DEX, oproti 10 μ M Gö 6983+1 μ M DEX ($p > 0,05$). Nepárový t-test nepoukázal na signifikantní rozdíl v periodě VEH + 1 μ M DEX, oproti 10 μ M Gö 6983+1 μ M DEX ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 18 Statistická analýza dat z LumiCyclu po aplikaci VEH + DEX, nebo Gö 6983 + DEX.

Statistický test	Porovnávaný parametr	Porovnávaný pár	p hodnota
Dvoufaktorová ANOVA, Šidakův srovnávací test	Změna v normalizované amplitudě jednotlivých cyklů		
	4. cyklus	VEH + DEX vs. Gö 6983 + DEX	>0,9999
	5. cyklus	VEH + DEX vs. Gö 6983 + DEX	>0,9999
	6. cyklus	VEH + DEX vs. Gö 6983 + DEX	>0,9999
Nepárový t-test	Akutní změna v amplitudě	VEH + DEX vs. Gö 6983 + DEX	0,2661
	Akutní změna v periodě	VEH + DEX vs. Gö 6983 + DEX	0,3317

5.3 RT-qPCR z E17 SCN explantátů

Z explantátů po 48 hodinách v kultivaci a z explantátů po 1 měsíci kultivace byla v pilotním pokusu vyizolována RNA a její koncentrace a čistota změřena na přístroji NanoDrop (Tab. 19).

Tab. 19 Naměřené hodnoty koncentrace NK, A260/A280 a CT hodnoty pro geny *B2m*, *Per2*, *Bmal1* a *Nr1d1*.

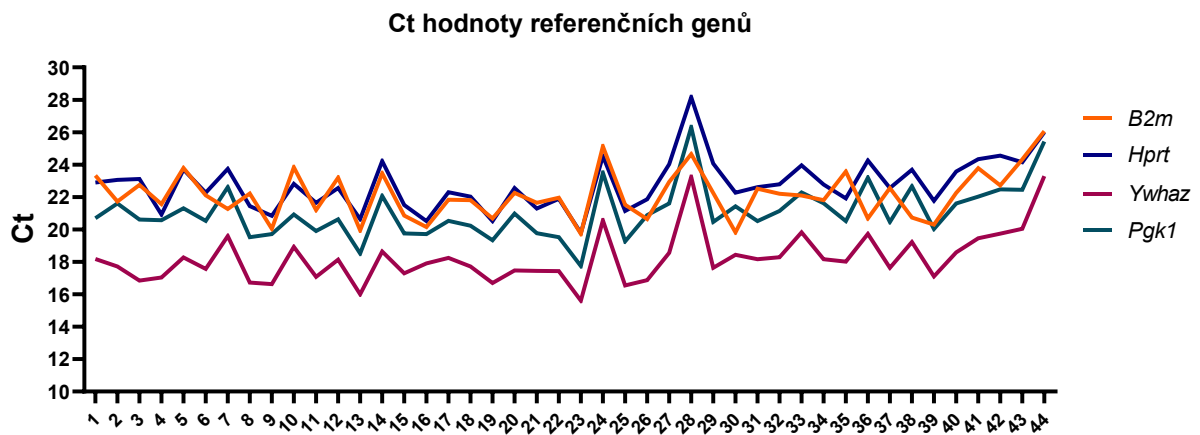
Doba kultivace	Počet explantátů	Koncentrace NK (ng/μl)	A260/A280	CT <i>B2m</i>	CT <i>Per2</i>	CT <i>Bmal1</i>	CT <i>Nr1d1</i>
1 měsíc	2	88,021	2,142	19,84	23,96	23,44	21
		86,112	2,153	26,01	40	27,63	30,49
		105,571	2,116	18,61	21,78	21,78	18,75
	1	17,591	2,579	24,96	28,58	24,04	20,74
		48,528	2,217	19,54	21,29	21,78	18,98
48 hodin	2	63,549	2,09	19,79	23,12	22,27	22,34
		50,741	2,093	19,52	22,25	21,8	22,16
		64,462	2,125	19,59	23,52	21,88	21,84
	1	37,731	2,214	19,67	24,95	22,97	23,02
		29,518	1,817	20	24,58	23,11	27,8

Následně byly otestovány způsoby skladování explantátů v čase mezi jejich sejmutí z inzertu a izolací RNA. Životaschopné explantáty po různě dlouhé době kultivace byly odebrány z inzertu a za a) přeneseny do RLT pufru s okamžitým dokončením procesu izolace RNA ($n = 8$), b) přeneseny do RLT pufru s přidaným BME a zamrazeny v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ s následnou izolací RNA po 3 dnech ($n = 8$), c) přeneseny do RNAlateru a uchovávány v $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ s následnou izolací RNA po 3 dnech ($n = 6$). U poloviny explantátů byl do procesu izolace zařazen krok DNázového štěpení. Mezi jednotlivými způsoby skladování před izolací nebyl zaznamenán výrazný rozdíl (Tab. 20).

Tab. 20 Naměřené koncentrace NK a A260/A280 při různých způsobech skladování explantátů do izolace RNA.

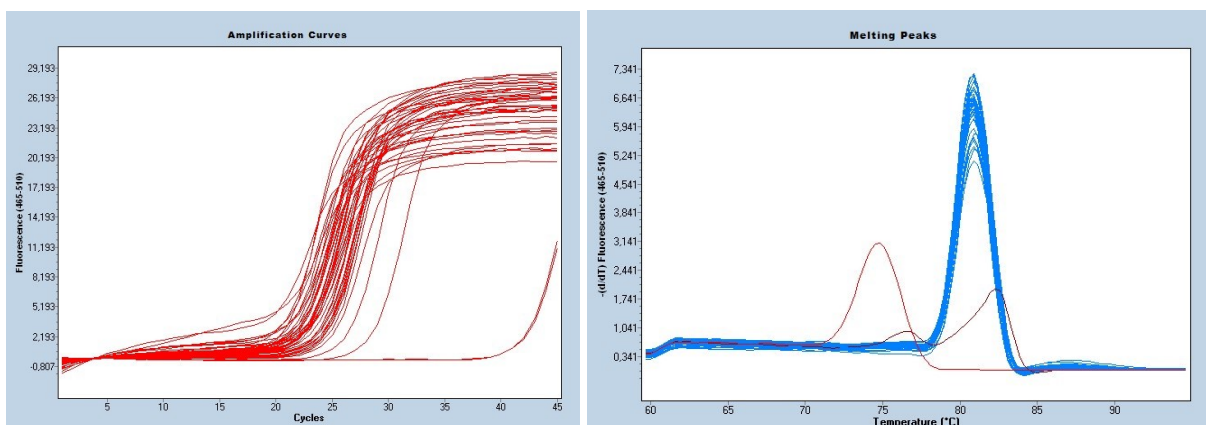
Doba kultivace	Počet explantátů	Způsob skladování	Štěpení DNázou	Koncentrace NK (ng/μl)	A260/A280
2 - 4 týdny	1	RLT, okamžitá izolace RNA	Ano	6,151 - 27,577	2,054 - 2,187
			Ne	39,394 - 78,592	1,196 - 2,113
		RLT + BME $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	Ano	19,506 - 70,988	2,066 - 2,136
			Ne	15,563 - 59,389	1,890 - 2,106
		RNAlater	Ano	15,416 - 49,293	2,067 - 2,107
			Ne	40,605 - 51,175	1,969 - 2,109

Jako referenční geny byly navrženy *B2m*, *Hprt*, *Pgk1* a *Ywhaz*. Pro $\Delta\Delta Ct$ metodu výpočtu relativní exprese byla následně zvolena kombinace *Hprt*, *Pgk1* a *Ywhaz* (Obr. 20, 21).

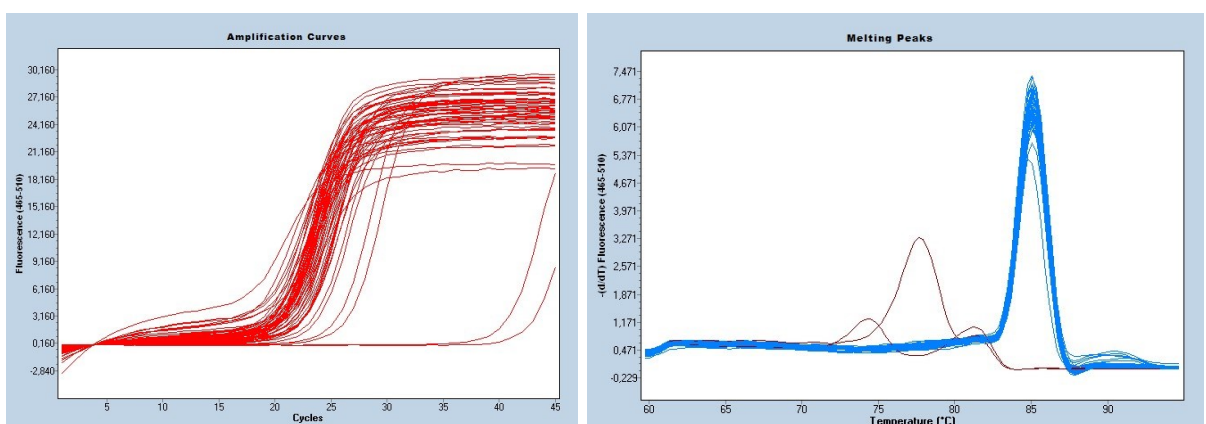


Obr. 20 Ct hodnoty referenčních genů *B2m*, *Hprt*, *Pgk1* a *Ywhaz* jednotlivých explantů.

