

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Lucie Sovíčková**

**Cirkadiánní systém a m<sup>6</sup>A metylace RNA**

**Circadian system and m<sup>6</sup>A RNA methylation**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

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

V Praze, 8.8.2024

Podpis:

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové Ph.D. za velkou ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Evě Filipovské za velkou pomoc při provádění a organizaci pokusů. Mé díky patří také Mgr. Kateřině Skálové za zaškolení do kultivace buněčných kultur a obsluze LumiCycle přístroje a Mgr. Anetě Kubištové za pomoc při izolacích RNA. Také děkuji své rodině a přátelům za motivaci a podporu během celého studia.

## **Abstrakt**

Modifikace mRNA m<sup>6</sup>A metylací byla poprvé objevena v 70. letech minulého století a současné studie ukazují její význam v řadě fyziologických funkcí. Jedním ze studovaných funkcí m<sup>6</sup>A metylace mRNA je její vliv na regulaci cirkadiálního systému a hodinových genů. Na m<sup>6</sup>A metylaci se podílejí m<sup>6</sup>A metylázy a metylace je zpětně odstranitelná m<sup>6</sup>A demethylázami. Demethyláza ALKBH5 vykazuje význam ve spermatogenezi, rakovině, vývoji mozku a v klinické depresi. Naše studie sledovala vliv inhibice ALKBH5 v centrálním regulátoru cirkadiálního systému suprachiasmatických jader v potkanech a v PER2::LUC myších. Efekt inhibice ALKBH5 byl sledován na expresi hodinových genů *Per2*, *Bmal1*, *Nr1d1*, a dále genů *Socs3*, *Stat3*, *Gfap* a *Fto*.

**Klíčová slova:** cirkadiální systém, m<sup>6</sup>A metylace, ALKBH5, SCN, hodinové geny

## **Abstract**

The modification of mRNA by m<sup>6</sup>A methylation was first discovered in the 1970s and current studies show its role in various physiological processes. One of the studied functions of m<sup>6</sup>A methylation is its role in regulation of the circadian system and clock genes. The m<sup>6</sup>A methylation is catalysed by m<sup>6</sup>A methylases. This methylation can be reversed by m<sup>6</sup>A demethylases. The demethylase ALKBH5 plays a role in spermatogenesis, cancer, the brain development and major depressive disorder. Here, we study the effect of ALKBH5 inhibition in the central regulatory component of the circadian system, the suprachiasmatic nucleus of rats and PER2::LUC mice. We studied what effect ALKBH5 inhibition has on the expression of clock genes *Per2*, *Bmal1*, *Nr1d1* and also genes *Socs3*, *Stat3*, *Gfap* and *Fto*.

**Keywords:** circadian system, m<sup>6</sup>A methylation, ALKBH5, SCN, clock genes

# Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	1
1. ÚVOD.....	3
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	4
<b>2.1 Cirkadiánní systém.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Suprachiasmatická jádra .....	4
2.1.2 Transkripční zpětnovazebné smyčky .....	5
<b>2.2 m<sup>6</sup>A metylace mRNA .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Metyltransferázy .....	9
2.2.2 Demetylázy .....	10
2.2.3 m <sup>6</sup> A vazebné proteiny.....	12
<b>2.3 Vztah m<sup>6</sup>A metylace a cirkadiánního systému.....</b>	<b>13</b>
3. CÍLE PRÁCE.....	15
4. MATERIÁL A METODY .....	16
4.1 Laboratorní zvířata .....	16
4.2 Primární kultury SCN .....	16
4.3 Alkbh5 siRNA experimenty .....	17
4.4 Izolace RNA a RT-qPCR.....	17
4.5 Nahrávání bioluminiscence.....	18
4.6 Statistická analýza .....	18
5. VÝSLEDKY.....	20
<b>5.1 Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genů v SCN potkana .....</b>	<b>20</b>
5.1.1 Hodinový gen <i>Per2</i> .....	20
5.1.2 Hodinový gen <i>Bmal1</i> .....	21
5.1.3 Hodinový gen <i>Nr1d1</i> .....	23
5.1.4 Geny <i>Socs3</i> a <i>Stat3</i> .....	25
5.1.5 Gen <i>Gfap</i> .....	27
5.1.6 Geny demetyláz <i>Fto</i> a <i>Alkbh5</i> .....	28
<b>5.2 Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu <i>Per2</i> v SCN PER2::LUC myší.....</b>	<b>31</b>
6. DISKUSE .....	33

7. ZÁVĚR .....	38
8. LITERATURA .....	39

## Seznam použitých zkratek

ALKBH5 –  $\alpha$ -ketoglutarát závislá dioxygenáza alkB homolog, z angl. 5 $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5

ANOVA – analýza rozptylu (variance)

BMAL1 – mozkový a svalový protein podobný aryl uhlovodíkovému jadernému translokačnímu receptoru 1 (z angl. brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1)

CK1  $\epsilon/\delta$  – kasein kinázy 1  $\epsilon/\delta$

CLOCK – z angl. circadian locomotor output cycles kaput

CLOCK/BMAL1 – heterodimer proteinů CLOCK a BMAL1

CRY – z angl. cryptochrome

CT – cirkadiánní čas

ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

DAA - 3-deazaadenosin

E-box – z angl. enhancer box

FOXM1 – z angl. forkhead box m1

FTO – protein související s tukovou hmotou a obezitou, z angl. fat-mass and obesity-associated protein

GFAP - gliální fibrilární kyselý protein

KIAA1429 – také VIRMA, z angl. vir like m<sup>6</sup>A methyltransferase associated

m<sup>6</sup>A – metylace N<sup>6</sup>-metyladenosinu

METTL3 – z angl. methyltransferase-like 3

METTL14 – z angl. methyltransferase-like 14

mRNA – mediátorová ribonukleotidová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)

Nfil3 – nukleární faktor regulovaný interleukinem 3



Nr1d1 – jaderný receptor rodiny 1, skupina D, člen 1, gen pro REV-ERB  $\alpha$

PER – z angl. Period

PER/CRY – heterodimer proteinů PER a CRY

REV-ERB – sirotčí jaderný receptor z reverzního viru erythroblastózy (z angl. orphan nuclear receptor from the reverse erythroblastosis virus)

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

ROR – kyselině retinové příbuzný sirotčí receptor (z angl. retinoic acid receptor-related orphan receptor)

RUNX1T1 – z angl. RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1

SCN – suprachiasmatická jádra (z angl. suprachiasmatic nuclei)

SOCS3 – z angl. suppressor of cytokine signaling 3

SRSF3 – sestříhový faktor bohatý na arginin/serin 3

SRSF10 – sestříhový faktor bohatý na arginin/serin 10

STAT3 – z angl. the signal transducer and activator of transcription 3

U2OS – lidské buňky derivované z osteosarkomu

WTAP – Wilmsův tumor 1 asociovaný protein

YTH doména – YT521-B homologní doména

YTHDC1 – z angl. YTH domain containing 1

YTHDC2 – z angl. YTH domain containing 2

YTHDF1 – z angl. human YTH domain family 1

YTHDF2 – z angl. human YTH domain family 2

# 1. ÚVOD

Cirkadiánní systém umožňuje organismům přizpůsobit se světelným podmínkám a střídání dne a noci. Ovlivňuje jak chování, tak i metabolismus a fyziologické procesy. Tyto vnitřní hodiny jsou řízeny suprachiasmatickými jádry v hypotalamu a jejich molekulární mechanismus spočívá v transkripčních zpětnovazebných smyčkách hodinových genů. Hodinové geny se nachází ve všech buňkách těla. Cirkadiánní systém lze také regulovat transkripčními a posttranskripčními modifikacemi, včetně nedávno objevené m<sup>6</sup>A metylace mRNA. Na m<sup>6</sup>A metylaci se podílí metylázy METTL3 a METTL14 a metylace je zpětně odstraňována demethylázami FTO a ALKBH5. Přesný mechanismus vztahu mezi cirkadiánním systémem a m<sup>6</sup>A metylací zatím není plně objasněn. Tato práce má za cíl zjistit, jaký má inhibice ALKBH5 demethylázy vliv na expresi hodinových genů v suprachiasmatických jádrech.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

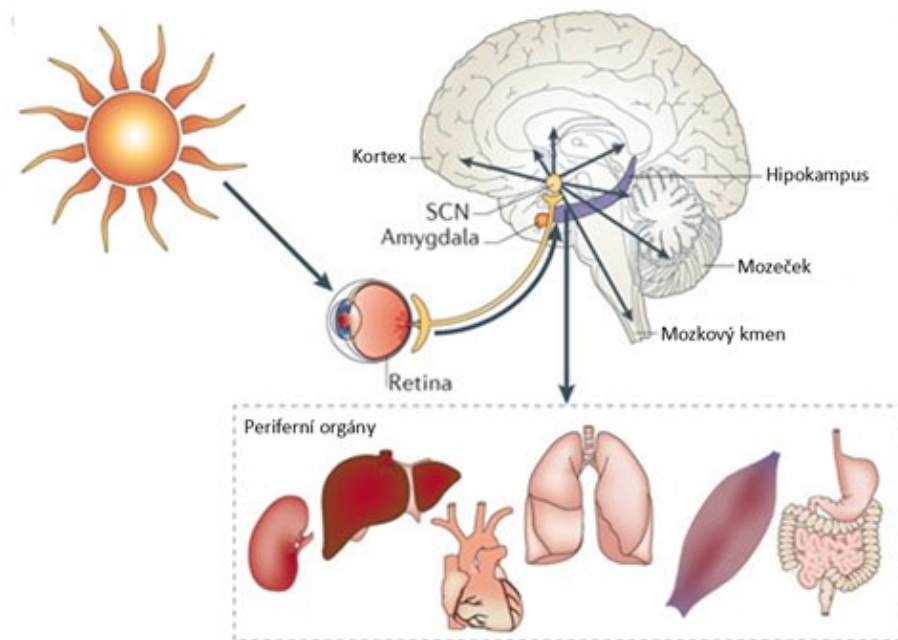
### 2.1 Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém umožňuje živočichům přizpůsobit své chování a fyziologické funkce cyklu střídání dne a noci. Cirkadiánní systém reguluje např. spánek, tělesnou teplotu, metabolismus a sekreci hormonů. Cirkadiánní cyklus trvá přibližně 24 hodin, odtud pochází jeho název („circa diem“ v překladu z latiny znamená přibližně den). Organismus je schopen udržovat cirkadiánní rytmus autonomně, ale k tomu, aby trval přesně 24 hodin je nutná synchronizace autonomních rytmů vnějšími vlivy, tzv. *zeitgebery*. Nejúčinnější *Zeitgeber* je světlo, ale vliv má například i časovaný příjem potravy (Dibner et al., 2010; Heyde & Oster, 2019). Za generování a synchronizování cirkadiánních rytmů v organismu jsou zodpovědná SCN (suprachiasmatická jádra) ve ventrálním hypotalamu (Moore, 2013; Rosenwasser & Adler, 1986). SCN dokáží udržovat periodickou neuronální aktivitu i *in vitro* po dobu několika týdnů (Bos & Mirmiran, 1990). SCN integruje časovou informaci *zeitgeberů* s vlastní, endogenní rytmicitou, čímž nastavuje cirkadiánní periodu podle solárního cyklu (Dibner et al., 2010). Nervovými a endokrinními drahami jsou následně synchronizovány cirkadiánní rytmy v periferních orgánech, jako jsou játra, slinivka, ledviny, srdce a plíce (Dibner et al., 2010; Yoo et al., 2004). Na molekulární úrovni je ve všech orgánech zajištěn cirkadiánní rytmus pomocí rytmické exprese hodinových genů (Cox & Takahashi, 2019).

#### 2.1.1 Suprachiasmatická jádra

SCN jsou centrální hodiny cirkadiánního systému. Je to párová struktura, která se nachází v hypotalamu v oblasti nad optickým chiasmem a u potkana obsahuje na každé straně cca 10 000 neuronů (Moore, 2013). Dělí se na ventrolaterální jádro, které sekretuje vazointestiální peptid a polypeptid uvolňující gastrin, a dorsomediální plášť, který sekretuje arginin vasopresin (Moore, 1996, 2013). SCN integruje informace z aferentních drah z retiny, genikulohypotalamické dráhy, serotonergní dráhy a *raphe nucleus*. Informace o světle jsou předávány z fotosensitivních retinálních gangliových buněk glutamátergním retinohypotalamickým traktem do ventrolaterálního jádra SCN (Dibner et al., 2010; Moore & Lenn, 1972). Ve ventrolaterálním jádru SCN je produkován vazointestiální peptid, který synchronizuje cirkadiánní rytmus v celé struktuře SCN (Herzog et al., 2017). Z SCN vycházejí eferentní dráhy do ostatních oblastí mozku, zejména dalších oblastí hypotalamu, jako je paraventriculární a dorsomediální jádro, a časové signály jsou vedeny také do periferních

orgánů, jejichž cirkadiální hodiny tak udržuje synchronizované se solárním cyklem (Dibner et al., 2010; Obrázek 1).



**Obrázek 1: Schéma cirkadiálního systému**

Centrálním regulátorem cirkadiálního rytmu jsou suprachiasmatická jádra (SCN) v hypotalamu. SCN dostává fotické informace z retiny přes retinohypotalamický trakt, a tím synchronizuje cirkadiální rytmus s cyklem dne a noci. SCN nadále synchronizuje periferní cirkadiální hodiny v ostatních oblastech mozku a v periferních orgánech jako jsou ledviny, játra, srdce a plíce. Převzato a upraveno z Kondratova & Kondratov, 2012.

### 2.1.2 Transkripční zpětnovazebné smyčky

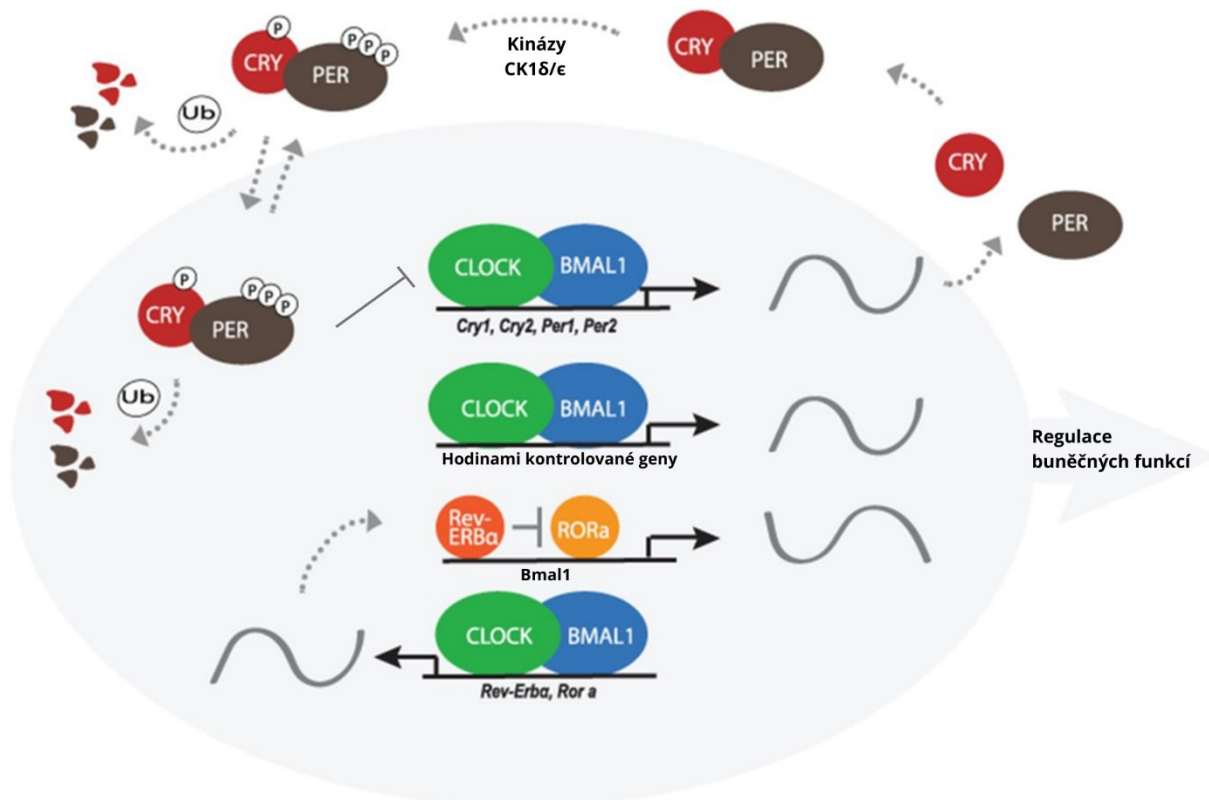
Každá buňka těla obsahuje tzv. hodinové geny, které tvoří molekulární podstatu cirkadiálního systému (Cox & Takahashi, 2019). Jako první byl objevený hodinový gen *Per* (*Period*), který vykazoval cirkadiální oscilaci v *Drosophila melanogaster* (Hardin et al., 1990). Hodinové geny jsou periodicky exprimovány díky transkripčně-translačním zpětnovazebným smyčkám (Cox & Takahashi, 2019; Obrázek 2).

