

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Eva Filipovská**

**Vliv endokanabinoidního systému na světelnou synchronizaci  
cirkadiánního systému potkana**

**The effect of endocannabinoid system on light entrainment of rat  
circadian system**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 13. 8. 2018

Podpis .....

**Poděkování:**

Mé poděkování patří především vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za velmi ochotný a vstřícný přístup při vedené této práce a motivaci k dalšímu pokračování ve vědecké činnosti. Dále bych chtěla poděkovat všem členkám laboratoře biorytmů, zejména Mgr. Dominice Pačesové a Mgr. Simoně Moravcové za trpělivost při zaučování v laboratoři a Mgr. Haně Kyclerové a Mgr. Veronice Spišské za pomoc při nočních experimentech. Děkuji také své rodině a blízkým za podporu.

## **Abstrakt**

Cirkadiánní systém savců je řízen suprachiasmatickými jádry v hypotalamu. Tento systém je synchronizován se světelnými podmínkami pomocí fázových posunů, které nastávají po expozici světlu v subjektivní noci. Nedávné výzkumy ukázaly, že aktivace receptorů endokanabinoidního systému potlačuje světlem indukované fázové posuny a ovlivňuje tak schopnost cirkadiánního systému ke světelné synchronizaci. Tato práce má za cíl prozkoumat tento vliv na behaviorální úrovni a na úrovni světloreaktivních buněčných procesů v neuronech suprachiasmatických jader. Naše výsledky ukazují, že aktivace kanabinoidního systému pomocí agonisty CB1 receptorů moduluje světlem indukovanou fosforylaci extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2 (ERK1/2) a expresi proteinu c-Fos v neuronech suprachiasmatických jader v mozku potkana, což koreluje s potlačením světelné synchronizace cirkadiánního systému pozorované na behaviorální úrovni.

**Klíčová slova:** cirkadiánní systém, suprachiasmatická jádra, světelná synchronizace, endokanabinoidní systém, CB1 receptory, extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2, ERK1/2, c-Fos

**Abstract**

Circadian system of mammals is generated in suprachiasmatic nuclei of hypothalamus. This system is synchronized with light conditions through phase shifts that occur after light exposition during the subjective night. Recent studies have shown that activation of endocannabinoid receptors attenuates the light-induced phase shifts and influences the ability of circadian system to light entrainment. The aim of this work is to examine this influence on behavioral level and on light-reactive cellular processes within the suprachiasmatic nuclei. Our results show that the activation of endocannabinoid system via CB1 receptor agonist modulates the light-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and the expression of c-Fos protein in neurons of suprachiasmatic nuclei in the rat's brain; these cellular processes correlate with the attenuation of light entrainment.

**Keywords:** circadian system, suprachiasmatic nuclei, light entrainment, endocannabinoid system, CB1 receptors, extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2, c-Fos

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Úvod	3
2. Literární přehled	3
2.1. Cirkadiánní systém	3
2.1.1. Suprachiasmatická jádra	4
2.1.2. Molekulární mechanismus	5
2.1.3. Posttranslační modifikace	6
2.1.4. Světelná synchronizace	8
2.2. Endokanabinoidní systém	11
2.2.1. Receptory	13
2.2.2. Mechanismus působení ECS	14
2.2.3. Lokalizace CB1 receptorů v CNS	18
2.2.4. Výskyt CB1 v hypotalamu a SCN	18
2.2.5. Rytmicita a cirkadiánní regulace endokanabinoidního systému	18
2.2.6. Modulace světelné synchronizace endokanabinoidním systémem	20
3. Cíle práce	21
4. Metody a vybavení	21
4.1. Laboratorní zvířata	21
4.2. Aplikace agonisty/antagonisty CB1 receptorů	22
4.3. Nahrávání lokomočního záznamu	22
4.4. Experimentální paradigma	23
4.5. Imunohistochemie	23

4.5.1. Příprava tkáně .....	23
4.5.2. Postup stanovení.....	24
4.5.3. Analýza signálu.....	25
4.6. Statistická analýza.....	25
5. Výsledky.....	26
5.1. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na fázový posun v pohybové aktivitě potkana indukovaný světelným pulsem o intenzitě 10 luxů .....	26
5.2. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na fázový posun v pohybové aktivitě potkana indukovaný světelným pulsem o intenzitě 400 luxů .....	30
5.3. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na hladiny světlem indukovaných markerů v SCN potkanů adaptovaných na nízkou intenzitu světla (10 luxů) .....	34
5.3.1. Hladiny kinázy pERK1/2 .....	34
5.3.2. Hladiny kinázy pGSK3β.....	35
5.3.3. Hladiny proteinu c-Fos .....	37
5.4. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na hladiny světlem indukovaných markerů v SCN potkanů adaptovaných na vysokou intenzitu světla (400 luxů).....	39
5.4.1. Hladiny kinázy pERK1/2 .....	39
5.4.2. Hladiny kinázy pGSK3β.....	40
6. Diskuze .....	42
6.1. Fázový posun v pohybové aktivitě.....	42
6.2. Světlem indukované markery VL SCN.....	44
6.2.1. Kináza ERK1/2 .....	44
6.2.2. Kináza GSK3β.....	47
6.2.3. Protein c-Fos .....	48
7. Závěr .....	51

8.	Literatura.....	52
----	-----------------	----



## Seznam použitých zkratek

2-AG	2-arachidonoylglycerol
AANAT	arylalkylamin N-acetyltransferáza
AVP	arginin vasopresin
BMAL1/ <i>Bmal1</i>	brain and muscle ARNT-like protein 1/gen
BSA	bovine serum albumine
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CB1, 2	cannabinoid receptor type 1, 2
CKI	kasein kináza I
CLOCK/ <i>Clock</i>	circadian locomotor output cycles kaput protein/gen
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CRY/ <i>Cry</i>	Cryptochrom protein/gen
CT	circadian time; cirkadiánní čas
DAB	diaminobenzidin
DAG	diacylglycerol
DD	dark - dark; režim tma - tma
DM SCN	dorzomediální část SCN
DMSO	dimetylsulfoxid
DSI/DSE	depolarizací indukovaná suprese inhibice/excitace
E-box	enhancer box
ECS	endokanabinoidní systém
ERK ½	kináza regulovaná extracelulárním signálem, izoformy 1 a 2
FAAH	fatty acid amide hydrolase; hydroláza amidů mastných kyselin
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná

GHT	genikulohypotalamický trakt
GRP	gastrin-releasing peptid
GSK3 $\beta$	glykogen syntáza kináza 3 $\beta$
IGL	intergenikulární lístek talamu
iPRGC	vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky
LD	light – dark; režim světlo - tma
LTD	long-term depression
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MGL	monoacylglycerol lipáza
mGluR	metabotropní glutamátové receptory
mRNA	messenger RNA; mediátorová ribonukleová kyselina
MSI/MSE	metabotropně indukovaná suprese inhibice/excitace
NAPE	N-arachidonoylfosfatidylethanolamin
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NPY	neuropeptid Y
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PBS	phosphate buffered saline; fyziologický roztok
PER1/ <i>Per1</i>	Period 1 protein/gen
PIP2	fosfoinositolbisfosfát
PK2	prokineticin 2
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RHT	retinohypotalamický trakt
ROR element	retinoic acid-related orphan receptor response element
ROR $\alpha$	retinoic acid-related orphan receptor alpha
SCN	suprachiasmatická jádra
THC	tetrahydrocannabinol
TRPV1	vaniloidní transient receptor potential kanál typu 1
VIP	vasoaktivní intestinální polypeptid
VL SCN	ventrolaterální část SCN

# 1. Úvod

Cirkadiánní systém savců zajišťuje periodicitu fyziologických procesů v těle a jejich načasování v souladu se světelnými podmínkami. Tento systém je řízen suprachiasmatickými jádry (SCN) v hypotalamu, kde byly nalezeny složky endokanabinoidního systému, známého svými modulačními účinky synaptické aktivity. Nedávné studie uvádějí, že aktivace endokanabinoidního systému vede k potlačení cirkadiánní odpovědi na světlo. Mechanismus, jakým kanabinoidní aktivace ovlivňuje světelnou synchronizaci cirkadiánního systému, není zcela objasněn. Může zahrnovat vstup synchronizujících informací do SCN, intercelulární komunikaci mezi buňkami SCN nebo výstupní signály z SCN. Tato práce má za cíl blíže prozkoumat vztah endokanabinoidního a cirkadiánního systému a popsat vliv kanabinoidní aktivace na světlem indukované buněčné procesy v neuronech SCN potkana.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Cirkadiánní systém

Fyziologické a behaviorální pochody v živých organismech vykazují cyklické změny s periodou přibližně 24 hodin. U savců se tento cirkadiánní (= přibližně denní) rytmus projevuje v cyklu spánku a bdění, ve změnách tělesné teploty, hladin některých hormonů, v metabolických procesech a dalších fyziologických parametrech. Cirkadiánní systém je endogenní mechanismus fungující nezávisle na okolním prostředí, který organismům umožňuje načasovat jejich životní funkce na optimální denní dobu. Cyklické změny jsou generovány v oblasti mozku nazvané suprachiasmatická jádra (SCN). Jedná se o párovou strukturu uloženou nad optickým chiasmatem v oblasti hypotalamu. SCN řídí oscilace na úrovni buněk našeho těla a tím i rytmicitu fyziologických procesů (Albrecht and Eichele, 2003; Reppert and Weaver, 2002).

Buňky v SCN ale i v ostatních oblastech mozku a v periferních tkáních jsou vybaveny molekulárním mechanismem, který vykazuje cirkadiánní oscilace. Pouze v buňkách SCN ale molekulární hodiny běží nezávisle na okolní tkáni. Jednotlivé neurony SCN fungují jako autonomní oscilátory. Jejich výstupem je periodická elektrická aktivita, kterou lze pozorovat i v *in vitro* podmínkách na buněčných kulturách (Welsh et al., 1995). V případě odstranění oblasti SCN se

zvířata stanou arytmičtější (Stephan and Zucker, 1972). Transplantace SCN opět navrátí cirkadiánní rytmus, včetně periody, která byla pozorována u dárcovského živočicha (Ralph et al., 1990).

### 2.1.1. *Suprachiasmatická jádra*

SCN přijímají signály z vnějšího prostředí a podle nich upravují fázi a periodu cirkadiánních rytmů. Největší účinek na hodiny savců má světlo, ale uplatňují se i nesvětelné podněty. Dráhy přenášející informace o nesvětelných podnětech do SCN jsou genikulohypotalamický trakt (GHT) vedoucí z intergenikulárního listku talamu (IGL), který vylučuje mediátory neuropeptid Y (NPY) a kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA), a serotonergní dráha z dorzálního a mediálního rapheálního jádra v mozgovém kmeni (Dibner et al., 2010; Golombek and Rosenstein, 2010).