Hprt



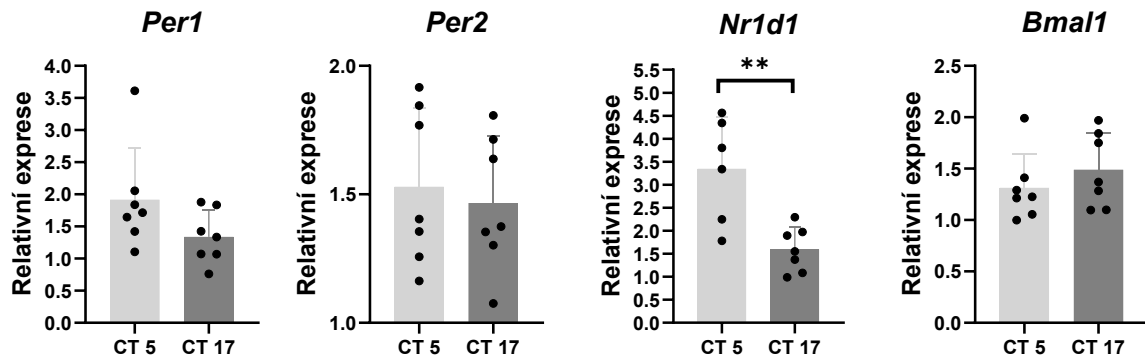
Pgk1



Obr. 21 Amplifikační křivky a křivky tání referenčních genu *Hprt* a *Pgk1*. Ct hodnoty dvou negativních kontrol, vody a RNA, se blíží 40 a na křivce tání je můžeme vidět jako nespecifické produkty.

5.3.1 Exprese hodinových genů v CT 5 a CT 17

S využitím RT-qPCR byla porovnána relativní exprese čtyř hlavních hodinových genů, *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Nr1d1* u explantátů v CT 5 ($n = 7$) a CT 17 ($n = 7$) (Obr. 22). Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze v případě *Nr1d1* (Tab. 21).



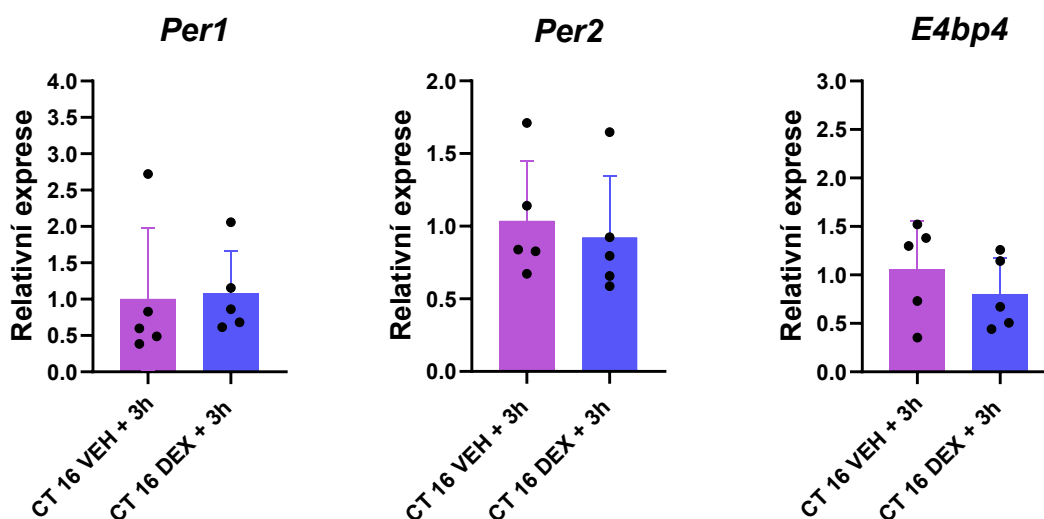
Obr. 22 Relativní genová exprese *Per1*, *Per2*, *Nr1d1* a *Bmal1* u E17 SCN explantátů v CT 5 a CT 17. Nepárový *t*-test poukázal na signifikantní rozdíl u *Nr1d1* (** $p < 0,005$), u *Per1*, *Per2* a *Bmal1* nebyla přesáhnuta hranice signifikance ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 21 Statistická analýza relativní genové exprese *Per1*, *Per2*, *Nr1d1* a *Bmal1* v E17 SCN v CT 5 a CT 17.

Relativní genová exprese				
Nepárový t-test				
Porovnávaný pár	p hodnota			
	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Nr1d1</i>	<i>Bmal1</i>
CT 5 vs. CT 17	0,1200	0,6835	**0,0032	0,3620

5.3.2 Aplikace DEX v CT 4 a CT 16 *in vitro*

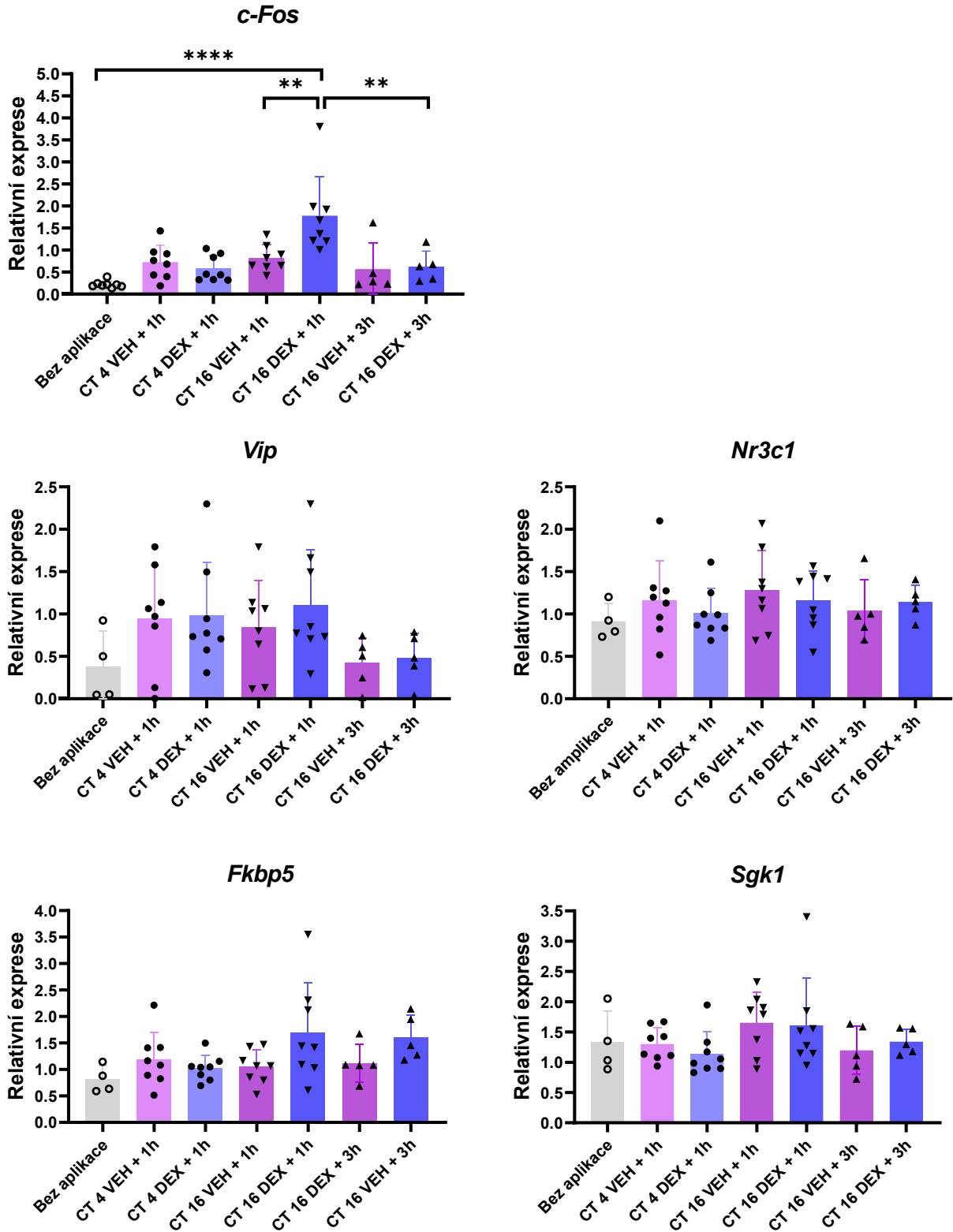
DEX nebo VEH byl aplikován k explantátům v CT 4 ($n = 14$) a CT 16 ($n = 16$) a 1h od aplikace byla změřena relativní genová exprese pro *c-Fos*, *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1* a *Gilz*. DEX ($n = 5$) nebo VEH ($n = 5$) byl dále aplikován k explantátům v CT 16 a po 3h od aplikace byla změřena relativní genová exprese pro *c-Fos*, *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1*, *Gilz*, *Per1*, *Per2* a *E4bp4* (Obr. 23, 24). Vzhledem k vysoké citlivosti E17 SCN na nespecifickou manipulaci byla dále měřena genová exprese zmíněných genů u explantátů, u kterých neproběhla aplikace DEX, ani VEH a nebylo s nimi jakkoliv manipulováno ($n = 4$). Z důvodu vysoké citlivosti explantátů na nespecifické manipulace byl počet nemanipulovaných explantátů vzorků zvýšen u *c-Fos* ($n = 8$). *Gilz* nebyl ve fetálních SCN vůbec detekován. Statistické porovnání prokázalo zvýšenou hladinu *c-Fos* po 1h od aplikaci DEX v CT 16 oproti VEH a nemanipulovaným explantátům (Tab. 23). Hladina mRNA žádného s dalších testovaných nebyla aplikací DEX ovlivněna (Obr. 23, 24)



Obr. 23 Relativní genová exprese *Per1*, *Per2* a *E4bp4* po 3h od aplikace DEX nebo VEH v CT 16. Nepárový *t*-test nepoukázal na signifikantní rozdíl u žádného z testovaných genů ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr \pm SD.

Tab. 22 Statistická analýza relativní genové exprese *Per1*, *Per2* a *E4bp4* po 3h od aplikace DEX nebo VEH v CT.

Relativní genová exprese			
Nepárový t-test			
Porovnávaný pár	p hodnota		
	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>E4bp4</i>
CT 16 VEH + 3h vs. CT 16 DEX + 3h	0,8944	0,6757	0,3888



Obr. 24 Relativní genová exprese *c-Fos*, *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1* po 1h a 3h od aplikace DEX nebo VEH v CT 4 nebo CT 16, včetně explantátů u kterých aplikace vůbec neproběhla. Jednofaktorová ANOVA se Šidákovým vícečetným srovnávacím testem vybraných párů prokázala významné zvýšení hladiny *c-Fos* po 1h působení DEX při aplikaci v CT 16 (**** $p < 0,0001$). U dalších testovaných genů nebyl signifikantní rozdíl v hladině mRNA zaznamenán ($p > 0,05$). Data jsou vynesena jako hodnoty jednotlivých explantátů a jejich průměr ± SD.