Hlavní smyčka je generována heterodimerem proteinů BMAL1 (z angl. brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) a CLOCK (z angl. circadian locomotor output cycles kaput). Tento heterodimer translokuje do jádra a díky své basic helix-loop-helix doméně se váže na DNA do oblasti E-box (z angl. enhancer box) genů

*Per1/2/3* a *Cry1/2* (*Cryptochrome 1/2*). Vazba komplexu CLOCK/BMAL1 vede k transkripci *Per* a *Cry*, jejichž množství postupně přibývá během dne a večer tvoří heterodimer PER/CRY (Cox & Takahashi, 2019). PER1 a PER3 jsou v cytoplasmě fosforylovány CK1  $\epsilon/\delta$  (kasein kinázy 1  $\epsilon/\delta$ ) a PER2 je fosforylován glykogen syntáza kinázou 3, tyto fosforylace vedou k translokaci PER do jádra (Gallego & Virshup, 2007). V jádře se PER/CRY váže na CLOCK/BMAL1 komplex, inhibuje jeho aktivitu, a tím dojde i k inhibici transkripce genů *Per* a *Cry* (Cox & Takahashi, 2019; Michael et al., 2017). Na protein PER se váže CK1  $\epsilon/\delta$ , což vede k jeho ubiquitinaci a degradaci v proteazomu (Gallego & Virshup, 2007). Protein CRY je fosforylován AMP-aktivovanou protein kinázou a také degradován (Lamia et al., 2009). Množství proteinů PER/CRY tedy klesne během noci a tím je ukončena inhibice komplexu CLOCK/BMAL1 a začne nový cyklus transkripce. Tento proces trvá cca 24 hodin (Cox & Takahashi, 2019).

V druhé smyčce se CLOCK/BMAL1 váže na geny *Nr1d1/2* (*nukleární receptor podrodiny 1 skupiny D člen 1/2*), jejichž produkty jsou proteiny REV-ERB $\alpha/\beta$  (sirotčí jaderný receptor z reverzního viru erythroblastózy), a dále na geny *Rora/\beta/\gamma* (*kyselině retinové příbuzný sirotčí receptor*) a aktivuje jejich transkripci (Cox & Takahashi, 2019). Proteiny ROR a REV-ERB kompetují o vazbu na genu *Bmal1* v oblasti ROR-vazebného elementu a mají opačný efekt na transkripci *Bmal1*. Vazba ROR vede k aktivaci transkripce *Bmal1* a REV-ERB vede k její inhibici. Společně tak zajišťují cirkadiánní oscilace BMAL1 proteinu a stabilizují tím cirkadiánní hodiny (Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004).

Cirkadiánní hodiny jsou dále regulovány smyčkou, ve které CLOCK/BMAL1 aktivuje transkripci D element-vazebného proteinu a *Nfil3* (*nukleární faktor, regulovaný interleukinem 3*). Tyto proteiny se vážou na D-box oblasti některých hodinových genů a regulují jejich transkripci (Ripperger & Schibler, 2006; Ueda et al., 2005). Hodinové geny regulují expresi tisíce genů, nazývaných hodinami kontrolované geny, které vykonávají regulaci buněčných funkcí v cirkadiánním rytmu (Bozek et al., 2009).



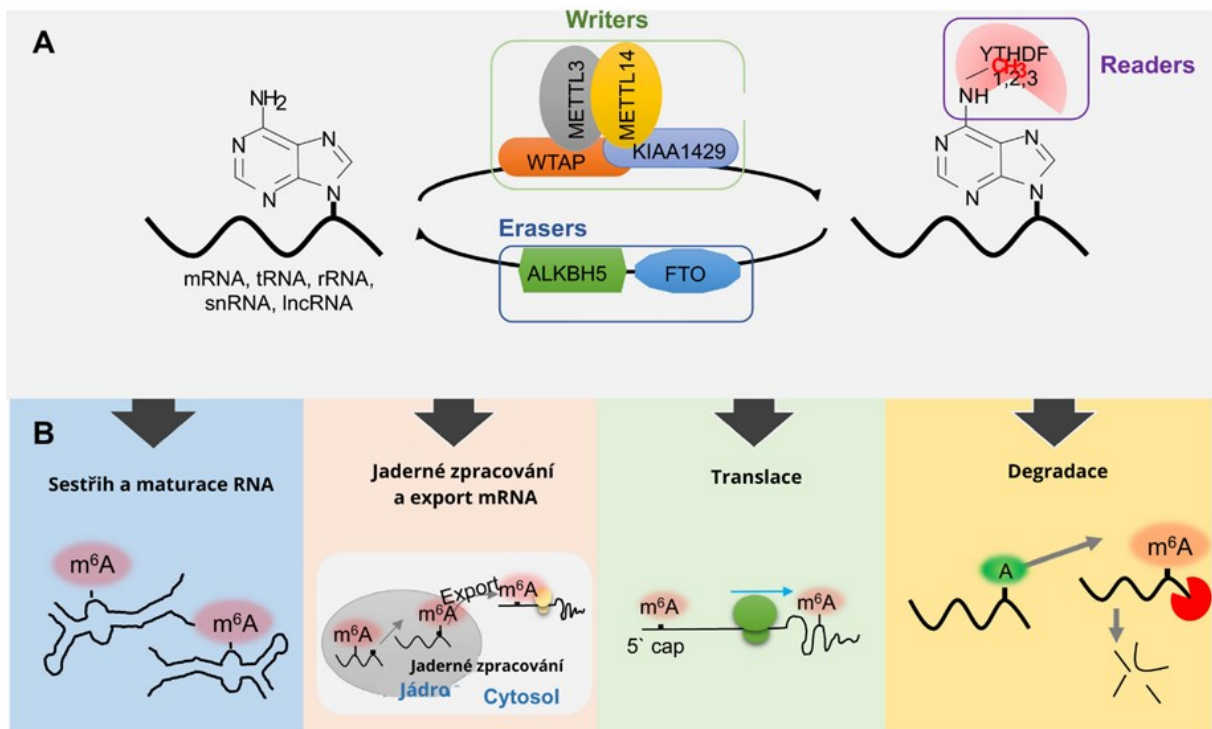
**Obrázek 2: Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin**

V hlavní transkripčně translační smyčce figuruji proteiny *BMAL1* a *CLOCK*, které tvoří heterodimer a vážou se na E-box genů *Per* a *Cry*. *PER* a *CRY* v cytoplasmě dimerizují a po fosforylaci kinázami *CK1δ/ε* translokují do jádra, kde inhibují transkripci aktivovanou komplexem *CLOCK/BMAL1*. Fosforylace mohou mít různé funkce, a vedou i k degradaci *PER* a *CRY*. Komplex *CLOCK/BMAL1* přestane být inhibován a smyčka začne znovu. Tímto je zajištěna cirkadiánní oscilace hlavních hodinových genů. V druhé smyčce *CLOCK/BMAL1* aktivuje expresi proteinů *REV-ERB* a *ROR*, které kompetují o vazbu na *ROR*-vazebný elementu genu *Bmal1*. *ROR* aktivuje transkripci *Bmal1* a *REV-ERB* ji inhibuje, což vede k cirkadiánní oscilaci exprese *Bmal1* a stabilizaci hlavní smyčky. *CLOCK/BMAL1* regulují transkripci hodinami kontrolovaných genů, které vykonávají různé buněčné funkce. Převzato a upraveno z Agostinelli et al., 2016.

## 2.2 m<sup>6</sup>A metylace mRNA

Modifikace mRNA jako jsou polyadenylovaný 3' konec a 5' čepička jsou známy již přes 50 let. Nejhojnější modifikací vnitřní části mRNA je však metylace N<sup>6</sup>-metyladenosinu neboli metylace m<sup>6</sup>A (Roundtree et al., 2017a). Methylace mRNA byla objevena v 70. letech 20. století na myších fibroblastech (Perry & Kelley, 1974) hepatomových buňkách (Desrosiers et al., 1974) a v HeLa buňkách (Wei et al., 1975). Ze všech metylací na polyadenylovaném konci mRNA tvořila 50 % m<sup>6</sup>A metylace (Desrosiers et al., 1974; Wei et al., 1975). Tato m<sup>6</sup>A metylace byla později potvrzena sekvenačními metodami (Dominissini et al., 2012; Liu et al., 2019; Meyer et al., 2012). Methylace m<sup>6</sup>A se vyskytuje v eukaryotních i prokaryotních buňkách (Deng et al., 2015), byla objevena v různých tkáních, se zvýšeným výskytem v játrech, ledvinách a mozku (Dominissini et al., 2012). Kromě mRNA se m<sup>6</sup>A metylace vyskytuje i v transferázové RNA, ribozomální RNA, mikro RNA a dlouhé nekódující RNA (Jiang et al., 2021). V rámci mRNA se m<sup>6</sup>A metylace vyskytuje v konsenzuální sekvenci RRACH (R = G nebo A; H = A, C nebo U) (Dominissini et al., 2012) a převažuje na 3' nepřekládané oblasti a v blízkosti stop kodonů (Meyer et al., 2012).

Na regulaci m<sup>6</sup>A metylace se podílejí tzv. „writers“ neboli metyltransferázy, které metylují RNA, „erasers“ neboli demetylázy, které m<sup>6</sup>A metylaci odstraňují a „readers“ m<sup>6</sup>A vazebné proteiny, které specificky rozpoznávají m<sup>6</sup>A metylaci a vykonávají její funkci (Jiang et al., 2021; Robinson et al., 2019; Obrázek 3). Methylace m<sup>6</sup>A posttranskripčně reguluje téměř všechny fáze metabolismu mRNA (Zhao et al., 2016). Ovlivňuje sestřih (Dominissini et al., 2012), transport z jádra (Fustin et al., 2013; Zheng et al., 2013), translaci (Wang et al., 2015c), stabilitu a degradaci mRNA (Wang et al., 2013). Proteiny zapojené v procesu m<sup>6</sup>A metylace hrají roli např. v obezitě (Dina et al., 2007), diabetes (Frayling et al., 2007), depresi (Guo et al., 2024) i v nádorových onemocněních (Tang et al., 2020; Zhang et al., 2019).



**Obrázek 3: Metylace  $m^6A$  a její role v metabolismu RNA**

(A) Methylace  $m^6A$  je regulována třemi typy proteinů, tzv. „writers“ ( $m^6A$  metyltransferázy), „erasers“ ( $m^6A$  demethylázy) a „readers“ ( $m^6A$  vazebné proteiny). Metyl transferázový komplex  $m^6A$  zahrnuje proteiny METTL3, METTL14, WTAP a KIAA1429 a přidává  $m^6A$  metylaci na RNA. Methylace je zpětně odstranitelná  $m^6A$  demethylázami FTO a ALKBH5. Za funkci  $m^6A$  methylace jsou zodpovědné  $m^6A$  vazebné proteiny YTHDF1/2/3 a YTHDC1/2.

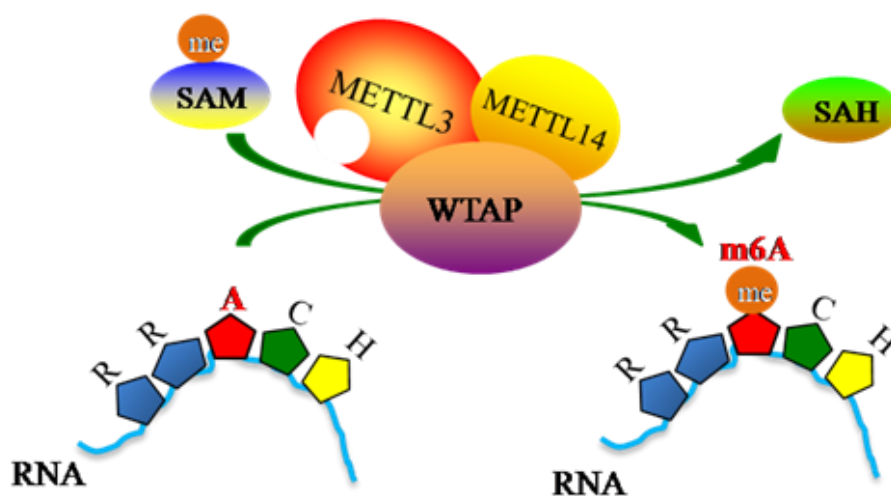
(B) Methylace  $m^6A$  reguluje různé procesy metabolismu RNA. Reguluje sekundární strukturu a maturaci mRNA, jaderné úpravy a transport, translaci a degradaci mRNA. Převzato a upraveno z Robinson et al., 2019.

### 2.2.1 Metyltransferázy

Methylace  $m^6A$  je posttranskripčně provedena v jádře v oblasti jaderných skvrn komplexem  $m^6A$  metyltransferáz (Liu et al., 2014). Jako první byla z HeLa buněk izolovaná metyltransferáza METTL3 (z angl. methyltransferase-like 3) (Bokar et al., 1997), která vykazuje funkci v embryonálním vývoji, kdy  $m^6A$  methylace je nezbytná k přechodu embryonálních kmenových buněk z jejich pluripotentního stavu k diferenciaci do specifických buněčných typů (Aguilo et al., 2015; Geula et al., 2015). Metyltransferáza METTL3 tvoří heterodimer s metyltransferázou METTL14 (z angl. methyltransferase-like 14), která je nezbytná pro její aktivaci. Vazba METTL14 způsobí konformační změnu v aktivním místě METTL3 a tím umožní vazbu RNA a donoru metylové skupiny S-adenosyl metioninu (Liu et



al., 2014; Wang et al., 2016). Součástí komplexu je i protein WTAP (Wilmsův tumor 1 asociovaný protein), který je zodpovědný za jeho lokalizaci do jaderných skvrn. Tyto tři proteiny tvoří katalytické jádro m<sup>6</sup>A metyltransferázového komplexu (Liu et al., 2014; Ping et al., 2014; Obrázek 4). Další součástí komplexu je protein KIAA1429 (také VIRMA, z angl. vir like m<sup>6</sup>A methyltransferase associated), který navádí celý komplex k specifickému místu na mRNA pro jeho metylaci na 3' oblasti a v blízkosti stop kodonů (Liu et al., 2018). Tento komplex převážně metyluje geny, které se účastní transkripce a úprav RNA. Přímou se podílí na alternativním sestřihu a může zajišťovat, že většina mRNA genů, na kterou se komplex váže, má více isoform (Ping et al., 2014).



**Obrázek 4: Metyltransferázový komplex a proces m<sup>6</sup>A metylace**

Metyltransferázový komplex je tvořen proteiny METTL3, METTL14 a WTAP. Metyltransferáza METTL3 dimerizuje s METTL14 a tato vazba způsobí konformační změnu v aktivním místě METTL3 a umožní vazbu donoru metylové skupiny S-adenosyl metioninu (SAM). METTL3 následně metyluje adenosin v konsenzuální sekvenci mRNA RRACH (R = G nebo A; H = A, C nebo U) a vytvoří tím m<sup>6</sup>A metylovanou mRNA. Z demetylovaného SAM se následně stane S-adenosylhomocystein (SAH). Komplex je lokalizován do oblasti jaderných skvrn díky proteinu WTAP. Převzato z Ping et al., 2014.

### 2.2.2 Demetylázy

Proces m<sup>6</sup>A metylace je reverzibilní a na odstranění metylace se podílí demetylázy. První objevená demetyláza m<sup>6</sup>A je FTO (protein související s tukovou hmotou a obezitou, z angl. fat-mass and obesity-associated protein), která katalyzuje oxidativní demetylací m<sup>6</sup>A na mRNA v jádře (Jia et al., 2011). FTO byla již dříve známá jako rizikový faktor pro obezitu a byly nalezeny jednonukleotidové polymorfismy genu *Fto* spojené s obezitou u dětí i dospělých (Dina et al., 2007; Scuteri et al., 2007). FTO je dále spojena a diabetem typu 2, což je zřejmě

zapříčiněno vlivem rizikových variant genu *Fto* na zvýšení tělesné hmotnosti. U 16 % dospělých pacientů, kteří mají obě rizikové alely, bylo pozorováno 1,38násobně vyšší riziko nadměrné hmotnosti a 1,67násobně vyšší riziko obezity (Frayling et al., 2007). FTO je vysoce exprimována v hypotalamu v paraventriculárním, dorzomediálním, ventromediálním jádru a v *nucleus arcuatus*, což jsou oblasti důležité pro regulaci energetického metabolismu (Gerken et al., 2007). Množství *Fto* mRNA je navíc regulováno potravou, u myšič, které hladověly po 48 hodin, pokleslo množství *Fto* mRNA v *nucleus arcuatus* o 60 % (Gerken et al., 2007). FTO má také vliv na adipogenezi, a inhibice FTO vede k potlačení diferenciace buněk na adipocyty. Vliv FTO na tuto diferenciaci může být vysvětlen regulací alternativního sestříhu transkripčního faktoru RUNX1T1 (z angl. RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1), který je spojený s adipogenezí. Metylace m<sup>6</sup>A v exonu genu pro RUNX1T1 reguluje, zda bude daný exon zahrnutý v maturované mRNA (Zhao et al., 2014). FTO také reguluje dopaminovou transmissi. Je totiž exprimována v dopaminergních neuronech ve středním mozku myši a její inhibice vede k snížené autoinhibici dopaminových receptorů typu 2 a 3 (Hess et al., 2013). Tato regulace by tak mohla vysvětlovat spojitost variant *Fto* s poruchou pozornosti s hyperaktivitou (Choudhry et al., 2013).