SCN má dvě části s odlišnou funkcí i mediátory - ventrolaterální část (VL SCN; tzv. „core“) a dorzomediální část (DM SCN; tzv. „shell“). Buňky VL SCN komunikují pomocí mediátorů VIP (vasoaktivní intestinální polypeptid) a GRP (gastrin-releasing peptid); DM SCN používá neuropeptidy AVP (arginin vasopresin) a PK2 (prokineticin 2). Většina neuropeptidů je na synapsích kolokalizována s GABA, která představuje hlavní neurotransmitter napříč neurony v SCN (Colwell, 2011; Welsh et al., 2010). Informace o světelných i nesvětelných signálech vedou do VL SCN a odtud se přenáší do DM SCN, které komunikuje s dalšími oblastmi mozku a synchronizuje jejich hodiny podle nově přijatých signálů (Moore et al., 2002). Časová informace se přenáší zejména do hypotalamických jader, přes které je regulován rytmický výlev hormonů i nervové signály a tyto výstupy pak nastavují hodiny v celém těle. Důležitou roli zde má paraventriculární jádro hypotalamu, kde SCN svými projekcemi reguluje výlev kortikotropin uvolňujícího hormonu a tím rytmický výlev kortikosteronu z kůry nadledvin a také autonomní nervový systém. Aktivací sympatiku umožňuje například rytmický výlev melatoninu z epifýzy, ale nastavuje také citlivost tkání k těmto hormonálním signálům (Buijs et al., 1999, 2003; Dibner et al., 2010; Kalsbeek et al., 2006).

Neurony SCN pěstované v buněčných kulturách vykazují rytmické oscilace s rozdílnou fází (Welsh et al., 1995). V SCN *in vivo* ale musí být navzájem synchronizovány, aby mohly vést k jednotnému výstupu. Pro synchronizaci neuronů je nezbytný VIP, jehož absence vede ke vzájemné desynchronizaci jednotlivých neuronů (Aton et al., 2005). Důležitou roli v komunikaci mezi neurony má také GABA. Aplikace GABA vede k synchronizaci neuronů SCN v buněčných

kulturách působením na GABA-A receptory (Liu and Reppert, 2000). Antagonista GABA-A receptorů disociuje fáze oscilací mezi VL a DM SCN (Albus et al., 2005). GABA, působící běžně jako inhibiční neurotransmitter, může mít na některé neurony SCN excitační efekt. Excitační působení bylo pozorováno zejména na DM SCN v průběhu noci (Choi et al., 2008; De Jeu and Pennartz, 2002). Zablokování excitačního působení GABA vedlo k inhibici světlem indukovaného fázového posunu v první polovině subjektivní noci, má tedy pravděpodobně důležitou roli ve světelné synchronizaci (McNeill et al., 2018).

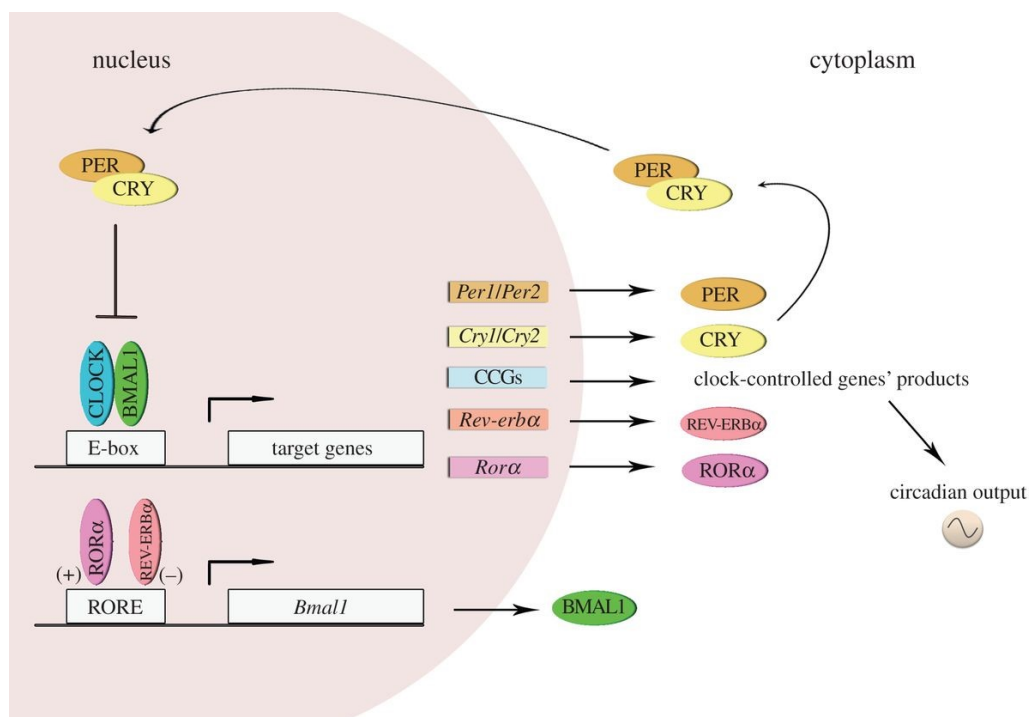
### 2.1.2. Molekulární mechanismus

Molekulární mechanismus cirkadiálních rytmů zajišťují smyčky tzv. hodinových genů a jejich proteinů, které vzájemně řídí svoji expresi a degradaci během 24 hodin (obr. 1). Hlavní zpětnovazebnou smyčku tvoří u savců geny *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput), *Bmal1* (brain and muscle ARNT-like protein 1), *Per1*, 2, 3 (Period 1, 2, 3) a *Cry1*, 2 (Cryptochrom 1, 2). Jejich proteiny fungují jako transkripční faktory, které působí pozitivní nebo negativní zpětnou vazbou na expresi dalších hodinových genů (Reppert and Weaver, 2002). Proteiny CLOCK a BMAL1 společně vytváří heterodimer, který se váže do E-boxu (z angl. enhancer box) v promotoru genů *Per* a *Cry*, kde působí jako aktivátor jejich exprese (Gekakis et al., 1998). Vzniklé proteiny PER a CRY pak tvoří v cytoplazmě komplex, který je transportován zpět do jádra. V jádře komplex nasedá na CLOCK-BMAL1 heterodimer a tím vypíná jeho aktivační účinek na expresi *Per* a *Cry* (Kume et al., 1999). Následným snížením hladin proteinů PER a CRY se inhibice jejich exprese opět uvolní a cyklus se znovu opakuje (Welsh et al., 2010).

Expresi *Bmal1* ovlivňuje vedlejší hodinová smyčka, zahrnující geny *Rev-erba* a *Rora* (retinoic acid-related orphan receptor alpha). Dimer CLOCK-BMAL1 aktivuje transkripci genu *Rev-erba* a *Rora* opět vazbou na E-box v jejich promotorech. Protein REV-ERB $\alpha$  poté zpětně inhibuje expresi *Bmal1*, ROR $\alpha$  působí naopak aktivačně. Oba proteiny účinkují skrze vazbu na ROR element (retinoic acid-related orphan receptor response element) v promotoru *Bmal1* (Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004).

Díky zpětnovazebným regulacím oscilují hladiny mRNA (z angl. messenger RNA) hodinových genů a jejich proteinů s cirkadiální (přibližně 24hodinovou) periodou. *Bmal1* a *Per1* vykazují nejvyšší hladiny mRNA 12 hodin po sobě (Aton and Herzog, 2005).

Molekulární hodiny ovlivňují transkripci velkého množství genů, které nejsou součástí zpětnovazebných smyček. Jedná se o tzv. hodinami kontrolované geny (clock-controlled genes; CCG). Kontrolou jejich exprese přes vazebná místa v promotorech (např. E-box) přispívají k rytmicitě různorodých fyziologických funkcí (Golombek et al., 2014). Hodinami kontrolované geny se podílejí také na vzniku rytmických elektrických výbojů buněk SCN regulací aktivity iontových kanálů (Reppert and Weaver, 2002). Elektrická aktivita SCN je přes den vysoká a v noci je utlumena, nezávisle na tom, zda je živočich noční nebo denní. Rytmické výboje zpětně ovlivňují chod molekulárních hodin, ne zcela objasněným mechanismem (Colwell, 2011).



Obr. 1. Molekulární hodiny savců

Heterodimer CLOCK-BMAL1 indukuje expresi hodinových genů *Per* a *Cry* vazbou na E-box v jejich promotoru. Proteiny PER a CRY pak zpětně inhibují CLOCK-BMAL1 aktivitu a tak inhibují vlastní transkripci. Vedlejší smyčka obsahuje proteiny mající vliv na transkripci genu *Bmal1* - RORα (aktivační účinek) a REV-ERBα (inhibiční účinek). Hodinová smyčka reguluje také rytmickou transkripci tzv. hodinami kontrolovaných genů (clock controlled genes; CCGs). Převzato podle Golombek et al., (2014).

### 2.1.3. Posttranslační modifikace

Proteiny tvořící zpětnovazebnou hodinovou smyčku procházejí v cytoplasmě posttranslačními modifikacemi. Zejména fosforylace proteinů PER a CRY pak má vliv na časovou

dynamiku hodinové smyčky a určuje délku její periody, přibližující se 24 hodinám. Fosforylace může mít odlišný efekt na osud proteinů. Důležitou rodinou kináz modifikujících dynamiku cirkadiánních oscilací jsou kasein kinázy I (CKI). Mutace CKI $\epsilon$  vede například ke zvýšené fosforylaci a následné zrychlené degradaci proteinů PER, což způsobí zkrácenou periodu cirkadiánních rytmů („*tau*“ mutace) (Gallego et al., 2006; Lowrey et al., 2000). Kromě vlivu na stabilitu proteinů vede fosforylace pomocí CKI k translokaci proteinů PER do jádra nebo naopak jejich akumulaci v cytoplazmě a k interakci s dimerem CLOCK-BMAL1. Fosforyluje také BMAL1 a tím podporuje jeho aktivační funkci na transkripci genů přes E-box (Gallego and Virshup, 2007).