Tab. 23 Statistická analýza relativní genové exprese *c-Fos*, *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5*, *Sgk1* po 1h a 3h od aplikace DEX nebo VEH v CT 4 nebo CT 16, včetně explantátů u kterých aplikace vůbec neproběhla.

Relativní genová exprese					
Jednofaktorová ANOVA, Šidákov vícečetný srovnávací test vybraných párů					
Porovnávaný pár	p hodnota				
	<i>c-Fos</i>	<i>Vip</i>	<i>Nr3c1</i>	<i>Fkbp5</i>	<i>Sgk1</i>
Bez aplikace vs. CT 4 VEH + 1h	0,3533	0,6702	0,9609	0,9992	>0,9999
Bez aplikace vs. CT 4 DEX + 1h	0,772	0,5871	>0,9999	0,9977	0,9994
Bez aplikace vs. CT 16 VEH + 1h	0,1529	0,865	0,7198	0,0791	0,9648
Bez aplikace vs. CT 16 DEX + 1h	****<0,0001	0,3308	0,9697	0,9922	0,9883
Bez aplikace vs. CT 16 DEX + 3h	0,7966	>0,9999	>0,9999	0,2619	>0,9999
Bez aplikace vs. CT 16 VEH + 3h	0,9099	>0,9999	0,9891	0,9995	>0,9999
CT 4 VEH + 1h vs. CT 4 DEX + 1h	0,9998	>0,9999	0,9948	0,1589	0,9992
CT 16 VEH + 1h vs. CT 16 DEX + 1h	**0,0012	0,9866	0,9993	0,81	>0,9999
CT 16 DEX + 3h vs. CT 16 VEH + 3h	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4469	>0,9999
CT 16 DEX + 1h vs. CT 16 DEX + 3h	**0,0025	0,4354	>0,9999	>0,9999	0,9848

6 Diskuze

6.1 Vliv DEX na parametry cirkadiálních hodin ve fetálních SCN

Citlivost SCN vůči mateřským GC byla prokázána ve fetálním i brzce postnatálním období (Astiz et al., 2020; Čečmanová et al., 2019; Olejníková et al., 2018). Nedávná studie zabývající se aplikací DEX *in vivo* a *in vitro* prokázala významný vliv GC jak při synchronizaci, tak při vývoji fetálních SCN (Čečmanová et al., 2019). Diplomová práce navazuje na tyto výsledky s cílem bližšího objasnění mechanismu působení GC ve fetálních SCN. V první části práce byl s využitím organotypických E17 SCN explantátů *mPer2^{Luc}* myši ověřen vliv aplikace DEX *in vitro* na parametry cirkadiálních hodin. V současné době používané explantáty jsou připravovány vylepšeným způsobem, a sice pomocí mechanického sekáčku, na rozdíl od dříve používaného způsobu mikrodisekce nůžkami ve studii Čečmanové (2019). Dalším rozdílem v metodickém přístupu oproti přechodí studii je zvýšení koncentrace DEX z 100nM na 1μM DEX, a to z důvodu potenciálního vlivu vyšší koncentrace DEX při působení na E17 SCN explantáty. Následně byl DEX testován také v koncentracích 10μM a 100μM. *In vitro* aplikace 1μM DEX k E17 SCN explantátům vedla v souladu s předchozími výsledky Čečmanové (2019) k signifikantně výraznějšímu zvýšení amplitudy než aplikace VEH. Zvýšení amplitudy prvního cyklu po aplikaci DEX bylo pozorováno při aplikaci na vzestupu i poklesu hladiny proteinu PER2. Zvýšená amplituda u explantátů s aplikovaným DEX přetrvávala po dobu dalších dvou cyklů. Zvýšení amplitudy bylo pozorováno také při aplikaci 10μM a 100μM. Vzhledem k tomu, že stejný vliv DEX byl pozorován již při použití 100nM koncentrace ve studii Čečmanové (2019), dochází pravděpodobně ve fetálních SCN k saturaci GR již při nižší koncentraci 100nM DEX a aplikace vyšších koncentrací vede u E17 SCN explantátů ke stejné odezvě.

U fetálních SCN dochází postupem času při kultivaci *in vitro* k přirozenému snižování amplitudy (Čečmanová et al., 2019). Tento proces (angl. damping) je pozorovatelný také v periferních tkáních (Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004). V dospělém SCN je rytmus velmi robustní a k postupnému snižování amplitudy dochází pomaleji. V případě, že v dospělém SCN byly zablokovány Na⁺ napět'ově závislé kanálky a mezi neurony nemohl být šířen akční potenciál, však zrychlilo postupné snižování amplitudy také v dospělých SCN. (Yamaguchi et al., 2003). Fetální SCN obsahují menší množství synapsí (R. Moore & Bernstein, 1989) a k postupnému snižování amplitudy *in vitro* tak pravděpodobně dochází v důsledku nedostatečného spojení mezi jednotlivými neurony. Zvýšení amplitudy na tkáňové úrovni pozorované po aplikaci DEX tak může odrážet skutečnost, že GC přispívají ve fetálních SCN k mezibuněčné komunikaci a zvyšují integritu vyvíjející se nervové tkáně.

Jednotlivé E17 SCN explantáty se ve své citlivosti vůči DEX liší. U některých explantátů došlo k většímu zvýšení amplitudy, než u explantátů jiných či ke zvýšení amplitudy vůbec nedošlo. Rozdílná citlivost jednotlivých explantátů se shoduje s dřívějšími výsledky Čečmanové (2019), kdy zvýšení amplitudy dosahovalo mezi jednotlivými explantáty rozdílných hodnot (Čečmanová et al., 2019). Příčina rozdílné citlivosti explantátů vůči GC není zcela jasná. Jedním z možných vysvětlení je mírná odlišnost ve fázi vývoje, ve které se SCN nachází při odběru z matky. Rozdílná fáze vývoje cirkadiálního rytmu v SCN jednotlivých fetů byla zaznamenána ve stádiu E14,5 kdy byl u některých explantátů zaznamenána rytmus v PER2-bioluminiscenci, zatímco u jiných ne (Carmona-Alcocer et al., 2018). Kromě vývoje cirkadiálních hodin SCN *in vivo* byl postupný vývoj rytmu pozorován také v *in vitro* podmínkách (Čečmanová et al., 2019; Wreschnig et al., 2014). Je tedy možné, že rozdíl citlivosti jednotlivých explantát je dána odlišným stádiem *in vitro* vývoje rytmu E17 SCN explantátů. Dalším z možných vysvětlení je způsob odběru explantátů, kdy dochází k mírným odlišnostem mezi jednotlivými řezy, a to například posunutí řezu kaudálním či rostrálním směrem. U dospělých SCN je dorzální část SCN funkčně odlišná od kaudální části (Yan et al., 2007), a je tedy možné, že funkční odlišnost mezi dorzální a kaudální částí SCN začíná již ve fetálním období.

Perioda zůstala po aplikaci DEX neovlivněna. V tom se získaná výsledky odlišují od prvotních výsledků Čečmanové (2019), kdy aplikace DEX vedla k prodloužení periody, zatímco aplikace VEH k prodloužení periody nevedla (Čečmanová et al., 2019). Tento rozdíl může mít příčinu například v jiném způsobu přípravy explantátů nebo ve výše diskutované rozdílné citlivosti jednotlivých explantátů.

Specifická působení DEX byla dále ověřena pomocí antagonisty GR, MIF. Aplikace MIF vedla k výraznému snížení vlivu DEX na amplitudu E17 SCN explantátů, čímž bylo potvrzeno specifické působení DEX přes GR. Na změnu periody neměla aplikace MIF žádný vliv.

Fázově responzí křivka Čečmanové (2019) poukázala na významný rozdíl působení DEX a VEH při aplikaci v CT 15-18. Aplikace VEH v tuto dobu vedla k fázovému zpoždění, zatímco aplikace DEX k fázovému předběhnutí. K fázovému předběhnutí nedošlo, pokud byly GR před aplikací DEX zablokovány pomocí MIF (Čečmanová et al., 2019). Za účelem ověření zvýšené citlivosti fetálních hodin vůči DEX při aplikaci v této části cirkadiálního cyklu byl u explantátů, u kterých proběhla aplikace v CT 15-18,5, změřen fázový posun. V souladu s předchozími výsledky Čečmanové (2019) při aplikaci DEX došlo k předběhnutí fáze a u explantátů s aplikovaným VEH, nebo MIF + DEX k fázovému zpoždění. U některých

explantátů k posunu fáze téměř nedošlo, což může být dáno výše diskutovanou rozdílnou citlivostí vůči GC mezi jednotlivými explantáty.

6.2 Mechanismy působení GC ve fetálních SCN

Vzhledem k pozorovanému fázovému předběhnutí v CT 15-18 při aplikaci DEX *in vitro*, byl v druhé části studie Čechmanové (2019) v ZT 15 DEX aplikován *in vivo* březím samicím. V SCN fetů, jejichž matkám byl injekčně aplikován DEX, byla zaznamenána snížená hladina *c-Fos* oproti SCN fetů, jejichž matkám byl injekčně aplikován VEH. Překvapivě, v žádném z časových bodů od 1h do 8 h po injekční aplikaci DEX nebo VEH nebyla ve fetálních SCN zaznamenána regulace genové exprese *Per1*, *Per2*, ani žádného jiného z testovaných genů (Čechmanová et al., 2019). Druhá část diplomové práce se proto věnuje potenciálním mechanismům působení GC vedoucí ve fetálních SCN k regulaci transkripce *c-Fos* a fázovému předběhnutí hodin jiným způsobem, než indukci transkripce hodinových genů *Per1* a *Per2*.