Další objevenou m<sup>6</sup>A demetylázou je ALKBH5 ( $\alpha$ -ketoglutarát závislá dioxygenáza alkB homolog, z angl. 5 $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5), která demetyluje mRNA *in vitro* i *in vivo* a její inhibice vede k zvýšení celkové m<sup>6</sup>A metylace mRNA v HeLa buňkách (Zheng et al., 2013). Autoři Zheng et al. (2013) dále ukázali, že ALKBH5 má vliv na myšič spermatogenezi a na stabilitu mRNA a její export z jádra. Inhibice ALKBH5 vedla k zrychlení exportu mRNA z jádra a delece ALKBH5 vedla k destabilizaci celkové mRNA. ALKBH5 je vysoce exprimovaná v primárních spermatocytech v myšič varlatech a myšič s delecí *Alkbh5* měli snížený počet spermií a morfologicky abnormální spermie. Další studie ukázala, že demetyláza ALKBH5 by mohla mít funkci ve vývoji mozku, jelikož je vysoce exprimována během embryonálního vývoje mozku a spolu s vývojem mozku se její množství postupně snižuje (Du et al., 2020). Tato práce dále zkoumala lokalizaci exprese *Alkbh5*. Demetyláza ALKBH5 byla u dospělých myšič exprimována ve všech oblastech mozku, hlavně v oblastech čichového laloku a v mozečku. V mozkové kůře a v hipokampu byla ALKBH5 exprimována téměř výhradně v neuronech, a to převážně v jádře.

ALKBH5 se ukazuje být důležitý faktor u onkologických nemocí. Její role však není plně objasněna a efekt se liší u různých typů nádorových onemocnění, ALKBH5 může mít tumor supresorový i onkogenní efekt (Wang et al., 2020). U nádorů žaludku byla ukázána

zvýšená exprese ALKBH5 a její inhibice vedla k snížení metastáze nádorových buněk (Zhang et al., 2019). Zvýšená exprese ALKBH5 byla ukázána také u buněk glioblastomu. ALKBH5 podporuje expresi transkripčního faktoru FOXM1 (z angl. forkhead box m1) (Zhang et al., 2017), který podporuje expresi a aktivaci STAT3 (z angl. the signal transducer and activator of transcription 3), a tím přispívá k proliferaci glioblastomových kmenových buněk (Gong et al., 2015). U pacientů s karcinomem pankreatu byla vysoká exprese ALKBH5 spojena s vyšší šancí na přežití pacientů (Cho et al., 2018). Naopak inhibice ALKBH5 vedla k zvýšení proliferace a migrace buněk adenokarcinomu (Tang et al., 2020). Vyšší exprese ALKBH5 také korelovala s delší dobou přežití pacientů s osteosarkomem, s potlačením růstu nádoru díky potlačení buněčné proliferace a zvýšené apoptóze (Yang et al., 2022). Autoři studie přišli s hypotézou, že tento mechanismus spočívá v potlačení signální dráhy STAT3. ALKBH5 demetyluje mRNA genu *Socs3* (z angl. suppressor of cytokine signaling 3; Yang et al., 2022), který negativně reguluje STAT3 (Nicholson et al., 2000). Metylovaná mRNA *Socs3* je rozpoznávána YTHDF2 (z angl. human YTH domain family 2) m<sup>6</sup>A asociovaným proteinem, který podporuje degradaci SOCS3. Odstranění m<sup>6</sup>A metylace na mRNA *Socs3* díky ALKBH5 demetyláze tedy vede k stabilizaci této mRNA a k potlačení STAT3 signální dráhy proteinem SOCS3 (Yang et al., 2022).

### 2.2.3 m<sup>6</sup>A vazebné proteiny

Proteiny zodpovědné za vykonání funkcí m<sup>6</sup>A metylace se nazývají „readers“. Tyto proteiny se vážou na m<sup>6</sup>A modifikovanou mRNA a regulují jí buď přímo vazbou specifických RNA-vazebných proteinů, anebo nepřímo, kdy daný „reader“ způsobí změnu v sekundární struktuře metylované mRNA, a tím umožní nasednutí RNA-vazebných proteinů na mRNA (Zhao et al., 2016). Tyto proteiny obsahují YTH (YT521-B homologní) vazebnou doménu, která obsahuje hydrofobní kapsu se zbytky tryptofanu a leucinu rozpoznávající metylovou skupinu m<sup>6</sup>A v konsensus sekvenci mRNA (Theler et al., 2014; Xu et al., 2014). Cytosomální protein YTHDF1 (z angl. human YTH domain family protein 1) interaguje s iniciačními faktory translace a podporuje iniciaci translace m<sup>6</sup>A metylované mRNA (Wang et al., 2015c). Naopak protein YTHDF2 podporuje lokalizaci m<sup>6</sup>A metylované mRNA do oblastí k degradaci a vyřazení YTHDF2 vede k prodloužení životnosti m<sup>6</sup>A metylované mRNA (Wang et al., 2013). YTHDF1 a YTHDF2 vykazují vazbu na společnou skupinu m<sup>6</sup>A metylované mRNA, YTHDF1 se však váže dříve než YTHDF2 (Wang et al., 2015c). Kooperace YTHDF1 a YTHDF2 by mohla mít funkci pro synchronizaci a rychlou translaci a degradaci m<sup>6</sup>A metylovaných mRNA v procesech jako jsou buněčná diferenciaci (Zhao et al., 2016). Funkce těchto dvou proteinů je

dále regulována třetím cytosolickým proteinem YTHDF3 (z angl. human YTH domain family protein 3), který se spolu s YTHDF1 váže na m<sup>6</sup>A mRNA a podporuje translaci mRNA (Shi et al., 2017). Snížení exprese YTHDF3 vede k snížení vazebné specifity YTHDF1 a YTHDF2 k jejich cílovým mRNA, YTHDF3 by tedy mohl přispívat k jejich vazebné specifitě (Shi et al., 2017). Protein YTHDC2 (z angl. YTH domain containing 2) je vysoce exprimován v myších varlatech, mozku a slezině a podílí se na spermatogenezi. Myši s delecí genu *Ythdc2* jsou infertilní. YTHDC2 se zřejmě podílí na úspěšném průběhu meiózy v gametách, váže se na geny spojené s meiózou a je upregulovaný v počátečních fázích meiózy (Hsu et al., 2017).

V jádře se nachází m<sup>6</sup>A vazebný protein YTHDC1 (z angl. YTH domain containing 1), který reguluje sestřih pre-mRNA. YTHDC1 kompetitivně váže sestřihové faktory SRSF3 (sestřihový faktor bohatý na arginin/serin 3) a SRSF10 (sestřihový faktor bohatý na arginin/serin 10). Spolu se sestřihovým faktorem SRSF3 se YTHDC1 podílí na inkluzi exonu. Vazba SRSF10 k pre-mRNA vede naopak k přeskočení exonu a tomu YTHDC1 zabraňuje blokováním vazby SRSF10 na pre-mRNA (Xiao et al., 2016). YTHDC1 se podílí také na exportu mRNA z jádra, inhibice YTHDC1 vede k zvýšení množství jaderné m<sup>6</sup>A mRNA, a naopak její snížení v cytoplasmě (Roundtree et al., 2017b).

### 2.3 Vztah m<sup>6</sup>A metylace a cirkadiálního systému

Transkripční i posttranskripční modifikace hrají důležitou roli v regulaci cirkadiálního systému. Z ~ 9 % cirkadiálně řízených genů v játrech (Akhtar et al., 2002) je pouze ~ 22 % řízeno *de novo* transkripcí (Koike et al., 2012). Bylo ukázáno, že hodinové geny a kinázy CK1δ obsahují oblasti pro m<sup>6</sup>A metylaci (Fustin et al., 2013, 2018). Vztah mezi m<sup>6</sup>A metylací a cirkadiálním systémem zatím není plně objasněn.

Zvýšení exprese m<sup>6</sup>A metylázy METTL3 vede ke zkrácení cirkadiální periody, a naopak inhibice METTL3 pomocí siRNA způsobuje prodloužení cirkadiální periody a vede k zpoždění procesu úprav *Per2*, *Bmal1* a *Clock* transkriptů a k jejich opožděnému transportu z jádra (Barajas et al., 2022; Fustin et al., 2013). Přesný mechanismus vlivu m<sup>6</sup>A metylace na délku cirkadiální periody není známý. Gibo a Kurosawa (2020) ve své teoretické studii uvažovali dva možné mechanismy. Vycházeli z faktu, že m<sup>6</sup>A metylace podporuje destabilizaci a degradaci mRNA (Wang et al., 2013) a inhibice m<sup>6</sup>A metylace vede k stabilizaci mRNA, včetně mRNA hodinových genů (Fustin et al., 2013). Inhibice m<sup>6</sup>A metylace by tedy mohla prodloužit cirkadiální periodu stabilizací mRNA hodinových genů jako jsou *Per* a *Cry* anebo stabilizací mRNA kinázy CK1δ (Gibo & Kurosawa, 2020). Transkript kinázy CK1δ na svém 3'

konci nepřekládané oblasti vykazuje nejvýraznější maximum m<sup>6</sup>A metylace v porovnání s ostatními regulátory cirkadiánní periody. Inhibice m<sup>6</sup>A metylace způsobuje zvýšení množství CK1δ proteinů a prodloužení cirkadiánní periody (Fustin et al., 2018), v předchozích studiích byla však prodloužená perioda způsobená naopak inhibicí CK1δ kinázy (Etchegaray et al., 2009; Lee et al., 2009). Autoři Fustin et al. (2018) ve své studii poprvé identifikovali dvě isoformy CK1δ, které se podílejí na fosforylacích odlišných míst proteinu PER2, který je významný pro regulaci cirkadiánní periody (Wilkins et al., 2007). CK1δ1 převažuje v SCN, podporuje rozpad PER2 a její zvýšená exprese vede ke zkrácení cirkadiánní periody. Naopak CK1δ2 převažuje v játrech, stabilizuje PER2 a její zvýšená exprese cirkadiánní periodu prodlužuje. Specifická inhibice CK1δ2 kinázy vede ke zkrácené periodě (Fustin et al., 2018). Mechanismus prodloužení periody v důsledku zvýšené exprese CK1δ2 by mohl spočívat v aktivaci rychlost limitující reakce fosforylace PER2. Výpočetní modely ukázaly, že tato aktivace prodlužuje cirkadiánní periodu, naopak aktivace jiných fosforylačních procesů periodu zkracuje (Fustin et al., 2018; Gibo & Kurosawa, 2020). Na prodloužení periody při inhibici m<sup>6</sup>A metylace se mohou podílet také hodinové geny, jejichž mRNA jsou v důsledku inhibice m<sup>6</sup>A metylace stabilizovány (Fustin et al., 2013; Gibo & Kurosawa, 2020). Toto bylo potvrzeno výpočetními modely s tím, že k prodloužení periody přispívá stabilizace zejména *Per1*, *Per2*, a *Cry1*. Po inhibici m<sup>6</sup>A metylace vykazuje křivka cirkadiánní periody méně sinusoidní charakter, což odpovídá prodloužení periody v důsledku zvýšené exprese CK1δ2. Nelze však vyloučit, že se na prodloužené periodě podílí i stabilizace hodinových genů (Gibo & Kurosawa, 2020).

Zatímco inhibice metylázy METTL3 vede k prodloužené periodě (Fustin et al., 2013), inhibice demethylázy FTO nevedla ke zkrácení periody, ale také k jejímu prodloužení. To značí, že FTO zřejmě zastává mnohem složitější roli než jen jako m<sup>6</sup>A demethyláza. FTO např. interaguje s proteiny CRY1 a CRY2 a zvýšená exprese FTO potlačuje transkripci genů aktivovanou CLOCK/BMAL1 komplexem (Wang et al., 2015a).

Cirkadiánní systém je tedy ovlivněn m<sup>6</sup>A metylací, platí však i opačný vztah. Methylace m<sup>6</sup>A a hladiny proteinů METTL14, ALKBH5, FTO a YTHDF2 vykazují cirkadiánní rytmus (Wang et al., 2015b; Zhong et al., 2018). Vyřazení genů pro CRY1 a CRY2 vede ke ztrátě těchto rytmů a k celkovému snížení množství m<sup>6</sup>A metylace (Wang et al., 2015b). Delece *Bmall* v játrech vede k zvýšení exprese METTL3, METTL14, YTHDF2 a ALKBH5 a ke zvýšení m<sup>6</sup>A metylace (Zhong et al., 2018).

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zjistit význam demetylázy ALKBH5 pro funkci SCN. Experimentálně jsme testovali vliv inhibice m<sup>6</sup>A demetylázy ALKBH5 pomocí ALKBH5 siRNA na expresi hodinových genů *Per2*, *Nr1d1* a *Bmal1* a nehodinových genů *Stat3*, *Socs3* a *Gfap* v průběhu 24 hodin v SCN potkanů. Ze vzorků odebíraných každé 4 hodiny byla izolována RNA, a množství mRNA jednotlivých genů bylo měřeno pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce RT-PCR. Dalším cílem bylo zjistit vliv inhibice m<sup>6</sup>A demetylázy ALKBH5 pomocí ALKBH5 siRNA na expresi genu *Per2* v SCN PER2::LUC myší pomocí LumiCycle luminometru.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Laboratorní zvířata

Pro experimenty byli použiti potkani kmene Wistar a transgenní PER2::LUC myši. Zvířata byla chována ve světelném režimu 12 hodin světla následovaných 12 hodinami tmy (LD12“12) a při teplotě  $23 \pm 2$  °C s přístupem k vodě a potravě *ad libitum*.

### 4.2 Primární kultury SCN

Laboratorní zvířata byla ve stáří pěti dnů eutanizována dekapitací. Následně z nich byly vyjmuty oblasti hypotalamu obsahující SCN. Buňky byly extrahovány pomocí mechanické a enzymatické disociace trypsinem dle publikovaných metod (Svobodova et al., 2018; Watanabe et al., 1993). Na začátku experimentu byly připraveny 4 roztoky ve falkonkách. Falkonka M obsahující 12 ml média M199 a 300  $\mu$ l penicilinu, falkonka T s 9 ml GBSS (Gey's Balanced Salt Solution) a falkonka 10/10 s 7 ml EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) a 50  $\mu$ l FBS. Do falkonky 1/1 byl následně napipetován 1 ml z falkonky 10/10 a dále přidáno 7 ml EBSS, 80  $\mu$ l trypsin inhibitoru, 200  $\mu$ l DNázy. Tkáň byla po vyjmutí ze zvířat vložena do falkonky s roztokem M a vložena do ledu. Po poklesnutí veškeré tkáně na dno, byl odsán supernatant a přidány 2 ml roztoku T, tento krok byl zopakován 3-4krát. Tkáň byla následně přendána do zbytku roztoku T, ve kterém bylo před tím rozpuštěno 5 mg trypsinu. Falkonka s tkání byla následně promíchávána po dobu 20 minut na třepačce v inkubátoru. Poté byla falkonka stočena v centrifuze vychlazené na 4° C po dobu 1 minuty na 1100 rpm.

Následovala mechanická disociace. Po odsátí supernatantu byl přidán 1 ml z 1/1. Mikropipetou byl opakovaně nasáván a vypouštěn roztok o stěnu falkonky, nejprve 1000ml mikropipetou a následně 200ml mikropipetou. Poté byly přidány 3 ml roztoku 1/1. Falkonka byla stočena v centrifuze po dobu 5 minut při 4° C a 1100 rpm, odsán supernatant a přidán 1 ml Neurobasal média. Buňky byly v počítány v Bürkerově komůrce. Byl přidán Neurobasal a 10 % koňského séra, tak aby mohly být buňky vysázeny v hustotě 3000 buněk/mm<sup>2</sup> na krycí sklíčka potažená 0,01% roztokem poly-L-lyzinu v 24-jamkové destičce (pro vzorky z potkanů) nebo 35mm Petriho misce (pro vzorky z PER2::LUC myši). Následně byla buněčná kultura pěstována v mediu Neurobasal s 2% suplementem B27, 0,5 mM L-glutaminu, 100 U/mL penicilinu a 100  $\mu$ g/mL streptomycinu. Medium bylo vyměňováno každé tři dny a buňky byly udržovány v teplotě 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu a saturované vlhkosti.