Glykogen syntáza kináza 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) má také vliv na dynamiku hodinové smyčky. Aktivita kinázy je řízena fosforylací, fosforylovaná forma GSK3 $\beta$  (pGSK3 $\beta$ ) je neaktivní (Stambolic and Woodgett, 1994). Fosforylace GSK3 $\beta$  vykazuje v DD režimu (z angl. dark – dark) cirkadiánní profil s nejvyššími hladinami během první poloviny subjektivního dne (tzn. v klidové fázi dne nočního laboratorního zvířete). Aktivita GSK3 $\beta$  by měla být nejvyšší v první polovině subjektivní noci (Besing et al., 2015). Studie stanovující profil pGSK3 $\beta$  u zvířat chovaných v LD režimu (z angl. light – dark) popisují nejvyšší hladiny pGSK3 $\beta$  během druhé poloviny noci (Iitaka et al., 2005; Pačesová et al., 2015). GSK3 $\beta$  má vliv na délku periody i na amplitudu (tzn. robustnost) rytmů v expresi hodinových genů. Inhibice GSK3 $\beta$  vede ke zpoždění fáze hodinové smyčky, její vysoká aktivita způsobí naopak předběhnutí (Iitaka et al., 2005). Stálá aktivita kinázy GSK3 $\beta$  zruší cirkadiánní rytmicitu v expresi *Bmal1* v SCN (Besing et al., 2015). GSK3 $\beta$  může ovlivňovat hlavní smyčku také přímou modifikací BMAL1, jehož fosforylace pomocí GSK3 $\beta$  vede k ubiquitylaci a následné degradaci v proteasomu (Sahar et al., 2010), nebo nepřímo přes fosforylaci REV-ERB $\alpha$ , která umožňuje vstup REV-ERB $\alpha$  do jádra, kde inhibuje transkripci *Bmal1* (Yin et al., 2006). Zvýšená degradace BMAL1 společně s potlačením jeho transkripce může vést k oslabení rytmů. GSK3 $\beta$  interaguje i s dalšími hodinovými proteiny – s PER2, CRY2 a CLOCK (Besing et al., 2015). Fosforylace PER2 pomocí GSK3 $\beta$  může vést k přesunu PER2 do jádra (Iitaka et al., 2005). Dále byl popsán její účinek na fosforylaci a následnou degradaci proteinu CRY2 (Harada et al., 2005; Kurabayashi et al., 2010) a na degradaci proteinu CLOCK (Spengler et al., 2009). Nedávné studie popisují GSK3 $\beta$  jako spojovací prvek mezi molekulární smyčkou a elektrickou aktivitou v buňkách SCN. Inhibice GSK3 $\beta$  vede k potlačení elektrické aktivity ve dne, chronická aktivita vede naopak

ke zvýšené elektrické aktivitě SCN během noci, kdy je běžně utlumena. GSK3 $\beta$  zřejmě reguluje frekvenci akčních potenciálů v SCN regulací sodíkových kanálů (Paul et al., 2016).

Další kináza ovlivňující hodinovou smyčku je ERK1/2 (extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2) patřící do rodiny MAP kináz (z angl. mitogen-activated protein kinases). Aktivovaná kináza (tzn. její fosforylovaná forma; pERK1/2) vykazuje v SCN cirkadiánní rytmus – přes den je exprese pERK1/2 vyšší v DM SCN, zatímco v noci se vyskytuje výhradně ve VL SCN. Výskyt ve VL SCN je podmíněn inervací retinohypotalamickým traktem, jelikož přerušení této dráhy vede k vymizení pERK1/2 ve VL SCN (Lee et al., 2003). ERK1/2 moduluje negativní smyčku hodin, což bylo měřeno v *in vitro* podmínkách. Fosforyluje proteiny CRY1 a CRY2 a podporuje jejich interakci s CLOCK-BMAL1 dimerem, což vede k inhibici jejich vlastní transkripce (Sanada et al., 2004). Inhibice ERK1/2 vede k oslabení rytmů buňkách SCN *in vitro* jak na úrovni oscilací hodinových genů, tak v elektrické aktivitě neuronů (Akashi et al., 2008). Po působení světla v noci její aktivní forma přechodně stoupá, což naznačuje její roli také ve světelné synchronizaci (Coogan and Piggins, 2003; Obrietan et al., 1998).

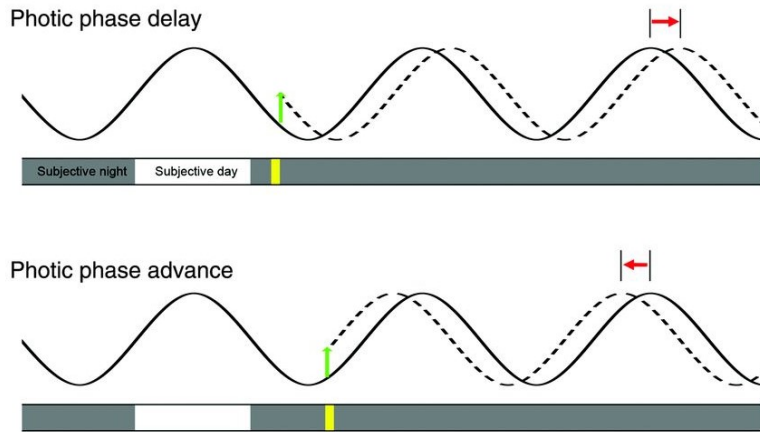
#### 2.1.4. Světelná synchronizace

SCN přijímají signály z vnějšího prostředí a podle nich nastavují své i periferní molekulární hodiny. Díky tomu se variabilní endogenní perioda organismů přizpůsobuje přesným 24 hodinám cyklu světla a tmy. Nejsilnějším signálem vedoucím k synchronizaci endogenních rytmů s vnějším prostředím (tzv. zeitgeberem) je světlo. Organismus, který není synchronizován světlem (tj. nachází se ve stálé tmě) takzvaně „volně běží“ v čase. Tehdy můžeme zaznamenat endogenní délku periody jeho rytmů. Pro označení fáze, ve které se organismus v rámci své endogenní periody nachází, se používá pojem „cirkadiánní čas“ (CT; z angl. circadian time). Čas CT0 označuje začátek subjektivního dne (u živočichů s denní aktivitou i začátek jejich aktivní fáze), v CT12 začíná subjektivní noc živočicha (tehdy nastává aktivní fáze u organismů s noční aktivitou; Vitaterna et al., 2001).

Světlo působící na organismus během jeho subjektivní noci vede k posunutí hodin v SCN. Během dne nemá na dynamiku hodinové smyčky vliv. Světelný puls aplikovaný v průběhu první poloviny subjektivní noci vede k fázovému zpoždění rytmů, během druhé poloviny subjektivní noci způsobí naopak fázové předběhnutí (Daan and Pittendrigh, 1976); obr 2). Tento posun je



možné pozorovat i na behaviorální úrovni, například na rytmu v pohybové aktivitě (Golombek and Rosenstein, 2010).

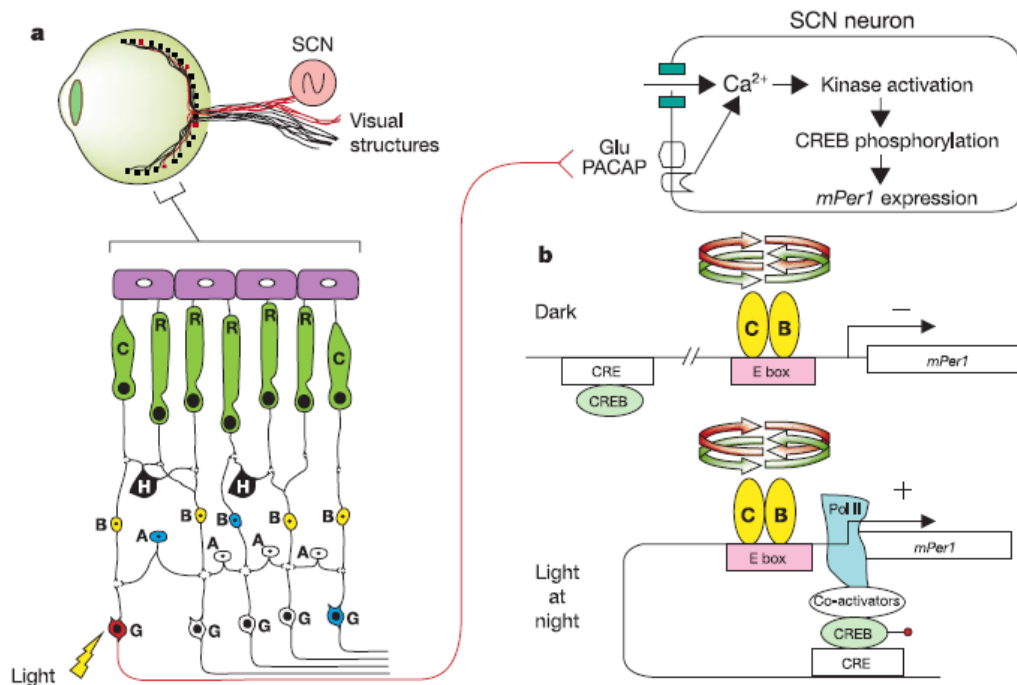


Obr. 2. Účinek světla v subjektivní noci na fázi cirkadiánních rytmů

Světlo (znázorněné žlutou úsečkou) aplikované během subjektivní noci indukuje expresi *Per1* (zelená šipka) a vede k fázovému posunu. V první polovině subjektivní noci způsobí fázové zpoždění rytmů (nahore), v druhé polovině subjektivní noci vede naopak fázové předběhnutí (dole). Převzato podle Mistlberger and Antle (2011).

Informace o světle je u savců zachycena speciálními gangliovými buňkami (intrinsically photosensitive ganglion cells; iPRGC), které obsahují fotoropigment melanopsin (Do and Yau, 2010; Hattar et al., 2002). Po přijetí světla jsou depolarizovány a jejich axony (tvořící tzv. retinohypotalamický trakt; RHT) vedou informaci o světle přímo do suprachiasmatických jader v hypotalamu (Berson et al., 2002; obr. 3). Axony iPRGC tvoří synapsi s neurony ve ventrolaterální části SCN (Dibner et al., 2010). Aktivace iPRGC během subjektivní noci způsobí výlev glutamátu a neuropeptidu PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) na synapsi a vede k aktivaci NMDA (N-methyl-D-aspartátových) receptorů a influxu vápníku do neuronů VL SCN (Colwell, 2001; Hannibal et al., 1997; Liou et al., 1986). To spustí buněčné kaskády vedoucí k okamžité indukci transkripce *Per1* a některých časných genů, jako je *c-Fos* (Morris et al., 1998; Tischkau et al., 2003). Indukce *Per1* v buňkách SCN během subjektivní noci pozmění časovou dynamiku hodinové smyčky a je zodpovědná za vznik fázového posunu (Akiyama et al., 1999). Světlo v subjektivní noci indukuje expresi *Per1* odlišným mechanismem než dimer CLOCK-BMAL1 přes E-box. Promotor *Per1* obsahuje také cAMP-responsive element (CRE), na něž se váže CRE-vazebný

protein (CRE-binding protein; CREB). Fosforylovaný CREB má funkci transkripčního faktoru a vede k zahájení exprese *Per1* a následnému fázovému posunu (Tischkau et al., 2003; Travnickova-Bendova et al., 2002).