Prvním z přístupů byla analýza degradace proteinu PER2, kdy byla s využitím inhibice *de novo* transkripce CHX měřena rychlost degradace proteinu PER2 při aplikaci DEX. Vliv DEX na dynamiku degradace PER2 byl zaznamenán v choroidním plexu (Liška et al., 2021). Ve fetálních SCN však nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v dynamice degradace PER2 při aplikaci DEX oproti VEH. Stejně tak nebyl zaznamenán vliv DEX na rychlost akumulace proteinu PER2 po odmytí CHX. Výsledek prokázal, že DEX nemá vliv na dráhy související s degradací PER2 proteinu.

Jako další z možných mechanismů působení GC ve fetálních SCM byla navržena interference DEX se signálními drahami vedoucími k fosforylaci CREB a regulaci genové exprese *c-Fos*. V dospělých SCN jsou do regulace *c-Fos* mimo jiné zapojeny kinázy PKA a PKC (Jakubcakova et al., 2007; Tischkau et al., 2003). Interference DEX a PKA signalizační dráhy navíc byla zaznamenána také u periferních hodin v choroidním plexu (Liška et al., 2021). Inhibice signálních drah PKA a PKC však v E17 SCN nevedla ke snížení vlivu DEX na zvýšení amplitudy. Je však možné, že do regulace *c-Fos* jsou ve fetálních SCN zapojeny jiné signální dráhy. V dospělých SCN CREB fosforylují dále například PKG a CaMK. (Ding et al., 1998; Tischkau et al., 2003). Zkoumání těchto dalších mechanismů bude předmětem pokračujících studií.

6.3 RT q-PCR z E17 SCN explantátů

Vzhledem k negativním výsledkům při testování potenciálních mechanismů působení GC se třetí část diplomové práce věnuje detekci vlivu DEX v E17 SCN explantátech na úrovni transkriptů pomocí metody RT-qPCR. Izolace RNA z SCN explantátů nepatří mezi běžně využívané metody a vyžadovala proto optimalizaci na několika úrovních. Za účelem minimalizace zkreslení výsledků byla vyvinuta snaha, aby explantáty obsahovaly co nejméně tkáně v okolí SCN. Minimalizace okolní tkáně je však stížena skutečností, že ve stádiu E17 nelze SCN pozorovat pod světelným mikroskopem jako samostatně odlišitelnou strukturu. Z několika způsobů, včetně ořezávání explantátů před homogenizací přímo na inzertu, byl nakonec zvolen bližší ořez explantátů již při jejich přípravě. S využitím luminiscenčního mikroskopu LV200 pro kontrolu řezu explantátů, byl následně pro použití v RT-qPCR poupraven směr řezu tak, aby explantáty obsahovaly co nejmenší množství okolní tkáně, a to především ve směru 3. mozkové komory. E17 SCN explantáty mají velmi jemnou strukturu a po několika dnech v kultivaci dochází k přisátí explantátu k inzertu. Bylo tedy nutné najít vhodný způsob sejmutí explantátu z inzertu tak, aby nedošlo k poškození a ztrátě buněk na inzertu. Vzhledem k charakteristice pokusů bylo dále nezbytné ověřit možné metody skladování explantátu od jeho sejmutí z inzertu po dokončení procesu izolace RNA, přičemž se jako nejvhodnější způsob ukázalo mražení homogenizovaného explantátu v RLT lyzačním puftru s přidaným BME v -80 °C.

RNA vyzolovaná v pilotním pokuse z E17 SCN explantátů po dvou dnech až po 1 měsíci kultivace dosahovala při měření na spektrofotometru NanoDrop potřebné koncentrace a čistoty pro použití v RT a RT-qPCR. V pokusech s DEX byly následně používány čerstvé explantáty s pouze dvoudenní dobou kultivace. P10-12 SCN explantáty byly dříve použity pro přípravu vzorků na scRNAseq a lze tedy předpokládat, že RNA v SCN explantátech vykazuje dostatečně vysokou integritu i po několika dnech kultivace (Morris et al., 2021). Čerstvé explantáty zároveň co nejvěrněji odráží situaci *in vivo*, protože nejsou dlouhodobě ovlivňovány podmínkami kultivace.

Jako referenční geny byly navrženy *Hprt*, *Pgk1*, *Ywahz* a *B2m*. *B2m* byl použit jako jeden z referenčních genů také při *in vivo* pokusech na fetálních SCN (Čečmanová et al., 2019; Lužná et al., 2021) Stablní míra dalšího z navržených referenčních genů, *Hprt1* napříč jednotlivými vzorky byla ve fetálním mozku ověřena například v hipokampu (Jiang et al., 2020). Stejně tak *Pgk1* byla ověřena jako vhodný referenční gen při studiu fetální nervové tkáně (Boda et al., 2009). *Ywahz* byl společně s *Hprt* a *Pgk1* vyhodnocen ve fetálním mozku jako stabilně

exprimovaný napříč experimentálními podmínkami (Kovalenko et al., 2024). Všechny jmenované geny jsou také standardně využívány jako referenční geny při studiu genové exprese v dospělém SCN (Barca-Mayo et al., 2017; Harbour et al., 2014; Park et al., 2016). Na základě stability míry exprese navržených referenčních genů u jednotlivých E17 SCN explantátů byly jako nejvhodnější trojice referenčních genů vyhodnoceny *Hprt*, *Pgk1* a *Ywahz*.

6.3.1 Exprese hodinových genů

Metodou RT-qPCR byla u E17 SCN explantátů porovnána relativní exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Nr1d1* a *Bmall* ve dvou bodech cirkadiálního cyklu, a to v CT 5 a CT 17. V dospělých SCN je fáze rytmu hladiny PER2 přibližně o čtyři hodiny zpožděna fází rytmu mRNA *Per2*. V mozkových oblastech mimo SCN se však tento rozdíl fází různí. Například v amygdale je rozdíl fáze mRNA *Per2* a proteinu PER2 pouhé dvě hodiny, zatímco v dentálním gyru je tento rozdíl okolo šesti hodin (Harbour et al., 2014). Není tedy zcela zřejmé, jak velký posun fáze je v nedovyvinutých, fetálních SCN a v jaké fázi rytmu mRNA *Per2* se explantáty nacházejí vůči fázi proteinu PER2, pozorovatelnému na úrovni PER2-bioluminiscence.

U hodinových genů *Per1* a *Per2* nebyl mezi explantáty v CT 5 a CT 17 rozdíl v hladině mRNA detekován. Je však možné, že vzhledem k neznámému fázovému posunu mezi fází mRNA *Per2* a fází proteinu PER2, dosahovala hladina mRNA *Per2* v obou bodech cirkadiálního cyklu podobné úrovně. Další z možných vysvětlení může být výrazně slabší amplituda mRNA *Per2* oproti amplitudě proteinu PER2. U E15 SCN explantátů byl dokonce zaznamenán rytmus PER2-bioluminiscence, přestože hladina mRNA *Per2* byla v tuto fázi vývoje arytmičná (Carmona-Alcocer et al., 2018; Landgraf et al., 2014; Shimomura et al., 2001). Snížená amplitudu mRNA *Per2* v porovnání s amplitudou PER2 proteinu byla dále pozorována také například v periferních hodinách v amygdale (Harbour et al., 2014).

Rozdíl v hladině mRNA u E17 SCN explantátů v CT 5 a CT 17 byl naproti tomu zaznamenán u *Nr1d1*, kdy byla v CT 5 zaznamenána signifikantně zvýšená relativní exprese oproti CT 17. *Nr1d1* je *in vivo* ve fetálních SCN vývojově první z hodinových genů, v jehož expresi se objevuje cirkadiální rytmus (Houdek & Sumová, 2014). Je tedy možné, že i v *in vitro* podmínkách se jedná o silně rytmický gen s výraznou amplitudou. Rytmus *Bmall* je v *in vivo* podmínkách ve fetálních SCN v protifázi rytmu *Nr1d1*. Oproti *Nr1d1* má však *Bmall* ve fetálních SCN slabší amplitudu rytmu mRNA (Houdek & Sumová, 2014), což může být jeden z důvodů nesignifikantního rozdílů v hladině mRNA *Bmall* mezi CT 5 a CT 17.

Získaná data, a to převážně rozdíl v expresi *Nr1dl* mezi CT 5 a CT 17 prokazují přítomnost cirkadiánního rytmu na úrovni mRNA v E17 SCN v *in vitro* podmínkách. Pro přesnější stanovení posunu fáze mRNA *Per2* a PER2 a detekci rytmu dalších hodinových genů by však bylo nezbytné vytvořit 24 hodinový profil jednotlivých genů. Vzhledem k postupnému vývoji rytmu ve fetálních SCN také v *in vitro* podmínkách (Čečmanová et al., 2019; Wreschnig et al., 2014), by bylo dále vhodné sledovat cirkadiánní profil hodinových genů s ohledem na délku kultivace explantátů.

6.3.2 Vliv aplikace DEX na úrovni transkriptů

Expres *Nr3c1* byla ve fetálních SCN detekována *in vivo* (Čečmanová et al., 2019; Greiner et al., 2022). Nově zavedenou metodou RT-qPCR byla ověřena exprese *Nr3c1* také v *in vitro* podmínkách organotypických explantátů. Stabilní mírou exprese *Nr3c1* mezi jednotlivými explantáty bylo potvrzeno, že DEX může *in vitro* v E17 SCN explantátech specificky působit skrze svou vazbu na GR. Za účelem detekce vlivu GC na úrovni transkriptů *in vitro* byl poté DEX aplikován k E17 SCN explantátům v CT 4 a CT 16. Dále byla přidána kontrolní skupina explantátů, u kterých neproběhla žádná aplikace a nebylo s nimi jakkoliv manipulováno. Po 1h působení byla vedle *Nr3c1* porovnána genová exprese *c-Fos*, *Vip*, *Fkbp5*, *Sgkl* a *Gilz*. *c-Fos* je obecně používán jako molekulární marker zvýšené aktivity neuronů a regulace jeho transkripce byla ve fetálních SCN zaznamenána při aplikaci DEX *in vivo* (Čečmanová et al., 2019; Dragunow & Faull, 1989). *Fkbp5*, *Sgkl* a *Gilz* byly zvoleny jako biomarkery působení GC, jelikož k regulaci jejich exprese GC dochází v mnoha typech buněk a tkání (shrnutí v Ayroldi & Riccardi, 2009; Binder, 2009; Lang & Cohen, 2001; Vermeer et al., 2003). *Gilz* však nebyl v E17 SCN explantátech vůbec detekován, stejně jako nebyl detekován ve fetálních SCN *in vivo* (nepublikovaná data). Jedná se o poměrně překvapivé výsledky, jelikož *Gilz* je ubikvině exprimován v mnoha mozkových oblastech jak v prenatalním, tak postnatálním období (Tescic et al., 2015; Yachi et al., 2007).