### 4.3 Alkbh5 siRNA experimenty

Po pětidenní kultivaci byla provedena transfekce primární buněčné kultury s Alkbh5 siRNA (s154910, Thermo Fisher Scientific) nebo s ctrl siRNA (negativní kontrola siRNA, kat. č. AM4611, Thermo Fisher Scientific) pomocí transfekčního činidla lipofektaminu RNAiMAX v OptiMEM médiu. Transfekce byla provedena dle instrukcí výrobce (5 pmol siRNA na každou jamku v 24-jamkové destičce, 10 pmol siRNA na každou Petriho misku). Po 48 hodinách od transfekce bylo médium vyměněno za synchronizační médium s dexametazonem (1 $\mu$ M). Po 1 hodině bylo médium vyměněno za nové kompletní Neurobasal médium.

### 4.4 Izolace RNA a RT-qPCR

Vzorky z buněčných kultur získaných z SCN potkanů byly odebírány každé 4 hodiny (CT0 až CT24). Celková RNA byla extrahována pomocí RNA izolačního kitu (NucleoSpin RNA XS, Macherey-Nagel a RNeasy micro kit, Qiagen), izolace byla provedena podle návodu od výrobce. Následně bylo množství RNA změřeno na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) a vzorky byly naředěny tak, aby měly stejnou koncentraci RNA. RNA byla poté přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Vzorky cDNA byly amplifikovány v 20  $\mu$ L PCR reakční směsi obsahující 5x HOT FIREPol®Probe qPCR Mix Plus (Baria, Praha, Česká republika) a TaqMan assay (Applied Biosystems). Množství exprese genů *Alkbh5*, *Fto*, *Per2*, *Nr1D1*, *Bmall*, *Gapdh*, *Ppia*, *Gfap*, *Socs3* a *Stat3* bylo měřeno kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí RT-PCR za pomoci pre-developed TaqMan®assays (*Alkbh5*: Rn01750503\_m1, Thermo Fisher Scientific, *Fto*: Rn01538186\_m1, *Per2*: Rn01427704\_m1, *Nr1D1*: Rn01460662\_m1, *Bmall*: Rn00577590\_m1, *Gapdh*: Rn01775763\_g1, *Ppia*: Rn00690933\_m1, *Gfap*: Rn01253033\_m1, *Socs3*: Rn01470502\_g1, *Stat3*: Rn00680715\_m1, Applied Biosystems.). Všechny qPCR reakce byly provedeny v tripletech v nástroji LightCycler 480 (Roche Life Science, Indianapolis, IN, Spojené Státy). Střední hodnota crossing pointu (Cp) obdržného z qPCR byla normalizována na úroveň průměru housekeeping genů *Ppia* a *Gapdh* a použita pro analýzu relativní genové exprese pomocí  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metody (Livak & Schmittgen, 2001).



## 4.5 Nahrávání bioluminiscence

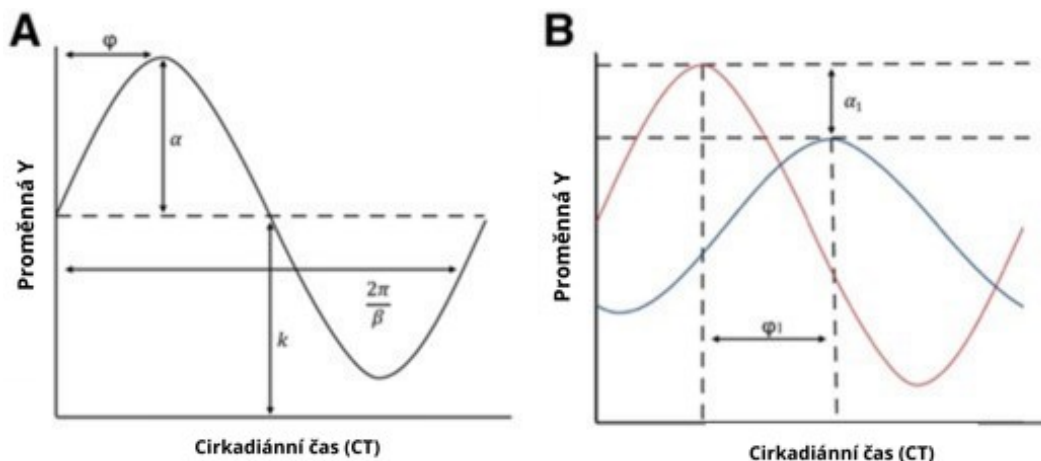
Primární buněčné kultury izolované z SCN PER2::LUC transgenických myší byly nasazeny na krycí sklíčka uvnitř 35mm Petriho misek. Po pětidenní kultivaci byly buňky transfekovány s Alkbh5 siRNA nebo s ctrl siRNA po dobu 48 hodin. Poté byly synchronizovány s 1 $\mu$ M dexametazonem po dobu 1 hodiny. Médium bylo nahrazeno za nahrávací médium skládajícího se z Neurobasalu, 2% B27 suplementu, 2% GlutaMAX suplementu, 100 U/mL penicilinu, 100  $\mu$ g/mL streptomycinu, 25mM HEPES a 0,1mM luciferinu. Misky byly utěsněny a umístěny do LumiCycle luminometru (Actimetrics, Evanston, IL, USA), kde byla monitorována exprese *Per2*. Perioda a amplituda rytmu *Per2* byly analyzovány pomocí LumiCycle Analysis Softwaru (Actimetrics).

## 4.6 Statistická analýza

Ke statistické analýze byl použit program GraphPad Prism verze 8. Rytmus hodinových genů byly vyhodnoceny kosinorovou analýzou podle následující rovnice s konstantní vlnovou délkou o 24 hodinách:

$$Y = \text{mesor} + (\text{amplituda} * \cos(2 * \pi * (X - \text{akrofáze}) / \text{vlnová délka}))$$

Tato analýza popisuje vlastnosti cirkadiálního rytmu a prokládá sinusoidu danými body na grafu. Cirkadiální rytmus lze charakterizovat amplitudou, což je polovina rozdílu nejvyššího a nejnižšího bodu, dále akrofází, což je časový bod, kdy rytmus dosahuje nejvyšší hodnoty, a mesorem, což je střední hodnota rytmu (Obrázek 5). Hodnota P udává pravděpodobnost, že daný výsledek by mohl být zapříčiněn náhodou, tedy pravděpodobnost tzv. nulové hypotézy. Pokud byla hodnota P <0,05, byl rytmus exprese hodinových genů potvrzen. V opačném případě byl jako alternativní hypotéza použit model horizontální přímky. Pro porovnání mesoru, amplitudy a akrofáze mezi Alkbh5 siRNA a ctrl siRNA byl použit nepárový oboustranný t test, pro vyhodnocení variance mezi skupinami byla použita dvoucestná ANOVA.



**Obrázek 5: Vlastnosti cirkadiánního rytmu a srovnání dvou rytmů**

(A) Sinusoidní zobrazení cirkadiánního rytmu pomocí kosinorovy analýzy., Amplituda –  $\alpha$  je polovina rozdílu nejvyššího a nejnižšího bodu, mesor –  $k$  je střední hodnota rytmu, akrofáze –  $\varphi$  je časový bod, kdy rytmus dosahuje nejvyšší hodnoty.

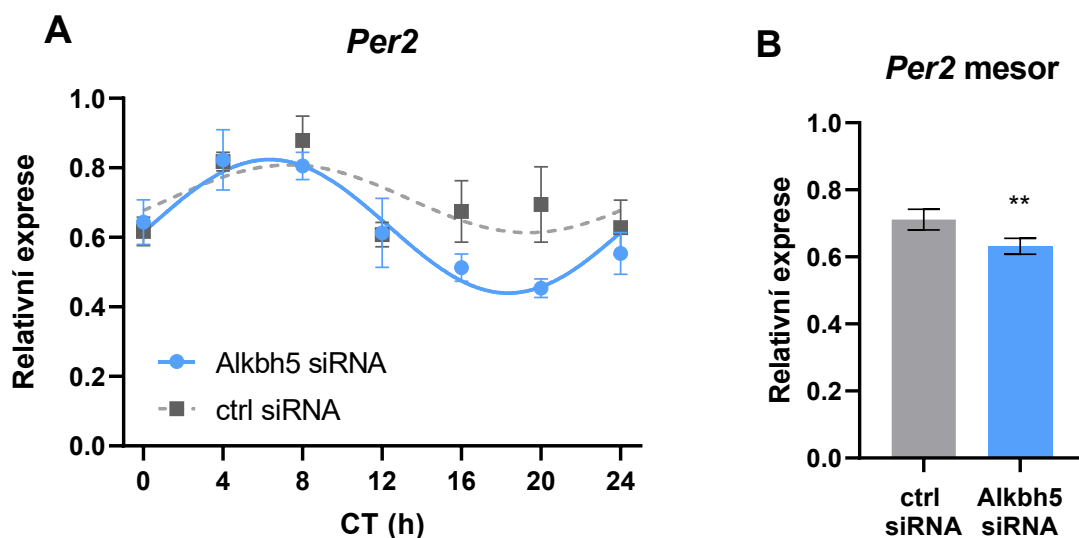
(B) Srovnání parametrů dvou cirkadiánních rytmů.  $\alpha_1$  – rozdíl amplitud  $\varphi_1$  – rozdíl akrofází. Převzato a upraveno z Parsons et al., 2020.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genů v SCN potkana

#### 5.1.1 Hodinový gen *Per2*

Kosinorovou analýzou byl potvrzen rytmus v expresi genu *Per2* (Obrázek 6A) pro skupinu transfekovanou Alkbh5 siRNA ( $P < 0,0001$ ), pro skupinu transfekovanou ctrl siRNA se rytmus nepotvrdil ( $P = 0,1144$ ). Dvoucestná ANOVA neprokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami ( $P = 0,0566$ ,  $F(1, 40) = 3,853$ ; Tabulka 1). Vzhledem k tomu, že jeden ze srovnávaných expresních profilů nebyl rytmický, lze srovnávat pouze hodnotu mesoru mezi oběma skupinami, nikoliv amplitudu a akrofázi. Nepárový *t* test prokázal signifikantní rozdíl v hodnotách mesoru mezi oběma skupinami ( $P = 0,0066$ ; Obrázek 6B).



**Obrázek 6:** Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu *Per2* v SCN potkana a porovnání průměru mesoru u skupin Alkbh5 siRNA a kontrolní siRNA.

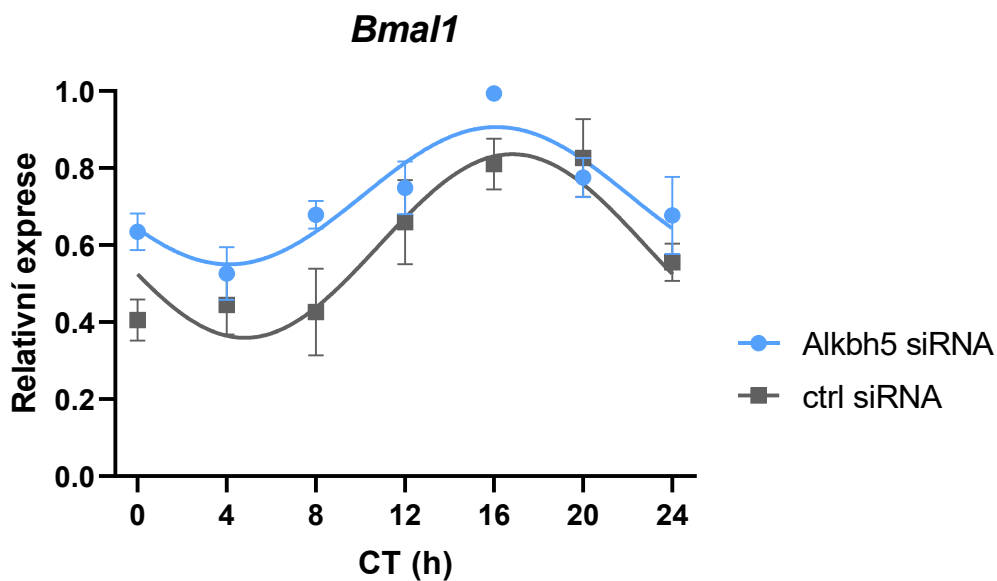
CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu *Per2* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a Alkbh5 siRNA (modře). Rytmus exprese byl analyzovaný kosinorovou analýzou, pro skupinu Alkbh5 siRNA bylo  $P < 0,0001$ , pro skupinu ctrl siRNA bylo  $P = 0,1144$ . Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímkou. Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.

(B) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P = 0,0066$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

### 5.1.2 Hodinový gen *Bmal1*

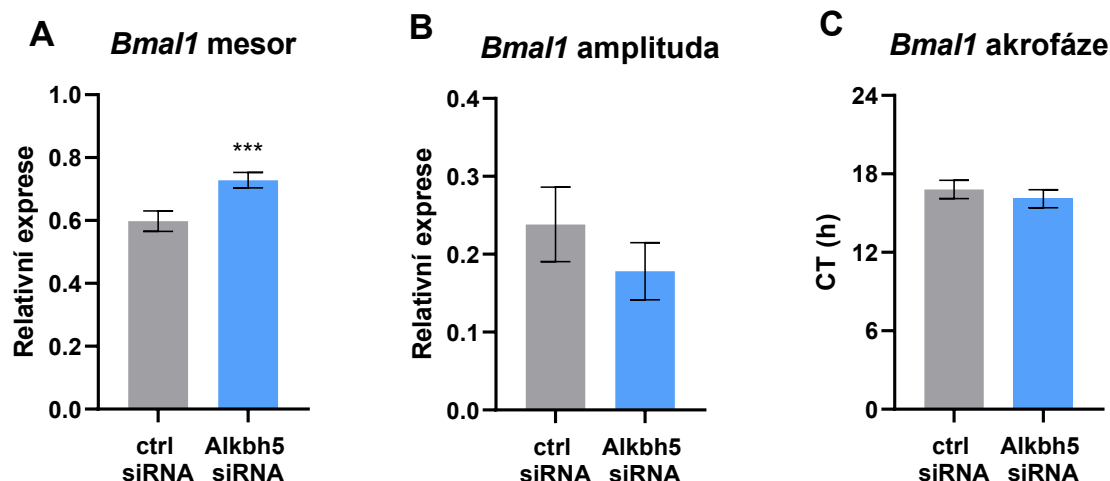
Rytmická exprese genu *Bmal1* byla potvrzena kosinorovou analýzou u skupiny *Alkbh5* siRNA ( $P = 0,0002$ ) i u ctrl siRNA ( $P = 0,0002$ ). Rozdíl mezi skupinami prokázala dvoucestná ANOVA jako signifikantní ( $P = 0,0023$ ,  $F(1, 39) = 10,67$ ; Obrázek 7; Tabulka 1). Nepárový t test prokázal signifikantní rozdíl u mesoru mezi skupinami ( $P = 0,0007$ ; Obrázek 8A). Rozdíl nebyl signifikantní u amplitudy ( $P = 0,0932$ ; Obrázek 8B) ani u akrofáze ( $P = 0,1990$ ; Obrázek 8C).



**Obrázek 7:** Vliv *Alkbh5* siRNA na expresi genu *Bmal1* v SCN potkana

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

RT-qPCR profil exprese genu *Bmal1* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a *Alkbh5* siRNA (modře). Rytmus exprese byl analyzovaný kosinorovou analýzou, pro skupinu *Alkbh5* siRNA bylo  $P < 0,0002$ , pro skupinu ctrl siRNA bylo  $P = 0,0002$ . Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.