Obr. 3. Dráha vedoucí informaci o světle do SCN

- Světlo je zachyceno skupinou gangliových buněk v retině obsahujících fopigment melanopsin (iPRGC). Ty vedou informaci o světle přímo do SCN, kde stimulují neurony výlevem glutamátu a neuropeptidu PACAP. Následuje vtok vápenatých iontů do neuronů SCN a aktivace buněčných kaskád vedoucích k fosforylaci transkripčního faktoru CREB a indukci exprese hodinových genů *Per1*.
- Bez světelného podnětu je transkripce *Per1* v subjektivní noci neaktivní (ovlivněna zpětnovazebnou hodinovou smyčkou). Informace o světle v subjektivní noci vede k okamžité indukci *Per1* a tím zajišťuje vznik fázového posunu.

Převzato podle Reppert and Weaver, (2002).

Intracelulární kaskády, které vedou od aktivace NMDA receptorů k indukci transkripce *Per1* přes CRE element, nejsou zcela objasněny. Důležitou složkou je již zmíněná kináza ERK1/2. Fosforylace ERK1/2 vede k její aktivaci a přechodu do jádra, kde může ovlivňovat transkripci genů (Grewal et al., 1999). Světlo v subjektivní noci, nikoliv ve dne, způsobí přechodnou fosforylaci této kinázy v SCN kaskádou spuštěnou přes NMDA receptory. Fosforylovaná kináza ERK1/2 je

translokována do jádra, kde patrně vede k fosforylaci transkripčního faktoru CREB (Butcher et al., 2003; Coogan and Piggins, 2003; Obrietan et al., 1998). Narušení MAP kinázové dráhy v SCN blokuje fázové zpoždění (Butcher et al., 2002) i expresi světlem indukovaných časných genů (Dziema et al., 2003).

Kromě ERK1/2 byly popsány další buněčné složky důležité pro vznik fázového posunu, jako je NO syntáza a produkce NO (Ding et al., 1994) nebo kalmodulin-dependentní kináza II (Fukushima et al., 1997). Pro fázové zpoždění je zřejmě nezbytný výlev vápenatých iontů z intracelulárních zásobáren pomocí ryanodinového receptoru (Ding et al., 1998), pro fázové předběhnutí je důležitá cGMP-dependentní proteinkináza (Mathur et al., 1996). Časný raný gen *c-Fos*, který se začne v SCN exprimovat ihned po světelném pulsu, se také účastní mechanismu vzniku fázového posunu, neboť zablokování jeho exprese vede k inhibici fázového posunu po světelném pulsu v první polovině subjektivní noci (Wollnik et al., 1995).

Nedávné studie poukázaly na roli GSK3 $\beta$  v reakci SCN na světlo během subjektivní noci. Světelný puls během subjektivní noci vedl k aktivaci GSK3 $\beta$  (tzn. ke snížení fosforylované formy GSK3 $\beta$ ) v čase od 30 minut (Paul et al., 2017) až do 8 hodin po pulsu (Červená et al., 2015). Aktivace GSK3 $\beta$  se ukázala být nezbytná pro následné zvýšení elektrické aktivity neuronů SCN, které nastává 3-5 hodin po světelném pulsu a vede k předběhnutí rytmů. Chronická aktivita GSK3 umožnila rychlejší adaptaci na posunutý světelný režim (fázové předběhnutí o 6 hodin) oproti kontrolám a vedla k fázovému předběhnutí rytmů v elektrické aktivitě SCN i na behaviorální úrovni (Paul et al., 2017).

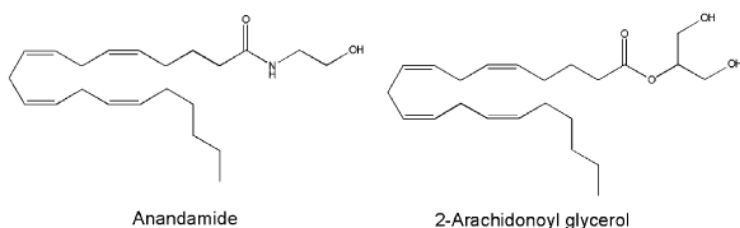
Také nesvětelné podněty mohou způsobit fázový posun rytmů. Vystavení těmto podnětům v průběhu subjektivního dne vede u nočních hlodavců naopak ke snížení exprese *Per1* a tím k fázovému posunu. Mohou také vést k inhibici světlem indukovaných fázových posunů (Dibner et al., 2010; Golombek and Rosenstein, 2010).

## 2.2. Endokanabinoidní systém

Endokanabinoidní systém (ECS) je lipidový signální systém vyskytující se převážně v centrální nervové soustavě. Zahrnuje systém receptorů, jejich endogenních ligandů (endokanabinoidů) a enzymů, které tyto ligandy syntetizují a degradují. Aktivace

endokanabinoidních receptorů má zpravidla za následek inhibici výlevu neurotransmiterů z presynaptického neuronu a takto moduluje jejich působení na synapsi.

Endokanabinoidy jsou endogenně vytvářené látky, které působí jako agonisté kanabinoidních receptorů a jejich aktivací spouštějí buněčnou signalizaci. Mezi nejvýznamnější a nejlépe prozkoumané endokanabinoidy patří anandamid (N-arachidonylethanolamid) a 2-AG (2-arachidonoylglycerol); obr. 4. Oba jsou deriváty kyseliny arachidonové, nenasycené mastné kyseliny vázané ve fosfolipidech buněčných membrán (Rodríguez de Fonseca et al., 2005). 2-AG vykazuje řádově vyšší hladiny v mozkové tkáni než anandamid (Stella et al., 1997).



Obr. 4. Struktura endogenních kanabinoidů

Převzato podle Howlett et al., (2004).

Endokanabinoidy nejsou syntetizovány do zásoby, ale tzv. “on demand“, tj. syntéza nastává v reakci na depolarizaci neuronu nebo aktivaci některých metabotropních receptorů. Po syntéze následuje jejich uvolnění do extracelulárního prostoru (Lu and Mackie, 2016). 2-AG je monoacylglycerol - glycerol s navázanou kyselinou arachidonovou. Prvním krokem syntézy 2-AG je aktivace fosfolipázy C $\beta$ , která štěpí membránový fosfatidylinositol bisfosfát (PIP2) obsahující kyselinu arachidonovou. Štěpením PIP2 vzniknou dva produkty, sloužící v buňce jako tzv. druzí posli – inositoltrisfosfát a diacylglycerol (DAG). Z DAG pak vzniká 2-AG štěpením pomocí DAG lipázy (Piomelli, 2003; Stella et al., 1997). Anandamid je amid kyseliny arachidonové a ethanolaminu. Syntéza anandamidu je složitější než syntéza 2-AG a probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku dojde k odštěpení arachidonátu z membránového fosfatidylcholinu. Arachidonát je následně přenesen enzymem N-acyltransferázou na amino skupinu membránového fosfatidylethanolaminu a vzniká N-arachidonoylfosfatidylethanolamin (NAPE) (Cadas et al., 1997).

Ten slouží jako prekurzor, ze kterého se odštěpí anandamid pomocí specifické NAPE - fosfolipázy D (Okamoto et al., 2004).

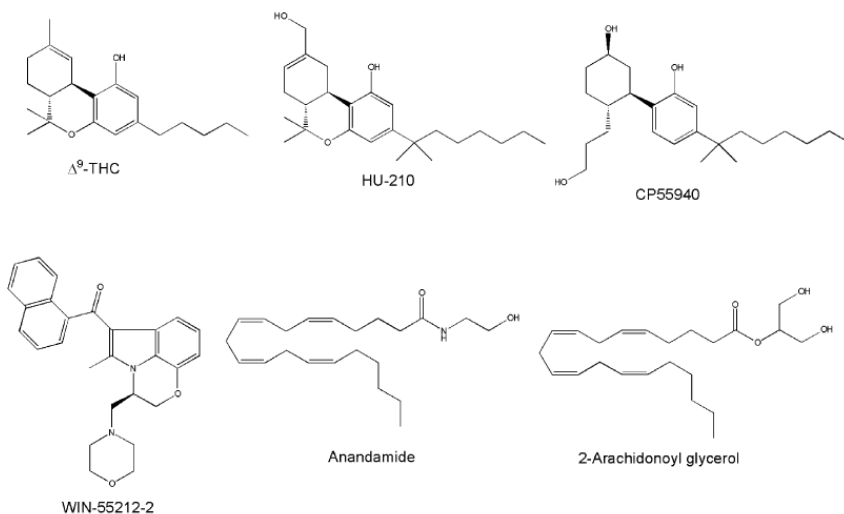
Enzymatická degradace se odehrává uvnitř buňky. Degradace anandamidu je katalyzována hydrolázou amidů mastných kyselin („fatty acid amide hydrolase“ - FAAH), jejíž produkty jsou opět arachidonát a ethanolamin (Cravatt et al., 1996). Enzym FAAH je zodpovědný za regulaci hladin anandamidu v mozku. Myši s absencí tohoto enzymu vykazují vysoké hladiny anandamidu a chování odpovídající zvýšené aktivitě CB1 receptorů, jako je hypomotilita nebo snížené vnímání bolesti (Cravatt et al., 2001). 2-AG je hydrolyzován primárně monoacylglycerol lipázou (MGL) na arachidonát a glycerol (Dinh et al., 2002). Dalším mechanismem degradace může být oxidace arachidonátu v endokanabinoidech enzymem cyklooxygenázou (COX), převážně pomocí enzymu COX2. (Kano et al., 2009)

### 2.2.1. Receptory

Kanabinoidní látky působí především prostřednictvím vazby na dva typy kanabinoidních receptorů – CB1 a CB2 (cannabinoid receptor type 1;2). CB1 receptory patří mezi nejhojnější G-proteinové receptory vyskytující se v savčím mozku (Piomelli, 2003). CB1 receptory v myši, potkaní a lidské mozkové tkáni vykazují vysokou homologii, jejich aminokyselinové sekvence jsou identické z 99%. mRNA těchto receptorů byla nalezena primárně v mozkové tkáni, výskyt CB2 receptorů byl popsán převážně v imunitních buňkách (Howlett et al., 2002). Oba receptory mají podobnou funkci – moduluji výlev mediátorů. CB1 receptor moduluje výlev neurotransmiterů z neuronů na synapsi, CB2 působí převážně na výlev cytokinů z imunitních buněk (Pertwee, 2006).