Při aplikaci DEX v CT 4 nebyl po 1h působení zaznamenán rozdíl v hladině žádného z testovaných genů oproti aplikaci VEH. Při aplikaci DEX v CT 16 byla naměřena zvýšená hladina *c-Fos* oproti VEH. Porovnání se skupinou nemanipulovaných explantátů poukázalo na fakt, že i pouhou nespecifickou manipulací při aplikaci DEX dochází k aktivaci neuronů a mírnému zvýšení hladiny *c-Fos*.

DEX nebo VEH byl poté znovu aplikován v CT 16 a genová exprese měřena po 3h od aplikace. Po 3h působení byla u explantátů hladina *c-Fos* výrazně snížena oproti hladině naměřené po 1h DEX. V tuto dobu již také nebyl u *c-Fos* zaznamenán rozdíl mezi aplikací DEX

a VEH. DEX tak pravděpodobně aktivuje neurony fetálního SCN pouze v krátkém časovém horizontu. Rychlá aktivace neuronů v řádu několika minut po aplikaci GC byla navíc pozorována v mnoha dalších mozkových regionech (shrnutí v Jaszczuk & Jaszczak, 2021). Snížení účinku DEX s přibývajícím dobou působení byl pozorován také *in vivo* (Čečmanová et al., 2019). U žádného z dalších genů tedy *Nr3c1*, *Fkbp5* a *Sgk1* nebyl ani po 3h o aplikaci DEX nebo VEH zaznamenán v hladině mRNA rozdíl. Podobná hladina mRNA *Fkbp5* a *Sgk1* napříč experimentálními podmínkami však může sloužit jako pozitivní kontrola, že naměřený rozdíl v hladině *c-Fos* odráží skutečnost a nejedná se o zkreslení způsobené například rozdílnou velikostí explantátu nebo rozdílným počtem buněk SCN v rámci explantátu.

Po 3h od aplikace DEX nebo VEH byla dále měřena exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *E4bp4*. V periferních tkáních dochází po přibližně 3h od aplikace DEX ke zvýšené transkripci *Per1* a *Per2*, což vede v dané tkáni k fázovému posunutí hodin. Kromě toho je v tomto časovém horizontu působení DEX pozorována také zvýšená transkripce *E4bp4* (Balsalobre et al., 2000; Ota et al., 2020; T. E. Reddy et al., 2012; So et al., 2009). V E17 SCN explantátech však nebyla zvýšená exprese *Per1*, *Per2* a *E4bp4* po 3h působení DEX zaznamenána.

Získané výsledky se částečně shodují s výsledky studií *in vivo*. Stejně jako ve studii Čečmanové (2019), měla aplikace DEX vliv na aktivitu neuronů fetálních SCN. Na rozdíl od *in vivo* pokusu však vedla v *in vitro* podmínkách aplikace DEX ke zvýšené aktivitě neuronů pozorované zvýšenou hladinou *c-Fos*. V *in vivo* podmínkách naproti tomu aplikace DEX vedla k inhibici neuronů fetálních SCN a snížené hladině *c-Fos*. Použité přístupy se však v mnoha ohledech liší a nelze je zcela srovnávat. *In vivo* fetální hodiny jsou neustále ovlivňovány působením dalších mateřských faktorů a hormonů (Greiner et al., 2022; Lužná et al., 2021), což může být důvod rozdílu v působení GC *in vivo* a *in vitro*. Působení GC je navíc velmi tkáňově specifické a závisí na mnoha faktorech jako je přítomnosti dalších TF, epigenetické modifikace a energetický stav buňky (Goldberg et al., 2022; Oster et al., 2006; Polman et al., 2012; Quagliarini et al., 2019). Přes předpoklady, že začátek subjektivní noci odpovídá maximu PER2-bioluminiscence a že se fetální SCN se nacházejí ve stejné fázi jako SCN mateřské (Lužná et al., 2021; Reppert & Schwartz, 1983; Shearman et al., 1997; Sládek et al., 2004), si dále nemůžeme být zcela jisti, v jaké fázi cirkadiálního rytmu se fetální SCN v *in vivo* pokuse při expozici DEX nacházely.

Na druhé straně se získaná data shodují s výsledky Čečmanové (2019) v tom, že po aplikaci DEX nebyla ve fetálních SCN zaznamenána zvýšená hladina žádného z dalších testovaných genů, konkrétně *Vip*, *Nr3c1*, *Sgk1*, *Per1* a *Per2* (Čečmanová et al., 2019). Kromě

toho nebyl *in vitro* zaznamenán žádný rozdíl v hladině *Fkbp5*. Regulace transkripce *Fkbp5* byla pozorována v jiné *in vivo* studii, kdy při aplikaci DEX v ZT 0, tedy mimo fázi maxima mateřských GC, došlo ke zvýšené expresi *Fkbp5* a *Sgk1*, zatímco při aplikaci v ZT 12 ne. Autoři této studie předpokládají, že pozorovaný rozdíl je důsledek zvýšené hladiny GR ve fetálním hypotalamu v čase okolo ZT 1 v porovnání s nižší hladinou GR v ZT 13 (Astiz et al., 2020). Stejný cirkadiánní profil GR *in vivo* byl zaznamenán také Čečmanovou (2019) (Čečmanová et al., 2019). Za předpokladu, že ve fetálních SCN *in vivo* čas (ZT) odpovídá *in vitro* času CT, lze předpokládat, že v CT 5 a CT 17 bude hladina *Nr3c1* zhruba na stejné úrovni, což odpovídá výsledkům *in vitro*. Další z možných vysvětlení stejné hladiny *Nr3c1* v CT 5 a CT 17 může být fakt, že cirkadiánní rytmus GR ve fetálních SCN je regulován mateřskými GC (Čečmanová et al., 2019; Lužná et al., 2021) a lze tedy očekávat, že v *in vitro* podmínkách bude exprese GR arytmiická. Vliv mateřských GC na cirkadiánní expresi GR ve fetálním SCN však rozporuje jiná *in vivo* studie (Astiz et al., 2020).

Nově zavedenou metodou RT-qPCR z 17 SCN explantátů byla potvrzena cirkadiánní závislost působení GC ve fetálních SCN s rozdílnou citlivostí hodin při aplikaci v CT 4 a CT 16. Otázkou však nadále zůstává, čím je vyvoláno fázové předběhnutí rytmu při aplikaci DEX v CT 15-18, když nedochází ke zvýšené transkripci *Per1* a *Per2* vedoucí v dospělých SCN k posunu fáze hodin (Tischkau et al., 2003; Travnickova-Bendova et al., 2002). Další otázkou je, jak přesně GC ovlivňují vývoj fetálních SCN a *in vitro* zvyšují amplitudu téměř nezávisle na CT aplikaci.

6.4 Limity práce a možnosti dalšího výzkumu

V porovnání s *in vivo* modelem umožňuje *in vitro* model fetálních SCN sledovat působení pouze jedné látky bez současného působení dalších mateřských signálů, jejichž vliv v *in vivo* modelu nelze účinně odstínit. V *in vitro* podmínkách jsou na druhou stranu fetální SCN ovlivňovány podmínkami kultivace (Sumová & Čečmanová, 2020). E17 SCN explantáty jsou dále velmi citlivé na nesespecifické manipulace. Při nahrávání PER2-bioluminiscence samotná aplikace VEH vyvolala mírné zvýšení amplitudy u přibližně poloviny explantátů a při aplikaci v CT 15-18,5 vyvolala aplikace VEH u některých explantátů výrazné fázové zpoždění. Velký vliv nesespecifické manipulace byl pozorován také u SCN v časném postnatálním věku (Nishide et al., 2008). U dospělých SCN aplikace VEH zvýšení amplitudy a fázový posun nevyvolává (Hamnett et al., 2019; Sládek & Sumová, 2019). Citlivost fetálních SCN vůči nesespecifické manipulaci byla dále potvrzena metodou RT-qPCR, kdy aplikace VEH vedla k mírné aktivaci neuronů a zvýšené hladině *c-Fos*. Důvody citlivosti E17 SCN vůči nesespecifické manipulaci

nejsou zcela známy. Může se jednat o změnu teploty při vyndání explantátů z LumiCyclu nebo vyjmutí explantátů z média a promíchání média s vehikulem. Dospělá SCN na teplotní rozdíly nereagují, avšak v brzce postnatálním věku vedla změna teploty v SCN k výraznému posunu fáze hodin (Herzog & Huckfeldt, 2003; Isojima et al., 2009).

Druhým limitem je rozdílnost jednotlivých E17 SCN explantátů pozorovatelná na úrovni rozdílné sensibility při aplikaci DEX nebo VEH a odlehlých hodnotách při metodě RT-qPCR. Přestože byly vyvinuty veškeré snahy o minimalizaci okolní tkáně, uniformitu při přípravě explantátů a stejnou míru manipulace se všemi explantáty, dosahují naměřené hodnoty vzhledem k povaze použitého modelu poměrně velkých rozptylů.

Za účelem minimalizace vlivu nescifické manipulace by bylo dále vhodné optimalizovat zavedený protokol aplikace testovaných látek a VEH tak, aby byla dále snížena nescifická manipulace. Jedním z možných řešení by byla například aplikace roztoku testované látky přímo na explantát, bez nutnosti vyjmutí inzertu z média. Poté by mohl výzkum pokračovat směrem aplikace DEX v dalších fázích cyklu s cílem detekce mechanismu regulace GR ve fetálních SCN a ověření specifického působení GC na hladinu *c-Fos* pomocí blokace GR při aplikaci MIF.