**Obrázek 8: Porovnání průměru mesoru, amplitudy a akrofáze skupin Alkbh5 siRNA a ctrl siRNA u genu Bmal1**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

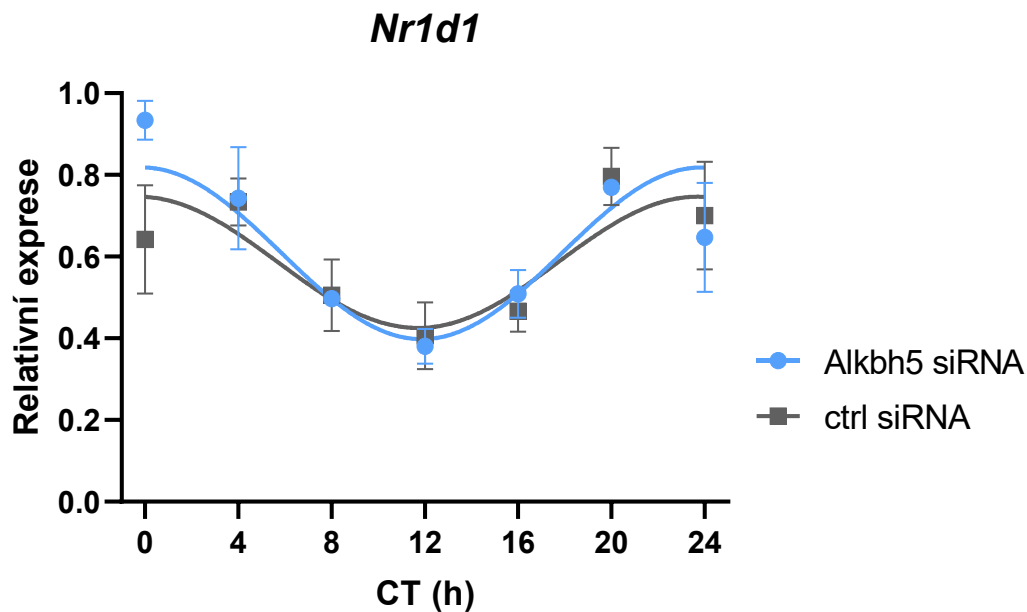
(A) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P = 0,0007$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

(B) Průměrná hodnota amplitudy u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,0932$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

(C) Průměrná hodnota akrofáze u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,1990$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

### 5.1.3 Hodinový gen *Nr1d1*

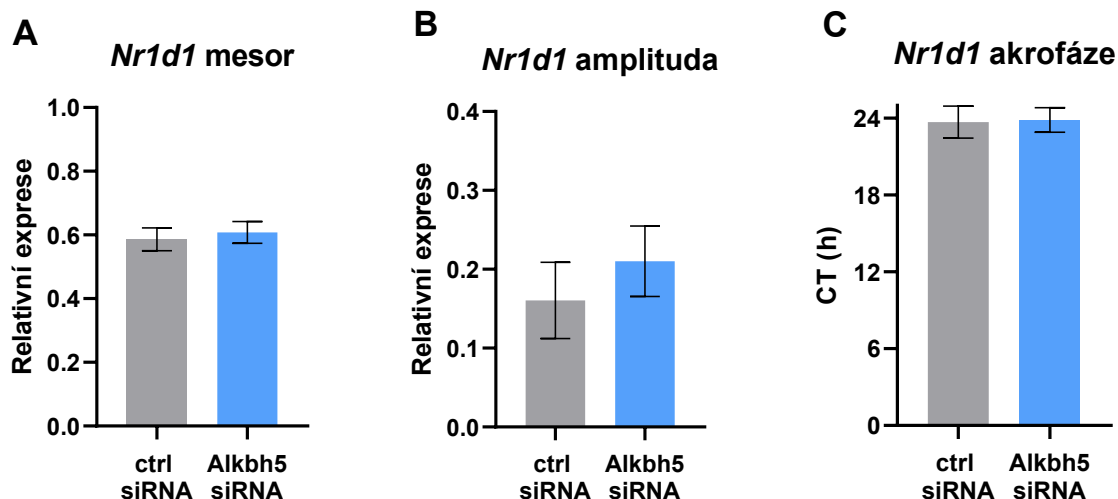
Rytmus exprese genu *Nr1d1* (Obrázek 9) byl prokázán kosinorovou analýzou u *Alkbh5* siRNA ( $P = 0,0004$ ) a ctrl siRNA ( $P = 0,0115$ ). Signifikantní rozdíl mezi skupinami dvoucestná ANOVA neprokázala ( $P = 0,4981$ ,  $F(1, 37) = 0,4683$ ; Tabulka 1). Nepárový t test neukázal signifikantní rozdíl mesorů ( $P = 0,4083$ ; Obrázek 10A), amplitud ( $P = 0,1829$ ; Obrázek 10B) ani akrofází ( $P = 0,8405$ ; Obrázek 10C).



**Obrázek 9: Vliv *Alkbh5* siRNA na expresi genu *Nr1d1* v SCN potkana**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

RT-qPCR profil exprese genu *Nr1d1* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a *Alkbh5* siRNA (modře). Rytmus exprese byl analyzovaný kosinorovou analýzou, pro skupinu *Alkbh5* siRNA bylo  $P < 0,0004$ , pro skupinu ctrl siRNA bylo  $P = 0,0115$ . Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.



**Obrázek 10: Porovnání průměru mesoru, amplitudy a akrofáze u skupin *Alkbh5* siRNA a *ctrl* siRNA u genu *Nr1d1***

*CT* – cirkadiánní čas v hodinách, *ctrl* siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,4083$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

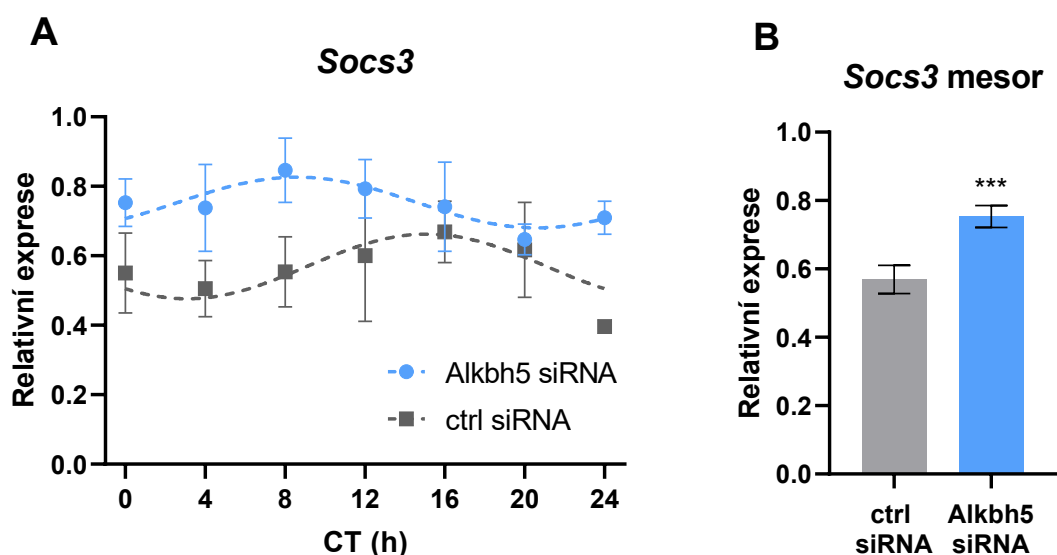
(B) Průměrná hodnota amplitudy u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,1829$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

(C) Průměrná hodnota akrofáze u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,8405$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

### 5.1.4 Geny *Socs3* a *Stat3*

Expresní profily genů *Socs3* a *Stat3* nebyly rytmické ani u jedné skupiny (*Socs3*: Alkbh5 siRNA:  $P = 0,3014$ , ctrl siRNA:  $P = 0,3060$ ; *Stat3*: Alkbh5 siRNA:  $P = 0,6674$ , ctrl siRNA:  $P = 0,1912$ ). Pro gen *Socs3* (Obrázek 11A) ukázala dvoucestná ANOVA signifikantní rozdíl mezi skupinami Alkbh5 siRNA a ctrl siRNA ( $P = 0,0013$ ,  $F(1, 39) = 12,06$ ; Tabulka 1). Nepárový t test prokázal signifikantní rozdíl mesorů ( $P = 0,0004$ ; Obrázek 11B).

U genu *Stat3* (Obrázek 12A) nebyl dvoucestnou ANOVA analýzou prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami Alkbh5 siRNA a ctrl siRNA ( $P = 0,1069$ ,  $F(1, 28) = 2,774$ ; Tabulka 1). Nepárový t test však prokázal signifikantní rozdíl mezi mesory ( $P = 0,0352$ ; Obrázek 12B).



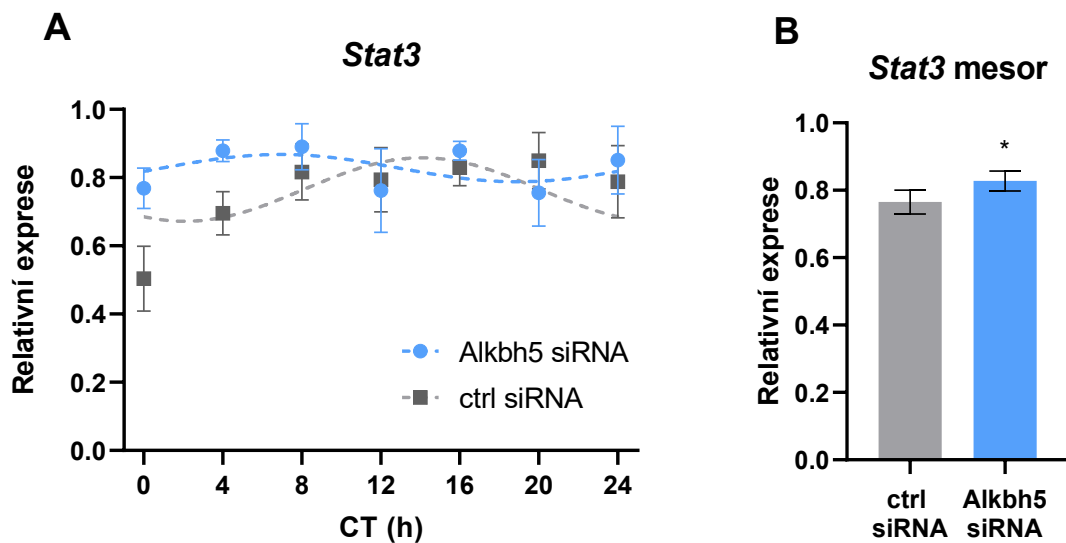
**Obrázek 11: Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu *Socs3* v SCN potkana a porovnání průměru mesoru u skupin Alkbh5 siRNA a kontrolní siRNA**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu *Socs3* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a Alkbh5 siRNA (modře). Data byla proložena kosinorovou křivkou. Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímkou. Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.

(B) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla vyhodnocena kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým t testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P = 0,0004$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.





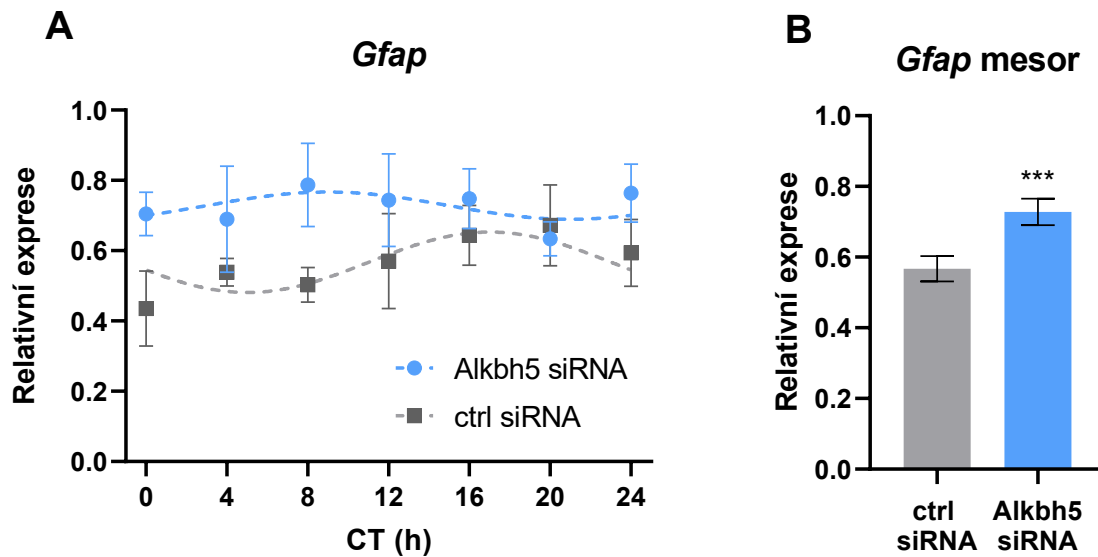
**Obrázek 12: Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu Stat3 v SCN potkana a porovnání průměru mesoru u skupin Alkbh5 siRNA a kontrolní siRNA**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu Stat3 v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a Alkbh5 siRNA (modře). Data byla proložena kosinorovou křivkou. Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímkou. Jednotlivé body znázorňují průměr 3 hodnot  $\pm$  SEM. (B) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla vyhodnocena kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P = 0,0352$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

### 5.1.5 Gen *Gfap*

Expresní profil genu *Gfap* nebyl rytmický ani u jedné skupiny (Alkbh5 siRNA:  $P = 0,7625$ , ctrl siRNA:  $P = 0,2829$ ; Obrázek 13A). Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami Alkbh5 siRNA a ctrl siRNA ( $P = 0,0050$ ,  $F(1, 40) = 8,808$ ; Tabulka 1). Nepárový t test prokázal signifikantní rozdíl mezi průměrem mesoru u obou skupin ( $P = 0,0008$ ; Obrázek 13B).



**Obrázek 13: Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu *Gfap* v SCN potkana a porovnání průměru mesoru u skupin Alkbh5 siRNA a kontrolní siRNA**

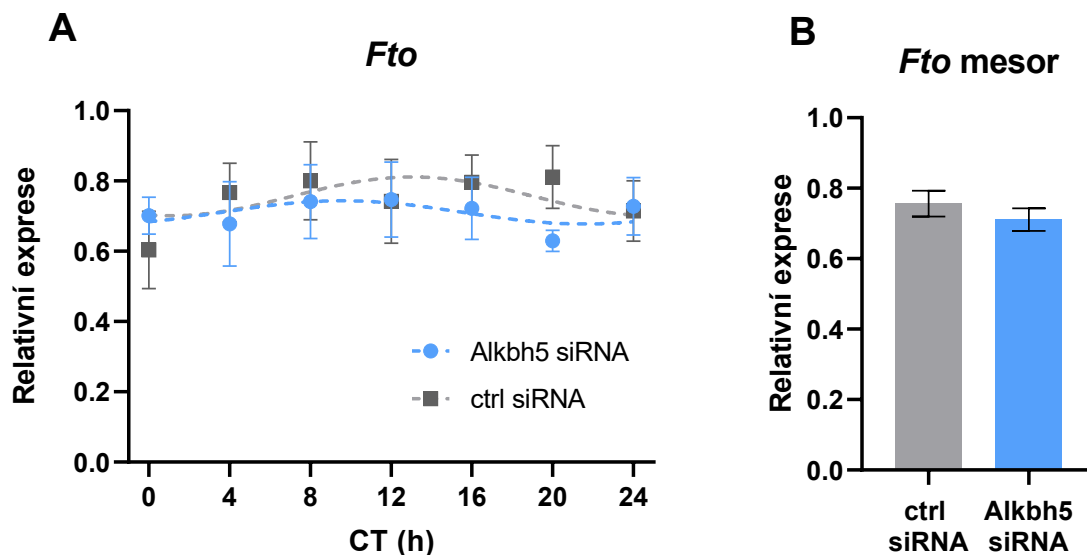
CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu *Gfap* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a Alkbh5 siRNA (modře). Data byla proložena kosinorovou křivkou. Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímku. Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.

(B) Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla vyhodnocena kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým t testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P = 0,0008$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

### 5.1.6 Geny demetyláz *Fto* a *Alkbh5*

Efekt *Alkbh5* siRNA byl sledován i na expresi genů m<sup>6</sup>A demetyláz *Fto* a *Alkbh5*. Expresní profily obou genů nebyly rytmické ani u jedné skupiny (*Fto*: *Alkbh5* siRNA:  $P = 0,7571$ , ctrl siRNA:  $P = 0,5433$ ; *Alkbh5*: *Alkbh5* siRNA:  $P = 0,3350$ , ctrl siRNA:  $P = 0,3480$ ). U genu *Fto* (Obrázek 14A) neprokázala dvoucestná ANOVA rozdíl mezi skupinami ( $P = 0,4172$ ,  $F(1, 40) = 0,6720$ ; Tabulka 1). Signifikantní rozdíl nebyl prokázán ani nepárovým t testem mezi mesory ( $P = 0,1107$ ; Obrázek 14B). Porovnáním exprese genu *Alkbh5* u *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA (Obrázek 15A) byla ověřena účinnost *Alkbh5* siRNA. Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami ( $P < 0,0001$ ,  $F(1, 39) = 69,16$ ; Tabulka 1). Nepárový t test prokázal rozdíl mesorů jako signifikantní ( $P < 0,0001$ ; Obrázek 15B).