Kromě endogenních derivátů kyseliny arachidonové účinkují přes CB receptory také rostlinné kanabinoidy (fytokanabinody), jako je hlavní psychoaktivní složka konopí  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), a syntetické kanabinoidy. Agonisté CB receptorů jsou rozděleny do rodin podle své chemické struktury. 2-AG a anandamid patří do rodiny eikosanoidů, anandamid má vyšší afinitu pro CB1 receptory (Showalter et al., 1996). Tzv. „klasické“ kanabinoidy, jsou deriváty tricyklického dibenzopyranu, je to například THC a jeho analogy (př. syntetický HU-210). THC je parciální agonista CB1 receptoru a jeho účinnost není tak vysoká jako některých „neklasických“ kanabinoidů. Tím je například syntetický kanabinoid CP55940 vyvinutý firmou

Pfizer, který oproti THC postrádá pyranový kruh. Další rodinu agonistů představují aminoalkylindoly, jejichž představitelem je syntetický WIN55212 (Howlett et al., 2002; Pertwee, 2006); obr 5.



Obr. 5. Agonisté CB receptorů

Převzato podle Howlett et al., (2004).

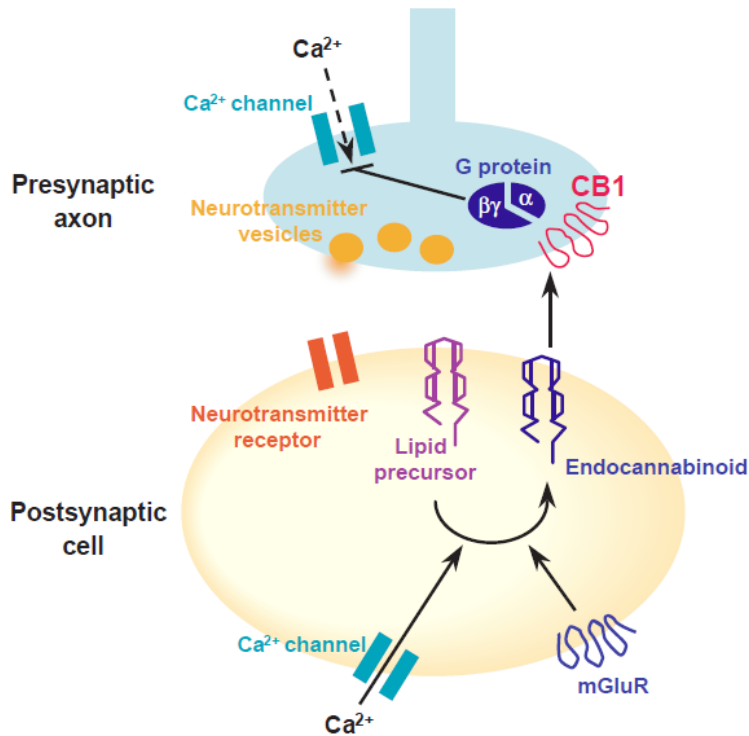
Endokanabinoidy neúčinkují pouze přes CB receptory. Byla také popsána aktivace TRPV1 kanálu (vaniloidní transient receptor potential kanál typu 1) anandamidem (Zygmunt et al., 1999) a signalizace endogenních i exogenních kanabinoidních látek přes jaderné receptory rodiny PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), zejména PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  (O'Sullivan, 2007). Aktivace PPAR receptorů vede k iniciaci transkripce genů, kanabinoidy se prostřednictvím PPAR receptorů uplatňují v regulaci příjmu potravy, v metabolismu lipidů, neuroprotekcí a vykazují antinociceptivní a protizánětlivý efekt (Pistis and O'Sullivan, 2017).

### 2.2.2. Mechanismus působení ECS

Endokanabinoidy působí jako lokální mediátory - účinkují v blízkosti neuronu, kde byly vytvořeny (Rodríguez de Fonseca et al., 2005). Nejčastěji působí na synapsi v opačném směru než běžné neurotransmitery – retrográdně, tj. jsou produkovány postsynaptickým neuronem a aktivují receptory na membráně presynaptických neuronů (Wilson and Nicoll, 2002). Působením na kanabinoidní receptory inhibují výlev neurotransmiteru z presynaptického neuronu. Tento

účinek je zprostředkován blokací napěťových vápníkových kanálů na zakončení presynaptického neuronu pomocí  $G_{\beta\gamma}$  podjednotky (Wilson et al., 2001; obr. 6).

Modulací výlevu neurotransmiterů je ovlivněna synaptická plasticita. Endokannabinoidní signalizace může vést ke krátkodobému i dlouhodobému ovlivnění synaptického přenosu a tím zasahovat do regulace nejrůznějších procesů jako je kognice, motorika, příjem potravy nebo vnímání bolesti (Castillo et al., 2012). Krátkodobé ovlivnění synaptické plasticity závisí na dvou způsobech, které vedou k syntéze endokannabinoidů: depolarizací postsynaptického neuronu - mechanismem nazvaným „depolarizací indukovaná suprese inhibice/excitace“ (DSI/DSE), či aktivací metabotropních receptorů na postsynaptické membráně - „metabotropně-indukovaná suprese inhibice/excitace“ (MSI/MSE; Lu and Mackie, 2016).



Obr. 6. Schéma retrogradní signalizace endokannabinoidů

Postsynaptická depolarizace a následný vtok  $Ca^{2+}$  iontů či aktivace postsynaptických metabotropních receptorů vede k syntéze endokannabinoidů z lipidových prekurzorů v membráně. Endokannabinoidy následně difundují synaptickou štěrbinou k presynaptickým CB1 receptorům, jejichž aktivací spouští signální kaskádu do buňky. Ta vede mimo jiné k blokaci napěťových vápníkových kanálů přímou interakcí s  $G_{\beta\gamma}$  podjednotkou a k inhibici výlevu neurotransmiteru z presynaptického neuronu. Převzato podle Wilson and Nicoll, (2002).

Modulační mechanismy DSI či DSE se děje v závislosti na tom, zda se signalizace objevuje u excitačních či inhibičních synapsí (Maejima et al., 2001a). Endokanabinoidní signalizace byla popsána především u GABAergních a glutamatergních synapsí, ale aktivace CB1 receptorů má vliv také na výlev některých neuropeptidů, například cholecystokininu (Beinfeld and Connolly, 2001; Lu and Mackie, 2016).

DSI je jev, který byl popsán ještě před detailnějším prozkoumáním endokanabinoidního systému. Spočívá v inhibici výlevu neurotransmiteru z presynaptického neuronu, která je indukována depolarizací postsynaptického neuronu a je závislá na zvýšení postsynaptické hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Byl popsán v GABAergních neuronech hipokampu i v buněčných kulturách (Ohno-Shosaku et al., 1998; Pitler and Alger, 1992). Autoři Wilson a Nicoll objevili retrográdní endokanabinoidní signalizaci přes CB1 receptory jako zodpovědnou za proces DSI na GABAergních synapsích v hipokampu (Wilson and Nicoll, 2001). Obdobný mechanismus byl poté popsán u excitačních synapsí (DSE) v Purkyňových vláknech mozečku (Kreitzer and Regehr, 2001).

Indukce DSI a DSE je závislá na zvýšené hladině  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v postsynaptickém neuronu. Postsynaptická depolarizace otevírá napěťově řízené vápníkové kanály a způsobí zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , které má důležitou roli pro syntézu a uvolnění endokanabinoidů na synapsi (Kreitzer and Regehr, 2001; Wilson and Nicoll, 2002). Zvýšením intracelulárního vápníku a následně zvýšenou hladinou cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) je aktivován enzym N-acyltransferáza, na jehož aktivitě je závislá syntéza anandamidu (Cadas et al., 1996). Pro syntézu 2-AG je klíčová aktivita enzymu DAG lipázy, kterou zatím neobjasněným způsobem stimulují  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (Ohno-Shosaku et al., 2012). Vápník pro syntézu endokanabinoidů může téct do buňky také přes NMDA receptory. Jejich aktivace vede k endokanabinoidní signalizaci i v případě zablokování napěťově řízených vápníkových kanálů (Ohno-Shosaku et al., 2007).

Další mechanismus, jakým endokanabinoidní signalizace ovlivňuje synaptickou plasticitu je metabotropně-indukovaná suprese inhibice/excitace. Tento mechanismus vyžaduje aktivaci postsynaptických metabotropních receptorů spřažených s  $G_{q/11}$ , která vede k syntéze endokanabinoidů (Lu and Mackie, 2016). Na rozdíl od DSI/DSE je tento mechanismus nezávislý na hladině vápníku (Kano et al., 2009). Tento jev byl poprvé popsán na excitačních synapsích Purkyňových buněk v mozečku, kde aktivace metabotropního glutamátového receptoru typu 1



(mGluR1) na postsynaptickém neuronu vedla k potlačení výlevu neurotransmiteru (Maejima et al., 2001b). Indukce endokanabinoidní signalizace je možná i přes další metabotropní receptory, jako jsou muskarinové receptory M1 a M3, glukokortikoidní receptory, oxytocinové a orexinové receptory. Všechny tyto receptory jsou spřaženy s G-proteinem rodiny  $G_{q/11}$ , jehož aktivace stimuluje fosfolipázu C a vede tak k syntéze 2-AG (Kano et al., 2009).

Endokanabinoidní signalizace může také dlouhodobě oslabit synaptický přenos a indukovat tzv. long term depression (LTD). Tento jev byl posán v různých oblastech mozku u excitačních i inhibičních synapsí. Aktivace CB1 receptorů zde vede k dlouhodobému snížení výlevu neurotransmiterů z presynaptického neuronu, okolních neuronů nebo dokonce z téhož neuronu, odkud jsou endokanabinoidy syntetizovány. LTD je obvykle navozeno tetanickou stimulací neuronů o různých frekvencích. K dosažení LTD zřejmě nestačí samotná aktivace presynaptických CB1 receptorů, ale je vyžadována i aktivita postsynaptického neuronu. Ta zahrnuje aktivaci metabotropních receptorů nebo zvýšenou hladinu vápenatých iontů (Heifets and Castillo, 2009).