Nově zavedené metodické postupy budou dále použity pro přípravu vzorků E17 SCN explantátů do transkriptomické studie s cílem detekce působení GC na úrovni celého genomu. Za účelem porozumění signálních drah vedoucích k regulaci *c-Fos* by mohl být použit Western blot pro CREB/pCREB. Kromě již zmíněné transkriptomické studie zaměřující se na vliv DEX ve fetálních SCN by mohly být nově zavedené metodické postupy použity pro ověřování nových hypotéz před náročnějšími *in vivo* pokusy. V neposlední řadě by pomocí RT-qPCR mohly být detekovány změny, ke kterým v explantátech dochází během jejich kultivace.

Přes všechny své limity a nevyjasněné otázky poskytují získané výsledky zcela unikátní porovnání působení GC na fetální SCN při aplikaci *in vitro* a *in vivo*. Nadměrná expozice GC *in utero* v závislosti na cirkadiánním čase expozice může vést v pozdějších obdobích života k závažným psychickým poruchám (Astiz et al., 2020; Murray et al., 2022). Bližší porozumění mechanismu působení GC je tak v dnešní době, kdy jsou těhotné ženy vystavovány velkému stresu, velmi důležité.

7 Souhrn

S využitím organotypických SCN explantátů z myšího modelu připravených z E17 byl potvrzen vliv GC na vývoj a synchronizaci fetálních SCN při aplikaci *in vitro*. Aplikace 1 μ M, 10 μ M a 10 μ M DEX vedla k výraznému zvýšení amplitudy tří cyklů po aplikaci, což poukazuje na pozitivní vliv GC při vývoji SCN. Vliv GC na synchronizaci fetálních SCN byl potvrzen aplikací v CT 15-18, kdy aplikace DEX podle očekávání vedla k fázovému předběhnutí, zatímco aplikace VEH k fázovému zpoždění. Specificita působení GC přes GR byla ověřena antagonistou GR, MIF.

Pro detekci vlivu GC při působení *in vitro* byla nově zavedena metoda izolace RNA z E17 explantátů následovaná RT-qPCR. Při aplikaci v CT 16 byla po 1h od aplikace DEX detekována zvýšená hladina *c-Fos* v porovnání s kontrolní skupinou VEH, zatímco při aplikaci DEX v CT 4 nebyl tento rozdíl zaznamenán. Po 3h od aplikace DEX v CT 16 již nebyla zvýšená hladina *c-Fos* detekována. DEX tak při *in vitro* aplikaci v CT 16 vede k rychlé aktivaci neuronů a postupem času působení tento vliv odeznívá. Inhibice signálních drah PKA a PKC, regulující skrze fosforylaci CREB transkripci *c-Fos*, neměla na působení DEX v E17 SCN žádný vliv, avšak není vyloučena interference GR s jinými signálními drahami.

Signifikantní rozdíl v hladině mRNA dalších z testovaných genů, a to *Vip*, *Nr3c1*, *Fkbp5* a *Sgkl*, nebyl zaznamenán po 1h ani 3h od aplikace DEX v CT 4 ani CT 16. V souladu s výsledky *in vivo* studie Čechmanové (2019) nevedla aplikace DEX k regulaci transkripce *Per1* ani *Per2* a fázový posun po aplikaci GC je tak fetálních SCN vyvoláván jiným mechanismem než v periferních tkáních. Potenciální vliv DEX na dynamiku degradace hodinového proteinu PER2, zaznamenaný v choroidním plexu, nebyl potvrzen a přesný mechanismus působení GC při synchronizaci fetálních SCN tak zůstává neznámý. Nově zavedená metoda izolace RNA z E17 SCN explantátů však může dále přispět k porozumění tohoto procesu a bližšímu objasnění působení GC na SCN.

Získané výsledky potvrdily pozitivní vliv GC při vývoji a synchronizaci fetálních SCN s rozdílnou citlivostí SCN v závislosti na čase aplikace. Nadměrná expozice GC *in utero* v závislosti na cirkadiálním čase může vést v pozdějších obdobích života k závažným duševním onemocněním a bližší porozumění mechanismu působení GC je tak velmi důležité.

8 Seznam použité literatury

- Altman, J., & Bayer, S. A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *182*(5), 973–993. <https://doi.org/10.1002/cne.901820512>
- Arlt, W., & Stewart, P. M. (2005). Adrenal Corticosteroid Biosynthesis, Metabolism, and Action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *34*(2), 293–313. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.01.002>
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., & Evans, R. M. (1987). Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. *Science*, *237*(4812), 268–275. <https://doi.org/10.1126/science.3037703>
- Astiz, M., Heyde, I., Fortmann, M. I., Bossung, V., Roll, C., Stein, A., Grüttner, B., Göpel, W., Härtel, C., Obleser, J., & Oster, H. (2020). The circadian phase of antenatal glucocorticoid treatment affects the risk of behavioral disorders. *Nature Communications*, *11*(1), 3593. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17429-5>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Hahner, 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>
- Ayrolidi, E., & Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): A new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal*, *23*(11), 3649–3658. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134684>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, *289*(5488), 2344–2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Bamberger, C. M., Schulte, H. M., & Chrousos, G. P. (1996). Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, *17*(3), 245–261. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-3-245>
- Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., & De Pietri Tonelli, D. (2017). Astrocyte deletion of Bmal1 alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nature Communications*, *8*(1), 14336. <https://doi.org/10.1038/ncomms14336>
- Bendová, Z., Sumová, A., & Illnerová, H. (2004). Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, *148*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.10.007>
- Bhatarai, J. P., Roa, J., Herbison, A. E., & Han, S. K. (2014). Serotonin Acts Through 5-HT1 and 5-HT2 Receptors to Exert Biphasic Actions on GnRH Neuron Excitability in the Mouse. *Endocrinology*, *155*(2), 513–524. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1692>
- Biddie, S. C., John, S., Sabo, P. J., Thurman, R. E., Johnson, T. A., Schiltz, R. L., Miranda, T. B., Sung, M.-H., Trump, S., Lightman, S. L., Vinson, C., Stamatoyannopoulos, J. A., & Hager, G. L. (2011). Transcription Factor AP1 Potentiates Chromatin Accessibility and Glucocorticoid Receptor Binding. *Molecular Cell*, *43*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.016>
- Binder, E. B. (2009). The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, *34*, S186–S195. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.021>

- Bledsoe, R. K., Montana, V. G., Stanley, T. B., Delves, C. J., Apolito, C. J., McKee, D. D., Consler, T. G., Parks, D. J., Stewart, E. L., Willson, T. M., Lambert, M. H., Moore, J. T., Pearce, K. H., & Xu, H. E. (2002). Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. *Cell*, *110*(1), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00817-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00817-6)
- Boda, E., Pini, A., Hoxha, E., Parolisi, R., & Tempia, F. (2009). Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Studies in Mouse Brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, *37*(3), 238–253. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9128-9>
- Burton, P. J., & Waddell, B. J. (1999). Dual Function of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action1. *Biology of Reproduction*, *60*(2), 234–240. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.234>
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., & Pagano, M. (2007). SCF^{Fbxl3} Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, *316*(5826), 900–904. <https://doi.org/10.1126/science.1141194>
- Carmona-Alcocer, V., Abel, J. H., Sun, T. C., Petzold, L. R., Doyle, F. J., Simms, C. L., & Herzog, E. D. (2018). Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, *38*(6), 1326–1334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-17.2017>
- Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, *63*(4), R93–R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>
- 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>
- D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., & Riccardi, C. (1997). A New Dexamethasone-Induced Gene of the Leucine Zipper Family Protects T Lymphocytes from TCR/CD3-Activated Cell Death. *Immunity*, *7*(6), 803–812. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80398-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80398-2)
- Diederich, S., Eigendorff, E., Burkhardt, P., Quinkler, M., Bumke-Vogt, C., Rochel, M., Seidelmann, D., Esperling, P., Oelkers, W., & Bähr, V. (2002). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2: An Important Pharmacokinetic Determinant for the Activity of Synthetic Mineralo- and Glucocorticoids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(12), 5695–5701. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020970>
- Ding, J. M., Buchanan, G. F., Tischkau, S. A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L. E., Alster, J. M., McPherson, P. S., Campbell, K. P., & Gillette, M. U. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, *394*(6691), 381–384. <https://doi.org/10.1038/28639>
- Doi, M., Shimatani, H., Atobe, Y., Murai, I., Hayashi, H., Takahashi, Y., Fustin, J.-M., Yamaguchi, Y., Kiyonari, H., Koike, N., Yagita, K., Lee, C., Abe, M., Sakimura, K., & Okamura, H. (2019). Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nature Communications*, *10*(1), 2563. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10532-2>
- Dragunow, M., & Faull, R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods*, *29*(3), 261–265. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(89\)90150-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(89)90150-7)

- Elberling, F., Spulber, S., Bose, R., Keung, H. Y., Ahola, V., Zheng, Z., & Ceccatelli, S. (2023). Sex Differences in Long-term Outcome of Prenatal Exposure to Excess Glucocorticoids—Implications for Development of Psychiatric Disorders. *Molecular Neurobiology*, *60*(12), 7346–7361. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03522-5>
- El-Hennamy, R., Matějů, K., Bendová, Z., Sosniyenko, S., & Sumová, A. (2008). Maternal Control of the Fetal and Neonatal Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, *23*(5), 435–444. <https://doi.org/10.1177/0748730408322635>
- Gallo-Payet, N., Martinez, A., & Lacroix, A. (2017). Editorial: ACTH Action in the Adrenal Cortex: From Molecular Biology to Pathophysiology. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 101. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00101>
- Gates, B. J., & DeLuca, M. (1975). The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *169*(2), 616–621. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90205-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90205-2)
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, *280*(5369), 1564–1569. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>
- Goldberg, D., Charni-Natan, M., Buchshtab, N., Bar-Shimon, M., & Goldstein, I. (2022). Hormone-controlled cooperative binding of transcription factors drives synergistic induction of fasting-regulated genes. *Nucleic Acids Research*, *50*(10), 5528–5544. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac358>
- 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>
- Gu, C., Tang, M., & Yang, H. (2016). The synchronization of neuronal oscillators determined by the directed network structure of the suprachiasmatic nucleus under different photoperiods. *Scientific Reports*, *6*(1), 28878. <https://doi.org/10.1038/srep28878>
- 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>
- Guillemin, R., Dear, W. E., & Liebelt, R. A. (1959). Nychthemeral Variations in Plasma Free Corticosteroid Levels of the Rat. *Experimental Biology and Medicine*, *101*(2), 394–395. <https://doi.org/10.3181/00379727-101-24955>
- Hamnett, R., Crosby, P., Chesham, J. E., & Hastings, M. H. (2019). Vasoactive intestinal peptide controls the suprachiasmatic circadian clock network via ERK1/2 and DUSP4 signalling. *Nature Communications*, *10*(1), 542. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08427-3>
- Han, J., Lin, W., & Chen, Y. (2005). Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: Involvement of protein kinase A1. *Acta Pharmacologica Sinica*, *26*(2), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00539.x>
- Han, J.-Z., Lin, W., Lou, S.-J., Qiu, J., & Chen, Y.-Z. (2002). A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1591*(1–3), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00242-2)
- Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., & Fukada, Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 Is Degraded upon Synergistic Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31714–31721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506225200>