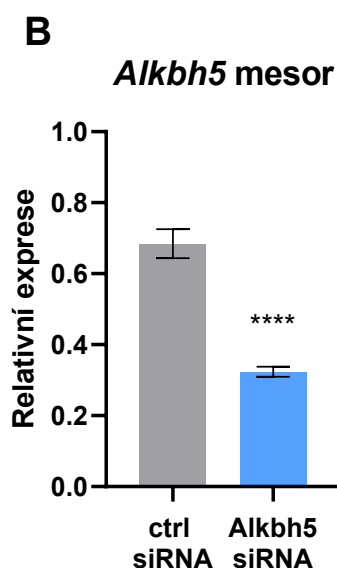
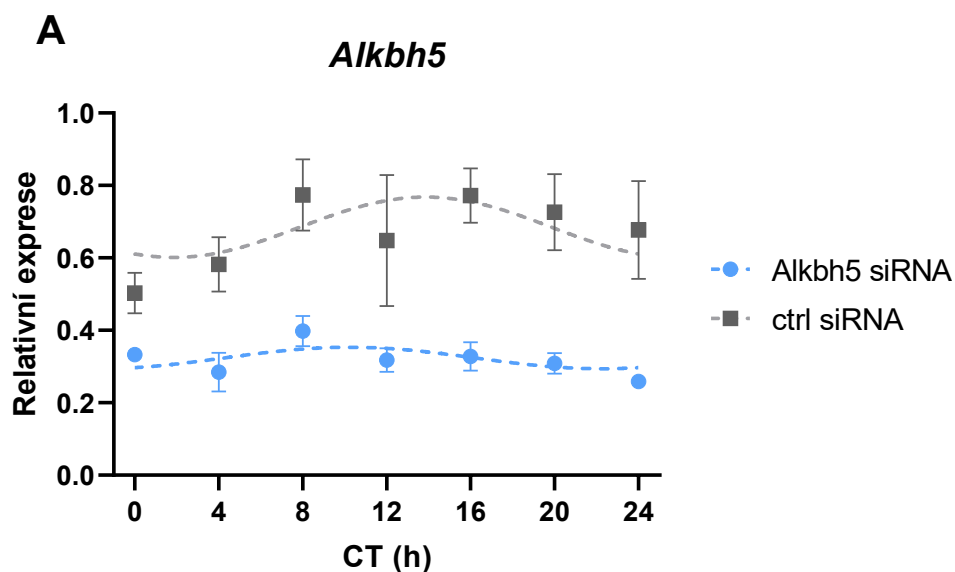


**Obrázek 14:** Vliv *Alkbh5* siRNA na expresi genu *Fto* v SCN potkana a porovnání průměru mesorů u skupin *Alkbh5* siRNA a kontrolní siRNA

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu *Fto* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a *Alkbh5* siRNA (modře). Data byla proložena kosinorovou křivkou. Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímkou. Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.

(B) Rozdíl mesorů skupin a *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA u genu *Fto*. Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým t testem. Rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní,  $P = 0,1107$ . Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.



**Obrázek 15: Vliv *Alkbh5* siRNA na expresi genu *Alkbh5* v SCN potkana a porovnání průměru mesorů u skupin *Alkbh5* siRNA a kontrolní siRNA**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl siRNA – negativní kontrola siRNA

(A) RT-qPCR profil exprese genu *Alkbh5* v buňkách SCN transfekovaných ctrl siRNA (šedě) a *Alkbh5* siRNA (modře). Data byla proložena kosinorovou křivkou. Přerušovaná čára značí, že analýza nezavrhlá nulovou hypotézu – horizontální přímku. Jednotlivé body znázorňují průměr 3-4 hodnot  $\pm$  SEM.

(B) Rozdíl mesorů skupin a *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA u genu *Alkbh5*. Průměrná hodnota mesoru u obou skupin byla zjištěna kosinorovou analýzou a následně porovnána nepárovým *t* testem. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní s  $P < 0,0001$ , byla tak potvrzena úspěšná transfekce s *Alkbh5* siRNA. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr relativní exprese  $\pm$  SD.

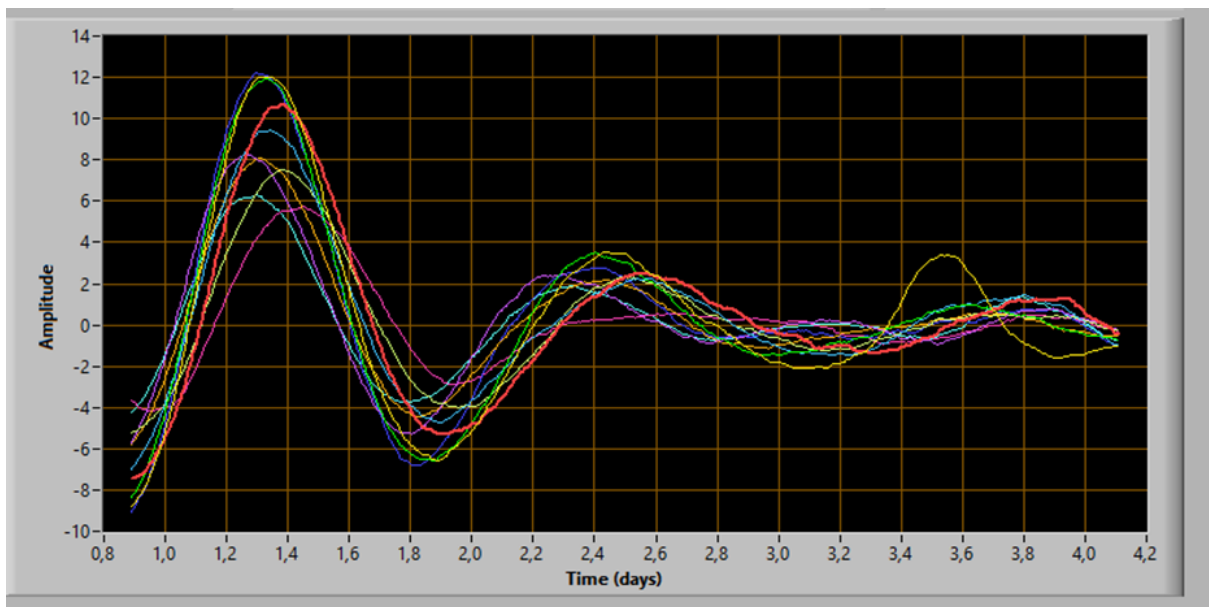
**Tabulka 1: Dvoucestná ANOVA zobrazující varianci mezi skupinami *Alkbh5* siRNA a *ctrl* siRNA u jednotlivých genů**

Tabulka ukazuje vliv času, vliv siRNA a jejich interakci. V tabulce je uvedena *F* distribuce a hodnota *P*. *F* distribuce má dva parametry, stupně volnosti čitatele (*DFn*, z angl. degrees of freedom numerator) a stupně volnosti jmenovatele (*DFd*, z angl. degrees of freedom denominator), které udávají kritickou hodnotu, kterou musí hodnota *F* přesáhnout pro vyvrácení nulové hypotézy. Signifikantní variance s  $P < 0,05$  jsou vyznačeny tučně.

	<b><i>Per2</i></b>		<b><i>Bmal1</i></b>	
	F (DFn, DFd)	P hodnota	F (DFn, DFd)	P hodnota
<b>Interakce</b>	F (6, 40) = 1,000	0,4387	F (6, 39) = 1,029	0,4214
<b>Vliv času</b>	<b>F (6, 40) = 5,309</b>	<b>0,0004</b>	<b>F (6, 39) = 8,465</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Porovnání skupin</b>	F (1, 40) = 3,853	0,0566	<b>F (1, 39) = 10,67</b>	<b>0,0023</b>
	<b><i>Nr1d1</i></b>		<b><i>Socs3</i></b>	
	F (DFn, DFd)	P hodnota	F (DFn, DFd)	P hodnota
<b>Interakce</b>	F (6, 37) = 0,8551	0,5365	F (6, 39) = 0,5452	0,7705
<b>Vliv času</b>	<b>F (6, 37) = 6,368</b>	<b>0,0001</b>	F (6, 39) = 0,5523	0,7651
<b>Porovnání skupin</b>	F (1, 37) = 0,4683	0,4981	<b>F (1, 39) = 12,06</b>	<b>0,0013</b>
	<b><i>Stat3</i></b>		<b><i>Gfap</i></b>	
	F (DFn, DFd)	P hodnota	F (DFn, DFd)	P hodnota
<b>Interakce</b>	F (6, 28) = 1,100	0,3870	F (6, 40) = 0,6097	0,7211
<b>Vliv času</b>	F (6, 28) = 1,643	0,1723	F (6, 40) = 0,3605	0,8994
<b>Porovnání skupin</b>	F (1, 28) = 2,774	0,1069	<b>F (1, 40) = 8,808</b>	<b>0,0050</b>
	<b><i>Fto</i></b>		<b><i>Alkbh5</i></b>	
	F (DFn, DFd)	P hodnota	F (DFn, DFd)	P hodnota
<b>Interakce</b>	F (6, 40) = 0,4704	0,8261	F (6, 39) = 0,7629	0,6034
<b>Vliv času</b>	F (6, 40) = 0,3519	0,9046	F (6, 39) = 1,246	0,3048
<b>Porovnání skupin</b>	F (1, 40) = 0,6720	0,4172	<b>F (1, 39) = 69,16</b>	<b>&lt;0,0001</b>

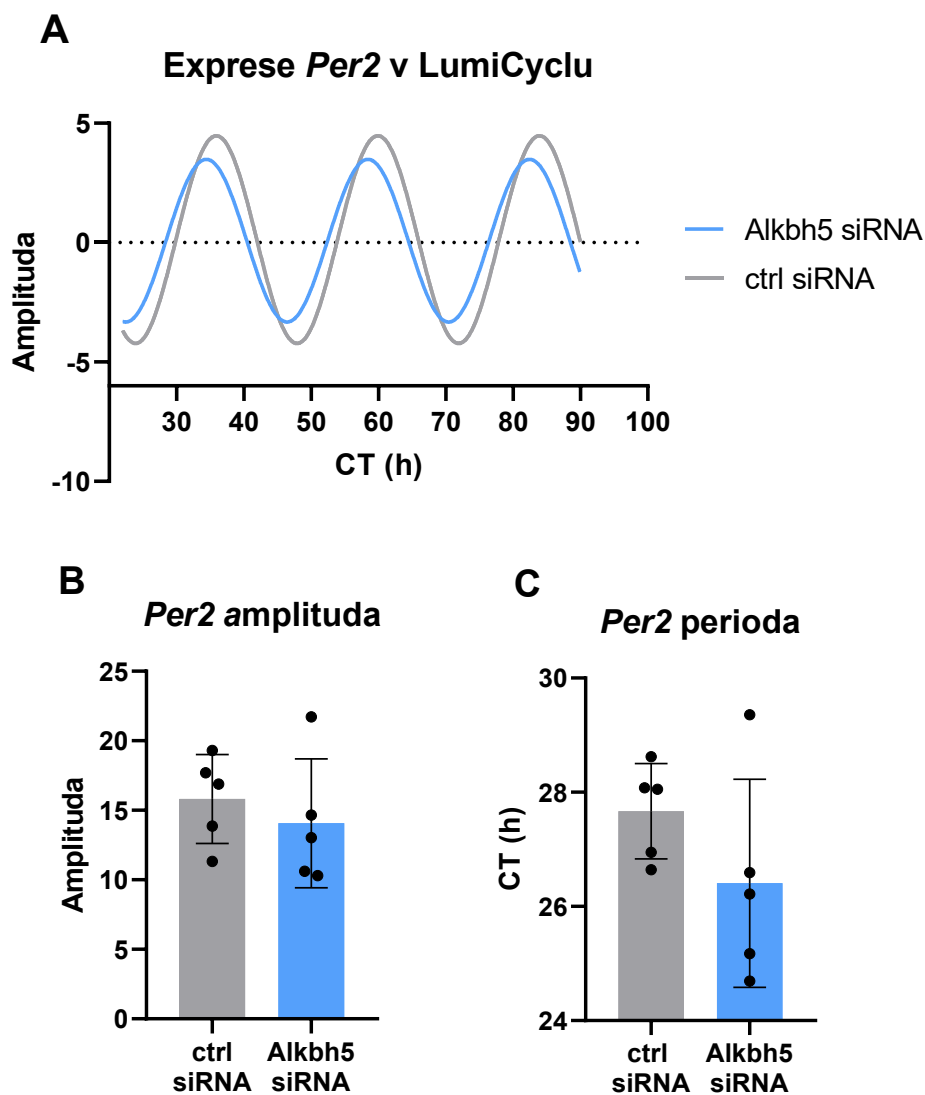
## 5.2 Vliv Alkbh5 siRNA na expresi genu *Per2* v SCN PER2::LUC myši

Nahráváním bioluminiscence přístrojem LumiCycle byla měřena exprese genu *Per2* v buněčných kulturách SCN PER2::LUC myši s Alkbh5 siRNA nebo s ctrl siRNA. Výsledek byl vyhodnocen pomocí LumiCycle Analysis Softwaru (Obrázek 16). Data byla zpracována i v programu GraphPad Prism a analyzována kosinorovou analýzou, která prokázala rytmus exprese pro obě skupiny ( $P < 0,0001$ ). Data byla zanesena do grafu (Obrázek 17A). Nepárovým t testem byl porovnána průměrná amplituda a perioda u obou skupin. Rozdíl amplitudy ( $P = 0,5079$ ; Obrázek 17B) ani periody ( $P = 0,1967$ ; Obrázek 17C) nebyl signifikantní.



**Obrázek 16:** Záznam bioluminiscence exprese genu *Per2* v SCN PER2::LUC myši z LumiCycle luminometru.

Osa Y ukazuje amplitudu rytmu. Osa X ukazuje čas v rámci dnů, kdy byla hodnota zaznamenána (4,2 dny). První vrchol byl pro zvýšení přesnosti odstraněn. Záznam obsahuje 10 vzorků, z toho 5 vzorků transfekovaných Alkbh5 siRNA a 5 vzorků transfekovaných ctrl siRNA, skupiny nejsou v tomto grafu rozlišeny.



**Obrázek 17: Vliv *Alkbh5* siRNA na expresi genu *Per2* měřenou v LumiCycle luminometru.**

CT – cirkadiánní čas v hodinách, ctrl – negativní kontrola siRNA

(A) Graf znázorňuje průměrný rytmus exprese genu *Per2* pro skupinu transfekovanou *Alkbh5* siRNA (modře) a skupinu transfekovanou ctrl siRNA (šedě). Data byla analyzována kosinorovou analýzou, rytmus byl potvrzen pro obě skupiny s  $P < 0,0001$ . Každá skupina obsahovala 5 vzorků.

(B) Porovnání průměru amplitud mezi skupinami s *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA. Pro porovnání byl použit nepárový *t* test, rozdíl nebyl signifikantní,  $P = 0,5079$ . Černé body vyznačují průměrnou hodnotu amplitudy jednotlivých vzorků vyhodnocených pomocí LumiCycle Analysis Software. Hodnoty ve sloupci ukazují průměr amplitudy z 5 hodnot  $\pm$  SD.

(C) Porovnání průměrné periody mezi skupinami s *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA. Pro porovnání byl použit nepárový *t* test, rozdíl nebyl signifikantní,  $P = 0,1967$ . Černé body vyznačují průměrnou periodu jednotlivých vzorků vyhodnocených pomocí LumiCycle Analysis Software. Hodnoty ve sloupci ukazují průměr periody z 5 hodnot  $\pm$  SD.

## 6. DISKUSE

Metylace m<sup>6</sup>A je nejhojnější modifikace na vnitřní oblasti mRNA (Roundtree et al., 2017a). Metylace je prováděna metylázami METTL3 a METTL14 (Bokar et al., 1997; Liu et al., 2014) a zpětně odstraňována demethylázami FTO (Jia et al., 2011) a ALKBH5 (Zheng et al., 2013). Studie z posledních let ukazují na vzájemný vztah metylace m<sup>6</sup>A a cirkadiálního systému (Fustin et al., 2013, 2018; Wang et al., 2015b; Zhong et al., 2018). Transkripty hodinových genů, které zajišťují molekulární mechanismus cirkadiálních hodin (Cox & Takahashi, 2019) jsou cílem m<sup>6</sup>A metylace (Fustin et al., 2013) a inhibice m<sup>6</sup>A metylace, metylázy METTL3 či demethylázy FTO má vliv na délku cirkadiální periody (Fustin et al., 2013; Wang et al., 2015a; Filipovská et al., 2024). Vliv demethylázy ALKBH5 na expresi hodinových genů a délku cirkadiální periody však není prozkoumán.