Vazba kanabinoidních látek na CB receptory vede k variabilním procesům uvnitř buňky. CB1 i CB2 jsou metabotropní receptory spřažené s  $G_{i/o}$  proteinem. Jejich aktivací dochází k inhibici adenylcyklázy a snížení cAMP. Pokles cAMP vede k deaktivaci proteinkinázy A a následná snížená fosforylace proteinů může mít vliv na další buněčné procesy, například funkci iontových kanálů (Howlett et al., 2002). Po aktivaci CB1 receptorů dochází ke zvýšení vodivosti draslíkových kanálů a snížení vodivosti napětově závislých vápníkových kanálů L, N a P/Q typu (Howlett et al., 2002, 2004). Napětové vápníkové kanály potřebné pro výlev váčku s neurotransmiterem jsou zřejmě zablokovány přímou interakcí s  $G_{\beta\gamma}$  podjednotkou (Wilson et al., 2001). Aktivace CB1 receptorů také indukuje aktivitu MAP kinázové dráhy a některých časných genů (Bouaboula et al., 1995).

Ukončení endokanabinoidní signalizace je zajištěno transportem endokanabinoidů přes membránu do presynaptického neuronu a následnou enzymatickou degradací. Transport přes membránu zajišťuje selektivní přenašeč, který pracuje mechanismem tzv. usnaděné difuze (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997) podle (Piomelli, 2003).

### 2.2.3. Lokalizace CB1 receptorů v CNS

Výskyt CB1 receptorů se liší v různých oblastech mozkové tkáně. Pomocí radioaktivně značeného ligandu CB1 receptorů CP55940 byla popsána jejich distribuce v mozku potkana. Vysoké koncentrace receptorů byly nalezeny v basálních gangliích, v hipokampu, mozečku a kortexu, v nižších koncentracích byl popsán výskyt v mozkovém kmeni, thalamu a hypothalamu (Herkenham et al., 1991). Distribuce receptorů v lidském mozku je podobná, navíc je zde vysoký výskyt CB1 receptorů v asociačních oblastech kůry a v limbickém systému (Glass et al., 1997). Zajímavé je, že aktivace CB1 receptorů v odlišných oblastech mozku vede k odlišné efektivitě G-proteinové signalizace. Například v hypotalamu, kde byly popsány relativně nízké hladiny CB1 receptorů, byla po vazbě agonisty na CB1 receptor nalezena větší amplifikace G-proteinové aktivity (pomocí radioaktivně značeného analogu GTP) oproti některým oblastem s vysokým výskytem CB1 receptorů (Breivogel et al., 1997). Nedávný výzkum ukázal, že se efektivita G-proteinové signalizace liší i v rámci jedné oblasti mozku, mezi glutamatergními a GABAergními buňkami hipokampu (Steindel et al., 2013).

### 2.2.4. Výskyt CB1 v hypotalamu a SCN

Kanabinoidní signalizace v hypotalamu má vliv na regulaci důležitých homeostatických funkcí, jako je příjem potravy (Koch et al., 2015a), termoregulaci, rozmnožování (Wenger and Moldrich, 2002) a stresové reakce (Hill et al., 2010). Výzkum Hrabovszky et al. popsal výskyt CB1 receptorů v hypotalamu myši pomocí *in situ* hybridizace a koexpresi těchto receptorů s markery GABAergní a glutamatergní synapse (Hrabovszky et al., 2012). Slabý výskyt CB1 receptorů byl popsán také v SCN. CB1 receptory zde byly exprimovány společně s GABA, ne však s glutamátem. Výskyt CB1 receptorů v SCN u myší potvrdily i další studie (Acuna-Goycolea et al., 2010; Wittmann et al., 2007). Pomocí imunohistochemického značení v mozku křečka byl popsán výskyt CB1 receptorů v SCN i v dalších oblastech podílejících se na regulaci cirkadiánních rytmů, jako je intergenikulární lístek thalamu a rapheální jádra (Sanford et al., 2008).

### 2.2.5. Rytmicita a cirkadiánní regulace endokanabinoidního systému

Endokanabinoidní látky, jejich receptory a některé degradační enzymy vykazují rytmické změny hladiny v mozku potkana během dne a noci. V oblastech nucleus accumbens, hipokampu,

prefrontálního kortexu a striatu byly významně vyšší hladiny anandamidu během tmavé části dne, hladiny 2-AG byly naopak zvýšeny během světlé části dne. Také hladiny FAAH vykazovaly rytmicitu s poklesem v tmavé části dne, což odpovídá vyšším hladinám anandamidu, který není v tuto dobu degradován (Valenti et al., 2004).

V epifýze potkana byly nalezeny rytmické hladiny anandamidu a CB1 receptorů, s vyššími hladinami během světlé části dne. Mají tedy opačnou fázi ve srovnání s jinými oblastmi mozku ve studii (Valenti et al., 2004). Nejnížší hladiny byly zaznamenány na začátku tmavé části dne v CT12 (Koch et al., 2008). V buněčných kulturách pinealocytů byly hladiny anandamidu akutně sníženy účinkem noradrenalinu, jehož výlev ze sympatických neuronů na začátku tmavé části dne vedoucí k syntéze melatoninu by tak mohl snižovat hladinu anandamidu v epifýze v CT12 (Koch et al., 2015b). Předchozí studie téhož autora ukázala, že fytoKANABINOIDY v buněčných kulturách pinealocytů zablokovaly syntézu enzymu arylalkylamin N-acetyltransferázy (AANAT), klíčového pro syntézu melatoninu v epifýze (Koch et al., 2006). Z těchto nálezů se dá usuzovat na roli anandamidu v regulaci syntézy melatoninu inhibicí AANAT během dne, v noci je naopak aktivita anandamidu utlumena noradrenalinem (Koch et al., 2015b).

Rytmicita anandamidu a dalších kanabinoidů byla popsána také v mozkomíšním moku, opět s vyššími hladinami během světlé části dne oproti hladinám v noci. Rytmicita anandamidu v dalších oblastech mozku byla variabilní. V hypotalamu byla zvýšená hladina anandamidu přes den, ostatní kanabinoidy naopak vykazovaly nejvyšší hladiny na konci tmavé části dne (Murillo-Rodriguez et al., 2006). Je možné, že se anandamid z epifýzy, kde má 4-5krát vyšší hladiny než v jiných oblastech mozku dostává do mozkomíšního moku, kde vykazuje stejnou fázi rytmu jako v epifýze, a odtud může mít vliv na další mozkové oblasti, jako je hypotalamus (Koch et al., 2015b). Je zajímavé, že hladiny endokanabinoidů se mění během dne i v lidské krvi. Anandamid vykazuje třikrát vyšší hladiny ráno oproti večeru (Vaughn et al., 2010).

Cirkadiánní oscilace se projevují i v hustotě CB1 receptorů. V kortexu i v mozkovém kmeni potkana byly naměřeny nejvyšší hladiny proteinů CB1 receptorů ve dne, nejnížší v noci. Hladina mRNA CB1 receptorů měla opačnou rytmicitu, s nejvyšší koncentrací přes noc a nejnížší přes den (Martinez-Vargas et al., 2013; Martínez-Vargas et al., 2003).

### 2.2.6. *Modulace světelné synchronizace endokanabinoidním systémem*

Interakcí mezi cirkadiánním a endokanabinoidním systémem se doposud nezabývalo mnoho studií. Pouze dvě práce se ale týkaly změn ve světelné synchronizaci cirkadiánních rytmů po aktivaci kanabinoidní signalizace. Sanford et al. popsal zmenšení fázového posunu v lokomoční aktivitě křečka po aplikaci agonisty CB1 receptorů CP55940. V těchto experimentech následoval po intraperitoneální aplikaci agonisty desetiminutový světelný puls o intenzitě 20 luxů aplikovaný v druhé polovině subjektivní noci v CT19. Následné fázové předběhnutí bylo u zvířat s podaným agonistou CB1 receptorů zmenšeno o 90 % oproti kontrolám. Efekt agonisty CB1 receptorů CP55940 byl zcela potlačen podáním antagonisty CB1 receptorů AM251 a částečně potlačen antagonistou LY320135. Podání samotného antagonisty CB1 receptorů nemělo na velikost světlem indukovaného fázového posunu žádný vliv. Samotný agonista CP55940 aplikovaný bez světelného pulsu také nevykazoval žádný efekt (Sanford et al., 2008). Vliv endokanabinoidů na fázový posun v lokomoční aktivitě potvrdila také studie na myších (Acuna-Goycolea et al., 2010). Myším byl podán agonista CB1 receptorů WIN55. Půl hodiny po podání látky byl v CT16 aplikován světelný puls po dobu 10 minut o intenzitě 50 luxů. Kontrolní zvířata se světelným pulsem v CT16 vykazovala fázové zpoždění v lokomoční aktivitě, agonista WIN55 velikost fázového zpoždění po světelném pulsu výrazně snížil. Antagonista AM251 podaný 15 minut před agonistou WIN55 částečně potlačil efekt agonisty na snížení fázového posunu. Samotný agonista WIN55 bez světelné expozice neměl na lokomoční aktivitu žádný vliv, antagonistu AM251 naopak způsobil mírné fázové zpoždění. V této studii byl také popsán vliv agonisty WIN55 na zvýšení frekvence akčních potenciálů v buňkách SCN *in vitro*, což naznačuje endokanabinoidní působení přímo na pacemaker cirkadiánního systému.

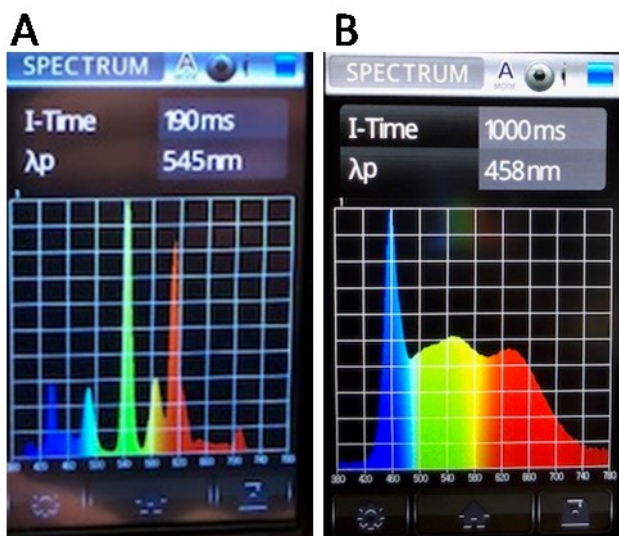
### 3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má systémové podání agonisty a antagonisty CB1 receptorů na světlem indukovaný fázový posun v pohybové aktivitě potkana, což je jeden z dobře pozorovatelných behaviorálních výstupů aktivity SCN, a zda se tento vliv odráží v indukci světlореaktivních markerů v neuronech SCN. Pomocí protilátek jsme stanovili hladinu proteinu c-Fos a aktivitu kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  ve ventrolaterální části SCN po světelném pulsu v časně subjektivní noci. Druhým cílem bylo srovnání účinku nízké (10 luxů) a vysoké (400 luxů) intenzity světla použité pro předchozí synchronizaci zvířat ke světelnému režimu i pro světelné pulsy v samotném experimentu.