- Harbour, V. L., Weigl, Y., Robinson, B., & Amir, S. (2014). 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*, *9*(7), e103309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103309>
- Hench, P. S., & Kendall, E. C. (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Staff Meetings. Mayo Clinic*, *24*(8), 181–197. <https://doi.org/10.1136/ard.8.2.97>
- Herzog, E. D., & Huckfeldt, R. M. (2003). Circadian Entrainment to Temperature, But Not Light, in the Isolated Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Neurophysiology*, *90*(2), 763–770. <https://doi.org/10.1152/jn.00129.2003>
- Houdek, P., Polidarová, L., Nováková, M., Matějů, K., Kubík, Š., & Sumová, A. (2015). Melatonin administered during the fetal stage affects circadian clock in the suprachiasmatic nucleus but not in the liver. *Developmental Neurobiology*, *75*(2), 131–144. <https://doi.org/10.1002/dneu.22213>
- Houdek, P., & Sumová, A. (2014). In Vivo Initiation of Clock Gene Expression Rhythmicity in Fetal Rat Suprachiasmatic Nuclei. *PLoS ONE*, *9*(9), e107360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107360>
- Cheon, S., Park, N., Cho, S., & Kim, K. (2013). Glucocorticoid-mediated Period2 induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Research*, *41*(12), 6161–6174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt307>
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., & Ishida, N. (2005). A Role for Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Mammalian Circadian Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(33), 29397–29402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503526200>
- Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic „island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(11), 5962–5966. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5962>
- Inouye, S.-I. T. (1996). Chapter 6 Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. In *Progress in Brain Research* (Roč. 111, s. 75–90). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60401-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60401-X)
- Irwin, R. P., & Allen, C. N. (2007). Calcium Response to Retinohypothalamic Tract Synaptic Transmission in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*(43), 11748–11757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1840-07.2007>
- Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R. G., Masumoto, K., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S.-H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., ... Ueda, H. R. (2009). CKI ϵ/δ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(37), 15744–15749. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908733106>
- Jakubcakova, V., Oster, H., Tamanini, F., Cadenas, C., Leitges, M., Van Der Horst, G. T. J., & Eichele, G. (2007). Light Entrainment of the Mammalian Circadian Clock by a PRKCA-Dependent Posttranslational Mechanism. *Neuron*, *54*(5), 831–843. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.031>
- Jaszczyk, A., & Juszczak, G. R. (2021). Glucocorticoids, metabolism and brain activity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *126*, 113–145. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.007>
- Johnson, T. A., Paakinaho, V., Kim, S., Hager, G. L., & Presman, D. M. (2021). Genome-wide binding potential and regulatory activity of the glucocorticoid receptor's monomeric and dimeric forms. *Nature Communications*, *12*(1), 1987. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22234-9>

- Jones, J. R., Chaturvedi, S., Granados-Fuentes, D., & Herzog, E. D. (2021). Circadian neurons in the paraventricular nucleus entrain and sustain daily rhythms in glucocorticoids. *Nature Communications*, *12*(1), 5763. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25959-9>
- Kabrita, C. S., & Davis, F. C. (2008). Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: Determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus. *Brain Research*, *1195*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.020>
- Kalsbeek, A., Verhagen, L. A. W., Schaliij, I., Foppen, E., Saboureau, M., Bothorel, B., Buijs, R. M., & Pévet, P. (2008). Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *European Journal of Neuroscience*, *27*(4), 818–827. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06057.x>
- Khizhkin, E. A., Ilyukha, V. A., Vinogradova, I. A., Antonova, E. P., & Morozov, A. V. (2018). Circadian Rhythms of Antioxidant Enzyme's Activity in Young and Adult Rats under Light Deprivation Conditions. *Advances in Gerontology*, *8*(4), 328–338. <https://doi.org/10.1134/S2079057018040069>
- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R., & Agard, D. A. (2014). Glucocorticoid Receptor Function Regulated by Coordinated Action of the Hsp90 and Hsp70 Chaperone Cycles. *Cell*, *157*(7), 1685–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.038>
- Korf, H.-W., & Von Gall, C. (2013). Circadian Physiology. In D. W. Pfaff (Ed.), *Neuroscience in the 21st Century*, 1813–1845. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_65
- Kornhauser, J. M., Nelson, D. E., Mayo, K. E., & Takahashi, J. S. (1990). Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, *5*(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90303-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90303-W)
- 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>
- Kovalenko, A. A., Schwarz, A. P., Shcherbitskaia, A. D., Mikhel, A. V., Vasilev, D. S., & Arutjunyan, A. V. (2024). Reference Gene Validation in the Embryonic and Postnatal Brain in the Rat Hyperhomocysteinemia Model. *Neurotoxicity Research*, *42*(2), 19. <https://doi.org/10.1007/s12640-024-00698-z>
- 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>
- Landgraf, D., Koch, C. E., & Oster, H. (2014). Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00143>
- Lang, F., & Cohen, P. (2001). Regulation and Physiological Roles of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase Isoforms. *Science's STKE*, *2001*(108). <https://doi.org/10.1126/stke.2001.108.re17>
- Larsen, P. J., Vrang, N., Møller, M., Jessop, D. S., Lightman, S. L., Chowdrey, H. S., & Mikkelsen, J. D. (1994). The diurnal expression of genes encoding vasopressin and vasoactive intestinal peptide within the rat suprachiasmatic nucleus is influenced by circulating glucocorticoids. *Molecular Brain Research*, *27*(2), 342–346. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90021-3)

- Le Minh, N. (2001). Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *The EMBO Journal*, 20(24), 7128–7136. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7128>
- Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & 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)
- Lehmann, M., Haury, K., Oster, H., & Astiz, M. (2023). Circadian glucocorticoids throughout development. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1165230. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1165230>
- Li, Y., & Androulakis, I. P. (2021). Light entrainment of the SCN circadian clock and implications for personalized alterations of corticosterone rhythms in shift work and jet lag. *Scientific Reports*, 11(1), 17929. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97019-7>
- Liška, K., Sládek, M., Čechmanová, V., & Sumová, A. (2021). Glucocorticoids reset circadian clock in choroid plexus via period genes. *Journal of Endocrinology*, 248(2), 155–166. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0526>
- Liška, K., Sládek, M., Houdek, P., Shrestha, N., Lužná, V., Ralph, M. R., & Sumová, A. (2022). High Sensitivity of the Circadian Clock in the Hippocampal Dentate Gyrus to Glucocorticoid- and GSK3-Beta-Dependent Signals. *Neuroendocrinology*, 112(4), 384–398. <https://doi.org/10.1159/000517689>
- Liu, C., & Reppert, S. M. (2000). GABA Synchronizes Clock Cells within the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*, 25(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80876-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80876-4)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lou, S., & Chen, Y. (1998). The Rapid Inhibitory Effect of Glucocorticoid on Cytosolic Free Ca^{2+} Increment Induced by High Extracellular K^{+} and Its Underlying Mechanism in PC12 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(2), 403–407. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8280>
- Lužná, V., Houdek, P., Liška, K., & Sumová, A. (2021). Challenging the Integrity of Rhythmic Maternal Signals Revealed Gene-Specific Responses in the Fetal Suprachiasmatic Nuclei. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 613531. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.613531>
- Mason, B. L., Pariante, C. M., Jamel, S., & Thomas, S. A. (2010). Central Nervous System (CNS) Delivery of Glucocorticoids Is Fine-Tuned by Saturable Transporters at the Blood-CNS Barriers and Nonbarrier Regions. *Endocrinology*, 151(11), 5294–5305. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0554>
- Maurel, D., Sage, D., Mekaouche, M., & Bosler, O. (2000). Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia*, 29(3), 212–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000201\)29:3<212::AID-GLIA3>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000201)29:3<212::AID-GLIA3>3.0.CO;2-6)
- Moore, R., & Bernstein, M. (1989). Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience*, 9(6), 2151–2162. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-02151.1989>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- 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>

- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Patrick Card, J. (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology*, 352(3), 351–366. <https://doi.org/10.1002/cne.903520304>
- Morris, E. L., Patton, A. P., Chesham, J. E., Crisp, A., Adamson, A., & Hastings, M. H. (2021). Single-cell transcriptomics of suprachiasmatic nuclei reveal a Prokineticin-driven circadian network. *The EMBO Journal*, 40(20), e108614. <https://doi.org/10.15252/emj.2021108614>
- Murray, A., Tharmalingam, S., Khurana, S., Lalonde, C., Nguyen, P., & Tai, T. C. (2022). Effect of Prenatal Glucocorticoid Exposure on Circadian Rhythm Gene Expression in the Brains of Adult Rat Offspring. *Cells*, 11(10), 1613. <https://doi.org/10.3390/cells11101613>
- Nenke, M. A., Zeng, A., Meyer, E. J., Lewis, J. G., Rankin, W., Johnston, J., Kireta, S., Jesudason, S., Torpy, D. J. (2017). Differential Effects of Estrogen on Corticosteroid-Binding Globulin Forms Suggests Reduced Cleavage in Pregnancy. *Journal of the Endocrine Society* 1(3), 202-210. <https://doi.org/10.1210/js.2016-1094>
- Nishide, S., Honma, S., & Honma, K. (2008). The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *European Journal of Neuroscience*, 27(10), 2686–2690. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06231.x>
- Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tamura, S., & Sagara, Y. (1998). Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *Journal of Pineal Research*, 25(3), 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00550.x>
- Olejníková, L., Polidarová, L., & Sumová, A. (2018). Stress affects expression of the clock gene *Bmal1* in the suprachiasmatic nucleus of neonatal rats via glucocorticoid-dependent mechanism. *Acta Physiologica*, 223(1), e13020. <https://doi.org/10.1111/apha.13020>
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M. W., & Eichele, G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metabolism*, 4(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.002>
- Ota, S. M., Hut, R. A., Riede, S. J., Crosby, P., Suchecki, D., & Meerlo, P. (2020). Social stress and glucocorticoids alter PERIOD2 rhythmicity in the liver, but not in the suprachiasmatic nucleus. *Hormones and Behavior*, 120, 104683. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104683>
- Park, J., Zhu, H., O'Sullivan, S., Ogunnaike, B. A., Weaver, D. R., Schwaber, J. S., & Vadigepalli, R. (2016). Single-Cell Transcriptional Analysis Reveals Novel Neuronal Phenotypes and Interaction Networks Involved in the Central Circadian Clock. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00481>
- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25(0), 159–184. <https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.015>
- Polman, J. A. E., Welten, J. E., Bosch, D. S., De Jonge, R. T., Balog, J., Van Der Maarel, S. M., De Kloet, E. R., & Datson, N. A. (2012). A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells. *BMC Neuroscience*, 13(1), 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-118>
- Quagliarini, F., Mir, A. A., Balazs, K., Wierer, M., Dyar, K. A., Jouffe, C., Makris, K., Hawe, J., Heinig, M., Filipp, F. V., Barish, G. D., & Uhlenhaut, N. H. (2019). Cistromic Reprogramming of the Diurnal Glucocorticoid Hormone Response by High-Fat Diet. *Molecular Cell*, 76(4), 531-545.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.007>

- Rao, N. A. S., McCalman, M. T., Moulos, P., Francoijs, K.-J., Chatziioannou, A., Kolisis, F. N., Alexis, M. N., Mitsiou, D. J., & Stunnenberg, H. G. (2011). Coactivation of GR and NFκB alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Genome Research*, 21(9), 1404–1416. <https://doi.org/10.1101/gr.118042.110>
- Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. A., King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P., & Hastings, M. H. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology*, 45(6), 1478–1488. <https://doi.org/10.1002/hep.21571>
- Reddy, T. E., Gertz, J., Crawford, G. E., Garabedian, M. J., & Myers, R. M. (2012). The Hypersensitive Glucocorticoid Response Specifically Regulates Period 1 and Expression of Circadian Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 32(18), 3756–3767. <https://doi.org/10.1128/MCB.00062-12>
- Reid, K. J. (2019). Assessment of Circadian Rhythms. *Neurologic Clinics*, 37(3), 505–526. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2019.05.001>
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1983). Maternal Coordination of the Fetal Biological Clock in Utero. *Science*, 220(4600), 969–971. <https://doi.org/10.1126/science.6844923>
- Reul, J. M. H. M., & Kloet, E. R. D. (1985). Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Reynolds, R. M. (2013). Programming Effects of Glucocorticoids. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 56(3), 602–609. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31829939f7>
- Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Medicine*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0>
- Ripperger, J. A., & Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nature Genetics*, 38(3), 369–374. <https://doi.org/10.1038/ng1738>
- Rosenfeld, P., Van Eekelen, J. A. M., Levine, S., & De Kloet, E. R. (1988). Ontogeny of the Type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: An immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 42(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90207-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90207-6)
- Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., Van Der, G. T. J., Horst, Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (2000). Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, 288(5468), 1013–1019. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1013>
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., & Reppert, S. M. (1997). Two period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261–1269. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80417-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80417-1)
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 13(4), 687–693. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01438.x>
- Sládek, M., & Sumová, A. (2019). Modulation of NMDA-Mediated Clock Resetting in the Suprachiasmatic Nuclei of mPer2Luc Mouse by Endocannabinoids. *Frontiers in Physiology*, 10, 361. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00361>

- 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*, *101*(16), 6231–6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401149101>
- So, A. Y.-L., Bernal, T. U., Pillsbury, M. L., Yamamoto, K. R., & Feldman, B. J. (2009). Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(41), 17582–17587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909733106>
- Soták, M., Bryndová, J., Ergang, P., Vagnerová, K., Kvapilová, P., Vodička, M., Pácha, J., & Sumová, A. (2016). Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiology International*, *33*(5), 520–529. <https://doi.org/10.3109/07420528.2016.1161643>
- Sotelo-Rivera, I., Cote-Vélez, A., Uribe, R.-M., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2017). Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine*, *55*(3), 861–871. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1223-z>
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*(6), 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- Su, Y., Van Der Spek, R., Foppen, E., Kwakkel, J., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2015). Effects of adrenalectomy on daily gene expression rhythms in the rat suprachiasmatic and paraventricular hypothalamic nuclei and in white adipose tissue. *Chronobiology International*, *32*(2), 211–224. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.963198>
- Sumová, A., & Čechmanová, V. (2020). Mystery of rhythmic signal emergence within the suprachiasmatic nuclei. *European Journal of Neuroscience*, *51*(1), 300–309. <https://doi.org/10.1111/ejn.14141>
- Šuchmanová, K., Sládek, M., Čechmanová, V., Shrestha, T. C., Ralph, M. R., & Sumová, A. (2020). Withdrawn: Dexamethasone resets the circadian clock in hippocampus via multiple mechanisms involving lithium-independent GSK3 β signalling. *British Journal of Pharmacology*, *177*(17), 4074–4074. <https://doi.org/10.1111/bph.14834>
- Tahara, Y., Shiraishi, T., Kikuchi, Y., Haraguchi, A., Kuriki, D., Sasaki, H., Motohashi, H., Sakai, T., & Shibata, S. (2015). Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Scientific Reports*, *5*(1), 11417. <https://doi.org/10.1038/srep11417>
- Tesic, D., Hawes, J. E., Zosky, G. R., & Wyrwoll, C. S. (2015). Vitamin D Deficiency in BALB/c Mouse Pregnancy Increases Placental Transfer of Glucocorticoids. *Endocrinology*, *156*(10), 3673–3679. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1377>
- Tischkau, S. A., Mitchell, J. W., Tyan, S.-H., Buchanan, G. F., & Gillette, M. U. (2003). Ca²⁺/cAMP Response Element-binding Protein (CREB)-dependent Activation of Per1 Is Required for Light-induced Signaling in the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 718–723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209241200>
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(11), 7728–7733. <https://doi.org/10.1073/pnas.102075599>

- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and β -Endorphin. *Science*, *213*(4514), 1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>
- Van De Kar, L. D., & Blair, M. L. (1999). Forebrain Pathways Mediating Stress-Induced Hormone Secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *20*(1), 1–48. <https://doi.org/10.1006/frne.1998.0172>
- Vasefi, M. S., Yang, K., Li, J., Kruk, J. S., Heikkila, J. J., Jackson, M. F., MacDonald, J. F., & Beazely, M. A. (2013). Acute 5-HT₇ receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons. *Molecular Brain*, *6*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-24>
- Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B. I., Van Der Burg, B., Van Buul-Offers, S. C., & Jansen, M. (2003). Glucocorticoid-Induced Increase in Lymphocytic FKBP51 Messenger Ribonucleic Acid Expression: A Potential Marker for Glucocorticoid Sensitivity, Potency, and Bioavailability. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(1), 277–284. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020354>
- Wang, Y., Zhang, Y., Hu, J., Pan, C., Gao, Y., Liu, Q., Xu, W., Xue, L., & Hu, C. (2024). Glucocorticoids modulate neural activity via a rapid non-genomic effect on Kv2.2 channels in the central nervous system. *Neurobiology of Stress*, *28*, 100593. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100593>
- Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (1995). Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*, *33*(1), 136–148. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00117-B](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00117-B)
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., & Firestone, G. L. (1993). Characterization of *sgk*, a Novel Member of the Serine/Threonine Protein Kinase Gene Family Which Is Transcriptionally Induced by Glucocorticoids and Serum. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(4), 2031–2040. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2031-2040.1993>
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, *14*(4), 697–706. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90214-7)
- Wieczorek, A., Perani, C. V., Nixon, M., Constancia, M., Sandovici, I., Zazara, D. E., Leone, G., Zhang, M.-Z., Arck, P. C., & Solano, M. E. (2019). Sex-specific regulation of stress-induced fetal glucocorticoid surge by the mouse placenta. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *317*(1), E109–E120. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00551.2018>
- Windle, R. J., Wood, S. A., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (1998). The Pulsatile Characteristics of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity in Female Lewis and Fischer 344 Rats and Its Relationship to Differential Stress Responses*. *Endocrinology*, *139*(10), 4044–4052. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6238>
- Windle, R. J., Wood, S. A., Shanks, N., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (1998). Ultradian Rhythm of Basal Corticosterone Release in the Female Rat: Dynamic Interaction with the Response to Acute Stress*. *Endocrinology*, *139*(2), 443–450. <https://doi.org/10.1210/endo.139.2.5721>
- Wohnik, G. M., Rüegg, J., Abel, G. A., Schmidt, U., Holsboer, F., & Rein, T. (2005). FK506-binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 4609–4616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407498200>
- 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>

- Yachi, K., Inoue, K., Tanaka, H., Yoshikawa, H., & Tohyama, M. (2007). Localization of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expressing neurons in the central nervous system and its relationship to the stress response. *Brain Research*, *1159*, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.024>
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003). Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science*, *302*(5649), 1408–1412. <https://doi.org/10.1126/science.1089287>
- 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*, *288*(5466), 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yamazaki, S., & Takahashi, J. S. (2005). Real-Time Luminescence Reporting of Circadian Gene Expression in Mammals. In *Methods in Enzymology* (Roč. 393, s. 288–301). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)93012-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)93012-7)
- Yan, L., Karatsoreos, I., LeSauter, J., Welsh, D. K., Kay, S., Foley, D., & Silver, R. (2007). Exploring Spatiotemporal Organization of SCN Circuits. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *72*(1), 527–541. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.037>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, 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*, *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*(1), 300. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0522-3>