V našem experimentu jsme zkoumali vliv inhibice ALKBH5 na expresi genů v SCN potkanů a PER2::LUC myši. Úspěšně jsme transfekovali primární buněčnou kulturu z potkaních SCN *Alkbh5* siRNA. Úspěšná transfekce byla potvrzena signifikantním snížením mesoru expresního profilu genu *Alkbh5*. Ze vzorků odebíraných každé 4 hodiny byla následně pomocí izolace RNA a kvantitativní RT-PCR měřena exprese genů *Per2*, *Bmal1*, *Nr1d1*, *Socs3*, *Stat3*, *Gfap* a *Fto*.

Hodinový gen *Per2* má důležitou roli v regulaci cirkadiální periody (Wilkins et al., 2007). Naše výsledky ukázaly, že inhibice ALKBH5 způsobila signifikantní snížení mesoru rytmu exprese hodinového genu *Per2* v SCN potkana. Vliv inhibice ALKBH5 na expresi *Per2* v SCN zatím nebyl studován. Naše výsledky lze však porovnat se studii sledující vliv demethylázy FTO, metylázy METTL3 a inhibice celkové metylace m<sup>6</sup>A. Předchozí studie z naší laboratoře ukázala, že inhibice m<sup>6</sup>A demethylázy FTO v buňkách SCN potkanů vedla taktéž k snížení mesoru rytmu *Per2* (Filipovská et al., 2024). Inhibice m<sup>6</sup>A metylace pomocí DAA (3-deazaadenosin) v lidských U2OS buňkách vedla ke stabilizaci *Per2* mRNA (Fustin et al., 2013). DAA inhibuje metylaci RNA, a to zejména m<sup>6</sup>A metylaci (Backlund et al., 1986). Naše výsledky tedy naznačují snížení stability *Per2* mRNA v důsledku inhibice demethylázy ALKBH5 a zvýšení m<sup>6</sup>A metylace v SCN.

V expresi genu *Per2* nebyl potvrzen rytmus kosinorovou analýzou u skupiny s transfekovanou ctrl siRNA, nebylo tedy možné srovnat amplitudu a akrofázi mezi skupinami.



Ačkoli jednotlivé body na ose přibližně odpovídají sinusoidní křivce, v bodech CT16 a CT20 jsou velké odchylky, což může být příčinou nepotvrzení cirkadiálního rytmu.

Vliv inhibice ALKBH5 na rytmus v expresi genu *Per2* jsme sledovali i v primární buněčné kultuře z SCN z PER2::LUC myši za pomoci luminometru LumiCycle. Porovnávali jsme amplitudu a periodu rytmu a nenašli jsme signifikantní rozdíl mezi skupinami transfekovanými *Alkbh5* siRNA a ctrl siRNA. Naše výsledky nesouhlasí se studií, ve které inhibice m<sup>6</sup>A metylace pomocí DAA a inhibice METTL3 vedla k prodloužení periody v embryonálních fibroblastech PER2::LUC myši a my bychom tak analogicky měli pozorovat spíše její zkrácení. Podle autorů by toto prodloužení periody mohlo být důsledkem zpoždění úprav a exportu *Per2* mRNA z jádra po inhibici METTL3 (Fustin et al., 2013). Efekt m<sup>6</sup>A metylace na export mRNA byl potvrzen u HeLa buněk s vyřazeným *Alkbh5* genem, kdy ale naopak došlo k zrychlenému transportu z jádra (Zheng et al., 2013). Mechanismus působení m<sup>6</sup>A metylace na délku cirkadiální periody tedy není plně objasněn. Autoři Fustin et al. (2018) ukázali, že inhibice metylace m<sup>6</sup>A vede k zvýšení translace dvou sestříhových variant CK1δ kinázy, která patří také mezi hodinové geny a ovlivňuje délku cirkadiální periody. Ve své studii identifikovali dvě isoformy CK1δ kinázy; v oblasti SCN převažuje isoforma CK1δ1, která podporuje degradaci proteinu PER2 a zvýšení její exprese v embryonálních fibroblastech PER2::LUC myši vede ke zkrácení cirkadiální periody (Fustin et al., 2018). V experimentech s buněčnými kulturami se ukázalo, že CK1δ2 stabilizuje PER2 tím, že zvyšuje jeho fosforylaci, což prodlužuje jeho poločas života a přispívá k prodloužení cirkadiální periody (Narasimamurthy et al., 2018). Ačkoliv in vitro experimenty naznačují, že CK1δ1 a CK1δ2 regulují cirkadiální rytmy antagonisticky, CK1δ1 urychluje a CK1δ2 zpomaluje cirkadiální hodiny, zdá se, že obě isoformy mají odlišnou tkáňovou distribuci a funkce CK1δ2 přímo v SCN nebyla zatím testována.

Přestože v naší studii nevidíme rozdíl v amplitudě a periodě rytmu exprese *Per2* v buňkách SCN, je nutno podotknout, že zejména mezi hodnotami průměrných period jednotlivých vzorků byly značné odchylky. Z pěti vzorků transfekovaných *Alkbh5* siRNA měl pouze jeden vyšší periodu než kontrolní vzorky. Nelze tedy vyloučit možné zkrácení cirkadiální periody inhibicí ALKBH5. Vliv ALKBH5 na cirkadiální periodu by měl být předmětem dalšího výzkumu a bylo by vhodné přihlédnout k možné tkáňové specifitě.

Hodinové geny *Bmall* a *Nr1d1* také obsahují místa pro m<sup>6</sup>A metylaci mRNA (Fustin et al., 2013). Předchozí studie ukázaly vliv m<sup>6</sup>A metylace na úpravu a export *Bmall* mRNA z jádra. Zpoždění úprav a exportu *Bmall* mRNA bylo důsledkem inhibice m<sup>6</sup>A metylace v

embryonálních fibroblastech PER2::LUC myši (Fustin et al., 2013) a také delece metylázy METTL3 v jaterních buňkách myši (Barajas et al., 2022). Inhibice m<sup>6</sup>A metylace také vedla k stabilizaci *Bmall* mRNA a *Nr1d1* mRNA v embryonálních fibroblastech PER2::LUC myši (Fustin et al., 2013). Delece metylázy METTL3 v jaterních buňkách myši vedla k snížení exprese *Nr1d1* (Barajas et al., 2022). V předchozí studii z naší laboratoře nedošlo k signifikantním změnám v expresi *Bmall* ani *Nr1d1* po inhibici demethylázy FTO v SCN potkanů (Filipovská et al., 2024). Efekt inhibice ALKBH5 na expresi *Bmall* a *Nr1d1* však dosud studován nebyl. V našich experimentech došlo po inhibici demethylázy ALKBH5 k zvýšení exprese genu *Bmall*. Změna v amplitudě ani v akrofázi rytmu v expresi nenastala. U genu *Nr1d1* nedošlo ke změně množství exprese, změně amplitudy ani akrofáze.

ALKBH5 vykazuje efekt v nádorových onemocněních a ukazuje se, že by v budoucnu mohla být cílem protinádorové terapie. Vyšší exprese *Alkbh5* například koreluje s vyšší šancí na přežití pacientů s osteosarkomem (Yang et al., 2022) a pacientů s rakovinou pankreatu (Cho et al., 2018). V našich experimentech jsme zkoumali vliv inhibice ALKBH5 na expresi *Socs3* a *Stat3* v buňkách SCN potkana. SOCS3 je negativní regulátor STAT3 dráhy (Nicholson et al., 2000), která je aktivována fosforylací proteinu STAT3 Janus kinázami indukovanými cytokiny (Buettner et al., 2002). Fosforylovaný STAT3 protein dimerizuje a translokuje do jádra, kde reguluje genovou transkripci a konstitutivní aktivace STAT3 vede k nádorové transformaci a inhibuje apoptózu buněk (Bromberg et al., 1999).

Naše experimenty ukázaly, že inhibice ALKBH5 způsobuje zvýšení exprese genu *Socs3* v SCN potkana. Předchozí studie objevili místa pro m<sup>6</sup>A metylaci na *Socs3* mRNA a vliv m<sup>6</sup>A metylace na expresi *Socs3* (Hu et al., 2023; Yang et al., 2022). Zvýšení exprese metylázy METTL3 vedlo k vyšší m<sup>6</sup>A metylaci *Socs3* mRNA a k snížení její stability v jaterních nádorových kmenových buňkách (Hu et al., 2023). V další studii byla zvýšená exprese *Socs3* v lidských buňkách z osteosarkomu a v U2OS buňkách způsobena zvýšením exprese *Alkbh5*. Tato studie objevila, že m<sup>6</sup>A metylovaná *Socs3* mRNA je rozpoznávána proteinem YTHDF2, který podporuje degradaci *Socs3* mRNA v lidských buňkách osteosarkomu (Yang et al., 2022). Bylo ukázáno, že zvýšení exprese *Alkbh5* tedy stabilizuje *Socs3* mRNA, čímž je utlumena STAT3 dráha, což vede k apoptóze a k inhibici buněčné proliferace osteosarkomu. Efekt SOCS3 na STAT3 dráhu byl dále potvrzen tím, že v buňkách osteosarkomu se zvýšenou expresí *Alkbh5* byl inhibován SOCS3, což vedlo k zvýšení exprese fosforylovaného STAT3 a k buněčné proliferaci (Yang et al., 2022). Naše výsledky jsou tedy v rozporu s těmito studiemi, což může poukazovat na případnou tkáňovou a druhovou specifitu vlivu m<sup>6</sup>A metylace na expresi *Socs3*.

Navíc naše experimenty nebyly prováděny na nádorových buňkách jako uvedené studie. Budoucí studie by měly ověřit účinky m<sup>6</sup>A metylace na expresi *Socs3* v neuronálních buněčných liniích.

Efekt ALKBH5 se liší u různých typů nádorů. V kmenových buňkách glioblastomu došlo po inhibici ALKBH5 k utlumení buněčné proliferace (Zhang et al., 2017). ALKBH5 demetyluje transkripční faktor FOXM1, což vede k zvýšení jeho exprese (Zhang et al., 2017). FOXM1 vykazuje zvýšenou expresi v glioblastomu a úroveň jeho exprese koreluje se stupněm závažnosti glioblastomu (Liu et al., 2006). FOXM1 také aktivuje dráhu STAT3, což je jeden z mechanismů, kterým FOXM1 přispívá k nádorovým vlastnostem buněk. Inhibice FOXM1 v glioblastomových kmenových buňkách vedla k snížení fosforylace STAT3, ale také k snížení jeho exprese. Delece *FoxM1* v primárních kmenových neurálních buňkách myši vedla k snížení exprese *Stat3*. Vysoká exprese *FoxM1* koreluje s vyšší expresí *Stat3* (Gong et al., 2015). Transkripční faktor FOXM1 však vykazuje expresi pouze v embryonálních a aktivně proliferujících buňkách (Korver et al., 1997). V našem experimentu vedla inhibice ALKBH5 k zvýšení exprese genu *Stat3* v SCN potkana. Mechanismus tohoto ovlivnění by měl být předmětem dalšího výzkumu.

Dalším studovaným genem v našich experimentech byl gen pro protein GFAP (gliální fibrilární kyselý protein). GFAP je protein intermediálních filament a specifický biomarker astrocytů v centrální nervové soustavě. V reakci na poškození nervové soustavy dochází k reakci astrocytů a jejich proliferaci, tzv. astrogliosisy, a také k zvýšení exprese GFAP (Eng & Ghirnikar, 1994). Naše experimenty ukázaly signifikantní zvýšení exprese genu *Gfap* v SCN potkanů po inhibici ALKBH5. Vliv m<sup>6</sup>A metylace na expresi *Gfap* byla studována již dříve. Inhibice metyláz METTL3 nebo METTL14 vedly k poklesu celkové m<sup>6</sup>A metylace mRNA a k snížení exprese *Gfap* v glioblastomových kmenových buňkách (Cui et al., 2017). V myším modelu zranění míchy došlo k zvýšení m<sup>6</sup>A metylace a zvýšení exprese METTL3 v astrocytech. Delece METTL3 v těchto astrocytech in vitro pak vedla k potlačení astrogliosisy a regeneraci astrocytů a také utlumila zvýšení exprese *Gfap* v reakci na poškození (Ge et al., 2023). Přímý vliv ALKBH5 na expresi *Gfap* však předtím studován nebyl.

Jelikož GFAP je specifický biomarker astrocytů, naše experimenty jsou v rozporu se studií, která za pomoci protilátky k ALKBH5 a GFAP a fluorescentní imunocytochemie a imunofluorescence ukázala téměř nulovou expresi ALKBH5 v astrocytech v hipokampu a v kortexu myši (Du et al., 2020). Výskyt ALKBH5 v astrocytech však potvrdila studie, ve které v reakci na sociální stres došlo k zvýšení exprese ALKBH5 v astrocytech mediálního

prefrontálního kortexu myši. Oproti neuronům a endoteliálním buňkám byla zvýšená exprese ALKBH5 v reakci na stres v astrocytech citlivější (Guo et al., 2024). Již dříve bylo ukázáno, že astrocyty jsou obzvláště citlivé na stresovou odpověď. Stres ovlivňuje morfologii a funkci astrocytů a vede k nedostatečnému transportu energetických substrátů k neuronům a narušení dlouhodobé potenciace (Murphy-Royal et al., 2020). Guo et al. (2024) dále poukázali na roli astrocytální ALKBH5 v klinické depresi. ALKBH5 vykazuje vyšší koncentraci v krvi u pacientů s depresí v porovnání se zdravými jedinci. Navíc analýzou předešlých datasetů byla ukázána zvýšená exprese ALKBH5 v dorsolaterálním prefrontálním kortexu. Selektivní delece *Alkbh5* v astrocytech vedla k antidepresivním účinkům u myši a naopak zvýšená exprese ALKBH5 v mediálním prefrontálním kortexu myši vedla k depresivnímu chování. Mediální prefrontální kortex myši s delecí *Alkbh5* v astrocytech vykazoval celkovou zvýšenou m<sup>6</sup>A metylaci a také zvýšenou m<sup>6</sup>A metylaci glutamatergního transportéru 1, což vedlo k jeho zvýšené expresi a zvýšenému vychytávání glutamátu. U myši s delecí *Alkbh5* vystavené sociálnímu stresu došlo k menší změně v morfologii dendritů, vápníkové aktivitě a glutamatergní transmise oproti kontrolním myším vystaveným témuž stresu. ALKBH5 v astrocytech se tedy do budoucna nabízí jako možný terapeutický cíl u klinické deprese (Guo et al., 2024).

V naší studii jsme dále otestovali vliv inhibice ALKBH5 na expresi druhé m<sup>6</sup>A demethylázy FTO v SCN potkana. Případná změna v expresi genu *Fto* by mohla ukazovat na možný buněčný mechanismus kompenzace chybějící demethylázy ALKBH5. Kompenzační mechanismus chybějící m<sup>6</sup>A metylace ukázali Fustin et. al (2013). V této studii došlo po aplikaci DAA do lidských U2OS buněk ke změně exprese genů souvisejících s úpravami RNA. Mimo jiné došlo také k zvýšení exprese ALKBH5. Naše experimenty však změnu v expresi m<sup>6</sup>A demethylázy FTO po inhibici ALKBH5 nepotvrdily.

## 7. ZÁVĚR

Tato práce jako první ukázala, jaký efekt má inhibice ALKBH5 m<sup>6</sup>A demetylázy na expresi genů v SCN potkanů a PER2::LUC myši. Inhibice ALKBH5 vedla k snížení exprese hodinového genu *Per2* a zvýšení exprese *Bmal1* v SCN potkanů. Na expresi hodinového genu *Nr1d1* vliv neměla. U genů *Bmal1* a *Nr1d1* nedošlo ke změně amplitudy ani akrofáze rytmu exprese. U genu *Per2* však nebylo možné amplitudu a akrofáze porovnat, jelikož kontrolní skupina nevykazovala dostatečnou rytmicitu v expresi *Per2*. V buňkách SCN PER2::LUC myši nedošlo po inhibici ALKBH5 ke změně amplitudy ani periody rytmu v expresi *Per2*. Tyto výsledky, zejména v expresi genu *Per2* by však bylo vhodné do budoucna ověřit, zejména kvůli značným odchylkám mezi jednotlivými vzorky v našich experimentech. Naše práce však podporuje hypotézu, že m<sup>6</sup>A metylace má vliv na expresi hodinových genů v buňkách SCN. Inhibice ALKBH5 také vedla k zvýšení exprese *Soc3* a *Stat3*, což jsou geny spojené s nádorovým bujením a podporuje tedy předchozí studie poukazující na roli ALKBH5 u různých typů nádorových onemocnění. Inhibice ALKBH5 způsobila také zvýšení exprese astrocytálního markeru *Gfap* a tím naznačuje výskyt ALKBH5 v astrocytech v SCN. Jako poslední byl sledován gen druhé m<sup>6</sup>A demetylázy *Fto*, který po inhibici ALKBH5 nevykazoval změnu v expresi.