### 4. Metody a vybavení

#### 4.1. Laboratorní zvířata

Pro naše experimenty byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar o hmotnosti cca 300 g (Fyziologický ústav Akademie věd ČR, Krč). Potkani byli umístěni do boxů vystlaných standardní podestýlkou, kde měli po celou dobu přístup k vodě a krmivu *ad libitum*. Krmivem byla standardní laboratorní krmná směs (ST-1). Teplota vzduchu byla nastavena na  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Potkani byli chováni ve světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (tzv. LD režim; LD12:12). Světlo bylo zapínáno a vypínáno automaticky pomocí spínacích hodin. Vysokou intenzitu světla zajišťovaly standardní zářivky, které poskytovaly na úrovni polic s chovnými nádobami světlo o přibližné intenzitě 400 luxů. Nízká intenzita osvětlení (10 luxů) byla zajištěna LED páskami s regulátorem intenzity, instalovanými v policích nad chovnými boxy. Patříčná intenzita byla nastavena pomocí luxmetru. Světelné spektrum obou typů osvětlení znázorňuje obr. 7. Před začátkem DD režimu byli potkani přestláni a zváženi pro výpočet dávky aplikované látky. Počet dní LD a DD režimu závisel na konkrétním experimentu.



Obr. 7. Světelné spektrum běžného zářivkového osvětlení v chovech poskytující intenzitu světla cca 400 luxů (A) a spektrum LED pásek poskytujících intenzitu 10 luxů (B). Z obrázku je patrné, že složku modrého, biologicky aktivního světla poskytují oba zdroje. Osvětlení LED má ale lepší spektrální spojení dalších vlnových délek, odpovídající více přirozenému slunečnímu spektru.

#### 4.2. Aplikace agonisty/antagonisty CB1 receptorů

Půl hodiny před světelným pulsem (tj. v CT14,5) byla potkanům intraperitoneálně aplikována účinná látka. Účinnou látkou byl agonista CB1 receptorů CP55940 (Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,1 mg/kg či antagonistu AM251 (Sigma-Aldrich) v koncentraci 1 mg/kg. Obě látky byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid); ředění agonisty: 15 mg/ml DMSO; antagonisty: 10 mg/ml DMSO. K účinné látce s DMSO byl přidán fyziologický roztok přefiltrovaný přes antimikrobiální membránu v takovém množství, aby celkový objem tekutiny injikovaný do jednoho potkana byl 400  $\mu$ l. Aplikace látek i následná anestezie byla prováděna při osvětlení světlem s červeným spektrem, které je biologicky neaktivní.

#### 4.3. Nahrávání lokomočního záznamu

Pro monitorování pohybové aktivity byli potkani jednotlivě rozděleni do boxů, na kterých byly připevněny senzory (Minimetter Vitalview od firmy Starr). Senzory reagují na pohyb potkana

pomocí infračerveného paprsku. Záznam byl uložen do počítačového softwaru, jeho vyhodnocení a odečet fázových posunů byl proveden v počítačovém programu ClockLab Analysis (Actimetrics).

#### 4.4. Experimentální paradigma

Potkani pro nahrávání lokomočního záznamu byli adaptováni na režim LD12:12. Po 15 dnech LD režimu byli 13 dní v režimu DD. V den pokusu byl v CT14,5 aplikován agonista CP55940 (0,1mg/kg) či antagonistu AM251 (1mg/kg), v případě kontrolních zvířat fyziologický roztok s DMSO. V čase CT15 byl aplikován světelný puls o vysoké či nízké intenzitě (10 luxů/400 luxů; kromě potkanů ve skupině intaktních kontrol), který trval 15 minut. V každé skupině bylo 4 - 6 potkanů. Cirkadiánní čas CT15 byl určen pro každý experiment zvlášť, podle záznamu pohybové aktivity potkanů v DD režimu. Pro odečtení fázového posunu lokomoční aktivity byli potkani dalších 10 dní chováni v DD.

Pro imunohistochemickou detekci proteinů byla zvířata adaptována 7 dní na LD režim a poté 5 dní na DD režim. V den pokusu byl v CT14,5 aplikován agonista CP55940 (0,1mg/kg) či antagonistu AM251 (1mg/kg), u kontrolních zvířat byl proveden pouze vpich suchou jehlou. Světelný puls byl aplikován v CT15 (15 min). Následně byla odebírána tkáň ve čtyřech časových bodech: 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po začátku pulsu v CT15.

Pro experiment s nízkou intenzitou světla byla zvířata rozdělena do šesti skupin: intaktní kontroly (bez aplikace kanabinoidní látky a světelného pulsu), pulsované kontroly (pouze světelný puls v CT15), potkani s podaným agonistou/antagonistou CB1 receptorů (bez světelného pulsu) a potkani s agonistou/antagonistou CB1 receptorů + se světelným pulsem v CT15. Experiment s vysokou intenzitou zahrnoval pouze čtyři skupiny – intaktní kontroly, pulsované kontroly a potkany s podaným agonistou či antagonistou CB1 receptorů + se světelným pulsem v CT15. V každé skupině v jednom časovém bodě byli 3 - 4 potkani.

#### 4.5. Imunohistochemie

##### 4.5.1. Příprava tkáně

V určených časových bodech (viz Experimentální paradigma) byla potkanům provedena anestezie pomocí intraperitoneálně aplikované injekce thiopentalu (50mg/kg). Následně byla

provedena perfuze tkání. Do levé srdeční komory byl injekčně aplikován heparin (500 U) pro zabránění srážení krve. Do srdce byla zavedena kanyla tak, aby ústila v aortě. Kanylou byl aplikován fyziologický roztok za účelem promytí krevního oběhu a posléze 4 % roztok paraformaldehydu, který fixuje tkáň. Vypreparované mozky byly uloženy na 12 hodin do 4 % roztoku paraformaldehydu, poté byly přesunuty do kryoprotektivního 20 % roztoku sacharózy na 24 hodin, zamraženy v suchém ledu a uloženy v -80 °C. Mozky byly krájeny na kryokatu (Leica CM 1860) na 30 µm řezy. K dalšímu zpracování byly vybrány řezy obsahující mediální část SCN. Řezy byly zpracovány metodou imunohistochemie plovoucích řezů („free floating“). Tato metoda se prováděla v plastových jamkách obsahujících potřebné roztoky, řezy byly mezi jamkami přesouvány pomocí štětce.

#### *4.5.2. Postup stanovení*

První krok imunohistochemie zahrnoval inkubaci řezů 10 minut v 0,5 % roztoku peroxidu vodíku ve fyziologickém roztoku (PBS; z angl. phosphate buffered saline) pro zablokování endogenních peroxidáz. Poté byly řezy promyty 2 x 5 minut v PBS. Následovala inkubace v roztoku 2 % séra ředěného v 1 % BSA pufru (1 % bovine serum albumine rozpuštěný v PBS s 0,3 % Tritonem-X) po dobu 1 hodiny pro zablokování nespecifického pozadí. Následně se řezy přemístily do roztoku primární protilátky rozpuštěné v 1 % BSA pufru (protilátky: anti-phospho ERK1/2 (Cell Signalling Technologies; 1:1500), anti-phospho GSK3β (Cell Signalling Technologies; 1:600), anti-c-Fos (Calbiochem - Merck; 1:20000). V primární protilátce se řezy inkubovaly přes noc v lednici při 4 °C. Další den byly řezy promyty 3 x 5 minut v 0,3 % BSA pufru a poté inkubovány v sekundární protilátce (1:600) po dobu 1 hodiny (Vectastain Elite ABC Kit – Rabbit IgG; Vector Laboratories). Následovalo další promytí 2 x 5 minut 0,3 % BSA pufrům a inkubace řezů v AB komplexu ředěném v 0,3 % BSA (ředění A 1:400; B 1:400) po dobu 1 hodiny. Řezy byly naposledy promyty 5 minut v 0,3 % BSA a 2 x 5 minut v PBS. Poté se inkubovaly v roztoku 3,3'diaminobenzidinu (DAB; Sigma Aldrich; 10 mg rozpuštěných ve 20 ml PBS + 7 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), který reaguje s peroxidázou obsaženou v AB komplexu a tvoří nerozpustný hnědý produkt. Ten umožní vizualizaci a následnou detekci antigenů primárních protilátek. Po barvení DAB jsme řezy 3 x promyli v PBS a pomocí štětce natahovali na želatinovaná podložní skla. Skla se zaschlými řezy prošla odvodňovací alkoholovou řadou (3 minuty v 70 % ethanolu, 2 x 3 minuty v 96 %



ethanolu a 3 x 3 minuty v xylenu). Následně byla skla pokryta médiem (DPX mountant for histology; Sigma-Aldrich) a překryta krycím sklem.

#### 4.5.3. Analýza signálu

Pomocí světelného mikroskopu Olympus Provis AX70 byly identifikovány značené buňky a digitalizované mikrofotografie v oblasti suprachiasmatických jader. Reprezentativní fotografie pak byly použity pro analýzu signálu v programu ImageJ Fiji (NIH). Zde bylo spočítáno množství buněk obsahujících signál ve ventrolaterální části SCN. Pro daný mozek a protilátku byl spočítán signál minimálně u dvou fotografií, pro  $n=1$  byl následně vytvořen průměr ze spočítaných hodnot.

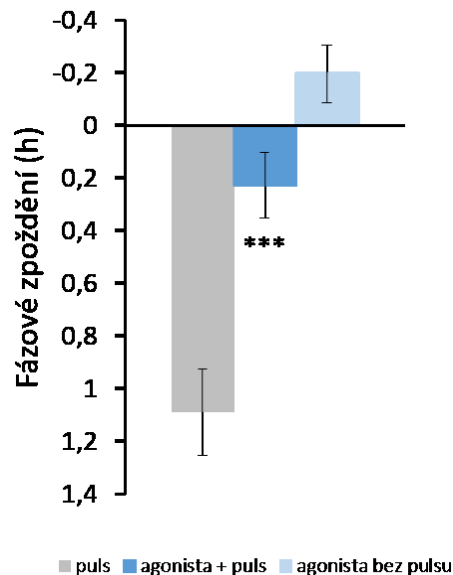
#### 4.6. Statistická analýza

Data z lokomočního záznamu byla vyhodnocena pomocí nepárového t-testu. Počty buněk z imunohistochemického stanovení byly vyjádřeny v procentech maxima pro každý experiment a porovnány mnohočetným t-testem se Sidak Bonferroni post-hoc testem. Výsledky s  $p < 0,05$  byly označeny jako signifikantní.