## 8. LITERATURA

- Agostinelli, F., Ceglia, N., Shahbaba, B., Sassone-Corsi, P., & Baldi, P. (2016). What time is it? Deep learning approaches for circadian rhythms. *Bioinformatics*, *32*(12), i8–i17.
- Aguilo, F., Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., Lee, D. F., Chen, C. H., Rengasamy, M., Andino, B., Jahouh, F., Roman, A., Krig, S. R., Wang, R., Zhang, W., Wohlschlegel, J. A., Wang, J., & Walsh, M. J. (2015). Coordination of m6A mRNA Methylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, *17*(6), 689–704.
- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H., & Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, *12*(7), 540–550.
- Backlund, P. S., Carotti, D., & Cantoni, G. L. (1986). Effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on RNA methylation and synthesis. *European Journal of Biochemistry*, *160*(2), 245–251.
- Barajas, J. M., Lin, C. H., Sun, H. L., Alencastro, F., Zhu, A. C., Aljuhani, M., Navari, L., Yilmaz, S. A., Yu, L., Corps, K., He, C., Duncan, A. W., & Ghoshal, K. (2022). METTL3 Regulates Liver Homeostasis, Hepatocyte Ploidy, and Circadian Rhythm–Controlled Gene Expression in Mice. *The American Journal of Pathology*, *192*(1), 56–71.
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., & Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, *3*(11), 1233–1247.
- Bos, N. P. A., & Mirmiran, M. (1990). Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, *511*(1), 158–162.
- Bozek, K., Relógio, A., Kielbasa, S. M., Heine, M., Dame, C., Kramer, A., & Herzog, H. (2009). Regulation of Clock-Controlled Genes in Mammals. *PLoS One*, *4*(3), e4882.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Deyuan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell, J. E. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, *98*(3), 295–303.
- \*Buettner, R., Mora, L. B., & Jove, R. (2002). Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention1. *Clinical Cancer Research*, *8*(4), 945–954.
- Cho, S. H., Ha, M., Cho, Y. H., Ryu, J. H., Yang, K., Lee, K. H., Han, M.-E., Oh, S.-O., & Kim, Y. H. (2018). ALKBH5 gene is a novel biomarker that predicts the prognosis of pancreatic cancer: A retrospective multicohort study. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, *22*(4), 305–309.
- Choudhry, Z., Sengupta, S. M., Grizenko, N., Thakur, G. A., Fortier, M. E., Schmitz, N., & Joobor, R. (2013). Association between obesity-related gene FTO and ADHD. *Obesity (Silver Spring)*, *21*(12), E738–44.
- \*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.

- Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Lu, Z., Huang, Y., Yang, C. G., Riggs, A. D., He, C., & Shi, Y. (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Reports*, *18*(11), 2622–2634.
- Deng, X., Chen, K., Luo, G. Z., Weng, X., Ji, Q., Zhou, T., & He, C. (2015). Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Research*, *43*(13), 6557-6567.
- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *71*(10), 3971–3975.
- \*Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, *72*, 517–549.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Körner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M. S., Kiess, W., Vatin, V., Lecoœur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougnères, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chèvre, J.-C., Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*, *39*(6), 724–726.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, *485*(7397), 201–206.
- Du, T., Li, G., Yang, J., & Ma, K. (2020). RNA demethylase Alkbh5 is widely expressed in neurons and decreased during brain development. *Brain Research Bulletin*, *163*, 150–159.
- \*Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, *4*(3), 229–237.
- Etchegaray, J.-P., Machida, K. K., Noton, E., Constance, C. M., Dallmann, R., Di Napoli, M. N., DeBruyne, J. P., Lambert, C. M., Yu, E. A., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2009). Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(14), 3853–3866.
- Filipovská, E., Čočková, Z., Černá, B., Kubišťová, A., Spišská, V., Telenský, P., & Bendová, Z. (2024). The role of N6-methyladenosine RNA methylation in the crosstalk of circadian clock and neuroinflammation in rodent suprachiasmatic nuclei. *European Journal of Neuroscience*. 1-11
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.-R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J. F., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N. A., Doney, A. S. F., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, *316*(5826), 889-894.
- Fustin, J. M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M. S., Kakeya, H., Manabe, I., & Okamura, H. (2013). XRNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, *155*(4), 793-806.

- Fustin, J. M., Kojima, R., Itoh, K., Chang, H. Y., Shiqi, Y., Zhuang, B., Oji, A., Gibo, S., Narasimamurthy, R., Virshup, D., Kurosawa, G., Doi, M., Manabe, I., Ishihama, Y., Ikawa, M., & Okamura, H. (2018). Two Ck1 $\delta$  transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(23), 5980–5985.
- \*Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(2), 139–148.
- Ge, X., Ye, W., Zhu, Y., Cui, M., Zhou, J., Xiao, C., Jiang, D., Tang, P., Wang, J., Wang, Z., Ji, C., Zhou, X., Cao, X., Liu, W., & Cai, W. (2023). USP1/UAF1-Stabilized METTL3 Promotes Reactive Astroglialosis and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury through m6A Modification of YAP1 mRNA. *Journal of Neuroscience*, *43*(9), 1456–1474.
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Yeo, G. S. H., McDonough, M. A., Cunliffe, S., McNeill, L. A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A. P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I. S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C. P., Ashcroft, F. M., O'Rahilly, S., Schofield, C. J. (2007). The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science*, *318*(5855), 1469-1472.
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A. F., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Ben-Haim, M. S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D. A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., Zerbib, M., Maza, I., Rechavi, Y., Massarwa, R., Hanna, S., Amit, I., Levanon, E. Y., Amariglio, N., Stern-Ginossar, N., Novershtern, N., Rechavi, G., Hanna, J. H. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, *347*(6225), 1002–1006.
- Gibo, S., & Kurosawa, G. (2020). Theoretical study on the regulation of circadian rhythms by RNA methylation. *Journal of Theoretical Biology*, *490*, 110140.
- Gong, A. H., Wei, P., Zhang, S., Yao, J., Yuan, Y., Zhou, A. D., Lang, F. F., Heimberger, A. B., Rao, G., & Huang, S. (2015). FoxM1 Drives a Feed-forward STAT3-activation Signaling Loop that Promotes the Self-renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research*, *75*(11), 2337-2348.
- Guo, F., Fan, J., Liu, J. M., Kong, P. L., Ren, J., Mo, J. W., Lu, C. L., Zhong, Q. L., Chen, L. Y., Jiang, H. T., Zhang, C., Wen, Y. L., Gu, T. T., Li, S. J., Fang, Y. Y., Pan, B. X., Gao, T. M., & Cao, X. (2024). Astrocytic ALKBH5 in stress response contributes to depressive-like behaviors in mice. *Nature Communications*, *15*(1), 1–19.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, *343*(6258), 536–540.
- \*Herzog, E. D., Hermansteyne, T., Smyllie, N. J., & Hastings, M. H. (2017). Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(1), a027706.
- Hess, M. E., Hess, S., Meyer, K. D., Verhagen, L. A. W., Koch, L., Brönneke, H. S., Dietrich, M. O., Jordan, S. D., Saletore, Y., Elemento, O., Belgardt, B. F., Franz, T., Horvath, T. L., Rüter, U., Jaffrey, S. R., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2013). The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1042–1048.



- Heyde, I., & Oster, H. (2019). Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13.
- Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J., Cheng, Y., Luo, G., Dai, Q., Liu, M., Guo, X., Sha, J., Shen, B., & He, C. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, *27*(9), 1115–1127.
- Hu, J., Chen, K., Hong, F., Gao, G., Dai, X., & Yin, H. (2023). METTL3 facilitates stemness properties and tumorigenicity of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma through the SOCS3/JAK2/STAT3 signaling pathway. *Cancer Gene Therapy* *2023 31:2*, *31*(2), 228–236.  
<https://doi.org/10.1038/s41417-023-00697-w>
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, *7*(12), 885–887.
- \*Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021). The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 74.
- Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, *338*(6105), 349–354.
- \*Kondratova, A. A., & Kondratov, R. V. (2012). The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(5), 325–335.
- Korver, W., Roose, J., & Clevers, H. (1997). The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Research*, *25*(9), 1715–1719.
- Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., Di Tacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., & Evans, R. M. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, *326*(5951), 437–440.
- Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S., & Lee, C. (2009). Essential roles of CKI $\delta$  and CKI $\epsilon$  in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21359–21364
- Liu, H., Begik, O., Lucas, M. C., Ramirez, J. M., Mason, C. E., Wiener, D., Schwartz, S., Mattick, J. S., Smith, M. A., & Novoa, E. M. (2019). Accurate detection of m6A RNA modifications in native RNA sequences. *Nature Communications*, *10*(1), 4079.
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, *10*(2), 93–95.
- Liu, J., Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., & He, C. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, *4*(1), 10.

- Liu, M., Dai, B., Kang, S. H., Ban, K., Huang, F. J., Lang, F. F., Aldape, K. D., Xie, T. X., Pelloski, C. E., Xie, K., Sawaya, R., & Huang, S. (2006). FoxM1B Is Overexpressed in Human Glioblastomas and Critically Regulates the Tumorigenicity of Glioma Cells. *Cancer Research*, *66*(7), 3593–3602.
- 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.
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons. *Cell*, *149*(7), 1635–1646.
- Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Chelliah, Y., Sandate, C. R., Hura, G. L., Schneidman-Duhovny, D., Tripathi, S. M., Takahashi, J. S., & Partch, C. L. (2017). Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(7), 1560–1565.
- \*Moore, R. Y. (1996). Chapter 8 Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Progress in Brain Research*, *111*, 103–119.
- \*Moore, R. Y. (2013). The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timing System. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *119*, 1–28.
- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *146*(1), 1–14.
- Murphy-Royal, C., Johnston, A. D., Boyce, A. K. J., Diaz-Castro, B., Institoris, A., Peringod, G., Zhang, O., Stout, R. F., Spray, D. C., Thompson, R. J., Khakh, B. S., Bains, J. S., & Gordon, G. R. (2020). Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity. *Nature Communications*, *11*(1), 1–18.
- Narasimamurthy, R., Hunt, S. R., Lu, Y., Fustin, J. M., Okamura, H., Partch, C. L., Forger, D. B., Kim, J. K., & Virshup, D. M. (2018). CK1 $\delta$ /e protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(23), 5986–5991.
- Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., & Baca, M. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6493–6498.
- Parsons, R., Parsons, R., Garner, N., Oster, H., & Rawashdeh, O. (2020). CircaCompare: a method to estimate and statistically support differences in mesor, amplitude and phase, between circadian rhythms. *Bioinformatics*, *36*(4), 1208–1212.
- Perry, R. P., & Kelley, D. E. (1974). Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell*, *1*(1), 37–42.
- Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y. S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X. M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W. P., Zhu, X. F., Cheng, T., Zhao, Y-L., Wang, X., Danielsen, J. M. R., Liu, F., Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, *24*(2), 177–189.

- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251–260.
- 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.
- \*Robinson, M., Shah, P., Cui, Y. H., & He, Y. Y. (2019). The Role of Dynamic m6A RNA Methylation in Photobiology. *Photochemistry and Photobiology*, *95*(1), 95–104.
- \*Rosenwasser, A. M., & Adler, N. T. (1986). Structure and function in circadian timing systems: Evidence for multiple coupled circadian oscillators. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *10*(4), 431–448.
- \*Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., & He, C. (2017a). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, *169*(7), 1187–1200.
- Roundtree, I. A., Luo, G. Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., He, E., Shen, B., & He, C. (2017b). YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *ELife*, *6*, e31311.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, *43*(4), 527–537.
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orrú, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G. B., Fink, A. A., Weder, A. B., Cooper, R. S., Galan, P., Chakravarti, A., Schlessinger, D., Cao, A., Lakatta, E., Abecasis, G. R. (2007). Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genetics*, *3*(7), 1200–1210.
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., Liu, C., & He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, *27*(3), 315–328.
- Svobodova, I., Bhattaracharya, A., Ivetic, M., Bendova, Z., & Zemkova, H. (2018). Circadian ATP release in organotypic cultures of the rat suprachiasmatic nucleus is dependent on P2X7 and P2Y receptors. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(192).
- Tang, B., Yang, Y., Kang, M., Wang, Y., Wang, Y., Bi, Y., He, S., & Shimamoto, F. (2020). M6A demethylase ALKBH5 inhibits pancreatic cancer tumorigenesis by decreasing WIF-1 RNA methylation and mediating Wnt signaling. *Molecular Cancer*, *19*(1), 1–15.
- Theler, D., Dominguez, C., Blatter, M., Boudet, J., & Allain, F. H. T. (2014). Solution structure of the YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA. *Nucleic Acids Research*, *42*(22), 13911–13919.
- Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., & Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics*, *37*(2), 187–192.
- Wang, C. Y., Shie, S. Sen, Hsieh, I. C., Tsai, M. L., & Wen, M. S. (2015a). FTO modulates circadian rhythms and inhibits the CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *464*(3), 826–832.

- Wang, C. Y., Yeh, J. K., Shie, S. Sen, Hsieh, I. C., & Wen, M. S. (2015b). Circadian rhythm of RNA N6-methyladenosine and the role of cryptochrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *465*(1), 88–94.
- \*Wang, J., Wang, J., Gu, Q., Ma, Y., Yang, Y., Zhu, J., & Zhang, Q. (2020). The biological function of m6A demethylase ALKBH5 and its role in human disease. *Cancer Cell International*, *20*(1), 1–7.
- Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Molecular Cell*, *63*(2), 306–317.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., & He, C. (2013). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, *505*(7481), 117–120.
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., & He, C. (2015c). N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, *161*(6), 1388–1399.
- Watanabe, K., Koibuchi, N., Ohtake, H., & Yamaoka, S. (1993). Circadian rhythms of vasopressin release in primary cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, *624*(1–2), 115–120.
- Wei, C.-M., Gershowitz, A., & Moss, B. (1975). Methylated Nucleotides Block 5' Terminus of HeLa Cell Messenger RNA. *Cell*, *4*(4), 379–386
- Wilkins, A. K., Barton, P. I., & Tidor, B. (2007). The Per2 Negative Feedback Loop Sets the Period in the Mammalian Circadian Clock Mechanism. *PLOS Computational Biology*, *3*(12), e242.
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F., Sun, H. Y., Li, A., Ping, X. L., Lai, W. Y., Wang, X., Ma, H. L., Huang, C. M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G. Bin, Wang, H. L., Zhou, Q., Wang, X. J., Zhao, Y.-L., Yang, Y. G. (2016). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *61*(4), 507–519.
- Xu, C., Wang, X., Liu, K., Roundtree, I. A., Tempel, W., Li, Y., Lu, Z., He, C., & Min, J. (2014). Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nature Chemical Biology*, *10*(11), 927–929.
- Yang, Z., Cai, Z., Yang, C., Luo, Z., & Bao, X. (2022). ALKBH5 regulates STAT3 activity to affect the proliferation and tumorigenicity of osteosarcoma via an m6A-YTHDF2-dependent manner. *EBioMedicine*, *80*, 104019.
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepack, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5339–5346.
- Zhang, J., Guo, S., Piao, H. yan, Wang, Y., Wu, Y., Meng, X. yu, Yang, D., Zheng, Z. chao, & Zhao, Y. (2019). ALKBH5 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by decreasing methylation of the lncRNA NEAT1. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *75*(3), 379–389.
- Zhang, S., Zhao, B. S., Zhou, A., Lin, K., Zheng, S., Lu, Z., Chen, Y., Sulman, E. P., Xie, K., Bögl, O., Majumder, S., He, C., & Huang, S. (2017). m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell*, *31*(4), 591–606.

- \*Zhao, B. S., Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 18:1, 18(1), 31–42.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y. J., Ping, X. L., Chen, Y. S., Wang, W. J., Jin, K. X., Wang, X., Huang, C. M., Fu, Y., Ge, X. M., Song, S. H., Jeong, H. S., Yanagisawa, H., Niu, Y., Jia, G.-F., Wu, W., Tong, W.-M., Okamoto, A., He, C., Danielsen, J. M. R., Yang, X.-J. W., Yang, Y.-G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Research*, 24(12), 1403-1419.
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W. M., Tong, W. M., Wang, X. J., Bogdan, F., Furu, K., Fu, Y., Jia, G., Zhao, X., Liu, J., Krokan, H. E., Klungland, A., Yang, Y.-G., He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18-29.
- Zhong, X., Yu, J., Frazier, K., Weng, X., Li, Y., Cham, C. M., Dolan, K., Zhu, X., Hubert, N., Tao, Y., Lin, F., Martinez-Guryn, K., Huang, Y., Wang, T., Liu, J., He, C., Chang, E. B., & Leone, V. (2018). Circadian Clock Regulation of Hepatic Lipid Metabolism by Modulation of m6A mRNA Methylation. *Cell Reports*, 25(7), 1816-1828.e4.