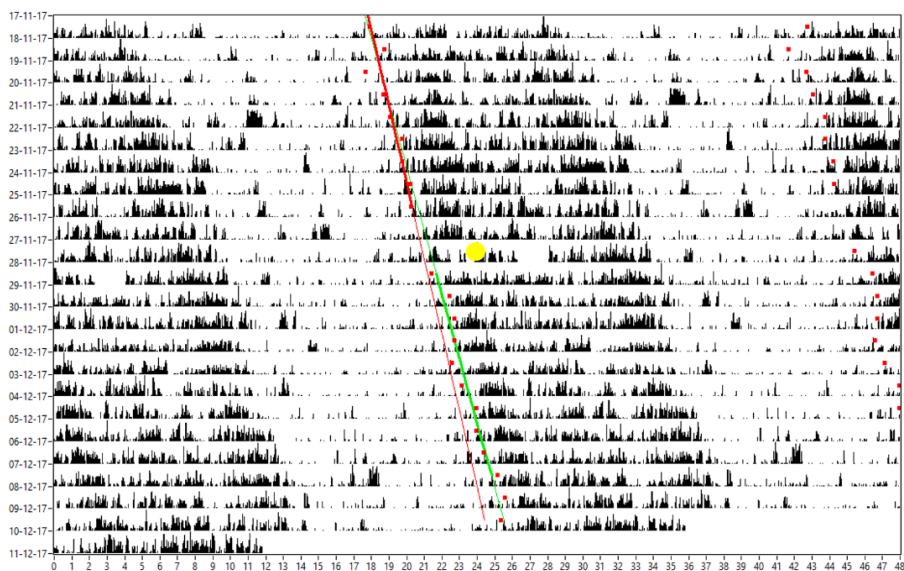
## 5. Výsledky

### 5.1. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na fázový posun v pohybové aktivitě potkana indukovaný světelným pulsem o intenzitě 10 luxů

Světelný puls v CT15 indukoval u kontrolních zvířat bez aplikovaného agonisty či antagonisty fázové zpoždění 1,09 hodiny. Po podání agonisty se světlem indukované fázové zpoždění signifikantně snížilo ( $p = 0,006$ ) na 0,23 hodiny (obr. 8). Aplikace samotného agonisty v CT14,5 vyvolala mírné nesignifikantní fázové předběhnutí. Reprezentativní aktogramy ukazují lokomoční záznam kontrolního potkana (obr. 9) a potkana s podaným agonistou CB1 receptorů a následným pulsem (obr. 10).

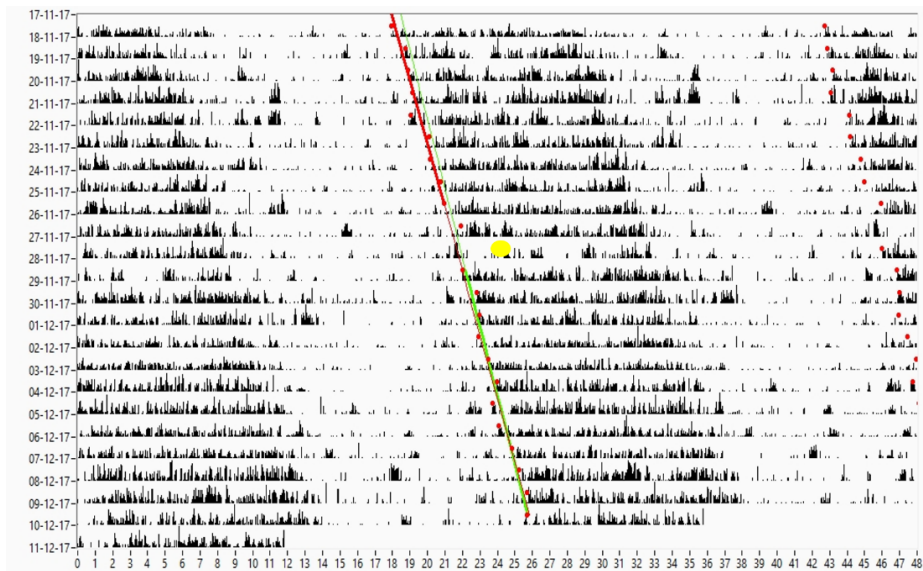


Obr. 8. Velikost fázového posunu u kontrolních potkanů, u potkanů s podaným agonistou CB1 receptorů CP55940 (0,1 mg/kg) před světelným pulsem o intenzitě 10 luxů a u potkanů s agonistou bez světelného pulsu, adaptovaných na světlo o intenzitě 10 luxů; ( $n = 4 - 6$ ); \* $p < 0.05$



Obr. 9. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u kontrolního potkana

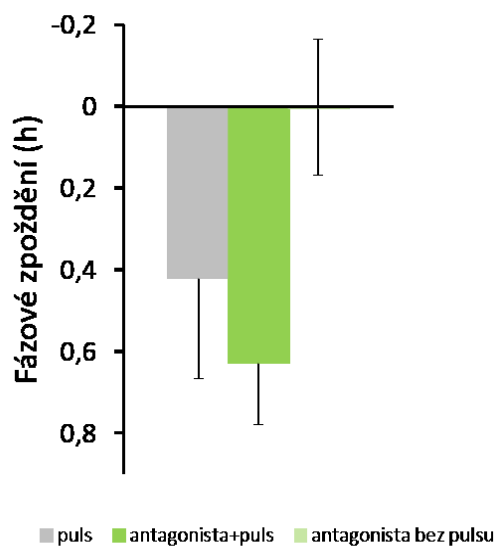
Jeden řádek aktogramu je záznam ze dvou nahrávacích dnů. Husté oblasti zaznamenávají aktivní fázi potkana (bdělý stav), řídké oblasti jsou záznam neaktivní fáze (spánek). Žlutý bod představuje čas podání fyziologického roztoku s DMSO a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).



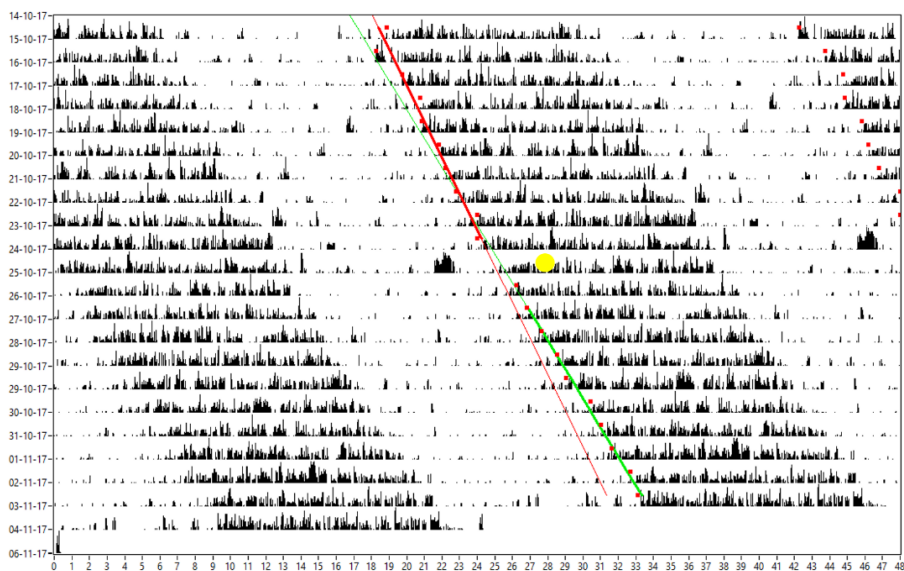
Obr. 10. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u potkana s agonistou CB1 receptorů

Žlutý bod představuje čas podání agonisty CB1 receptorů CP55940 (0,1 mg/kg) a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).

Aplikace antagonisty před světelným pulsem způsobila mírné nesignifikantní zvýšení fázového zpoždění (0,63 h) ve srovnání s kontrolami (0,42 h). Aplikace samotného antagonisty v CT14,5 nevyvolala žádnou fázovou změnu (obr. 11). Reprezentativní aktogramy ukazují lokomoční záznam kontrolního potkana (obr. 12) a potkana s podaným antagonistou CB1 receptorů (obr. 13).

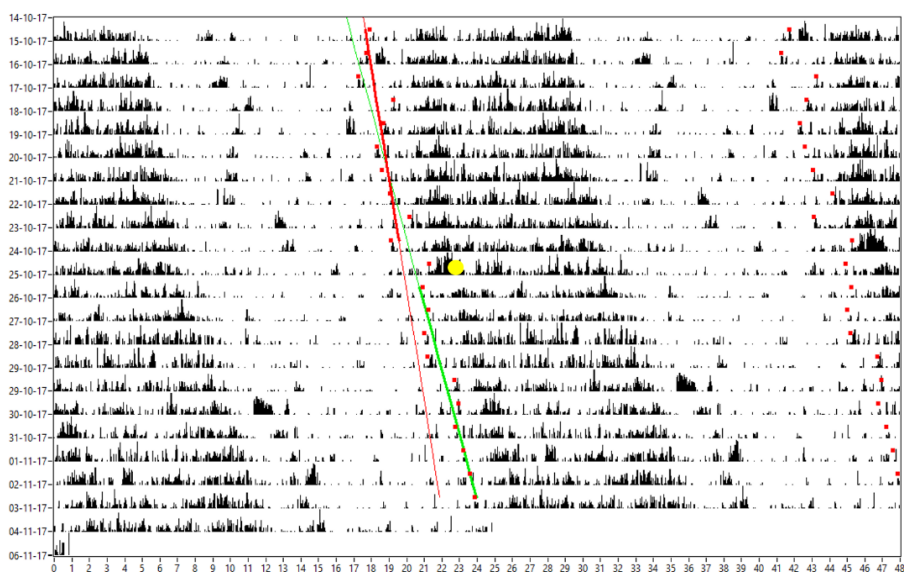


Obr. 11. Velikost fázového posunu u kontrolních potkanů, potkanů s podaným antagonistou CB1 receptorů AM251 (1 mg/kg) před světelným pulsem o intenzitě 10 luxů a u potkanů s antagonistou bez světelného pulsu, adaptovaných na světlo o intenzitě 10 luxů (n = 4 - 6)



Obr. 12. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u kontrolního potkana

Žlutý bod představuje čas podání fyziologického roztoku s DMSO a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun ( $h$ ).

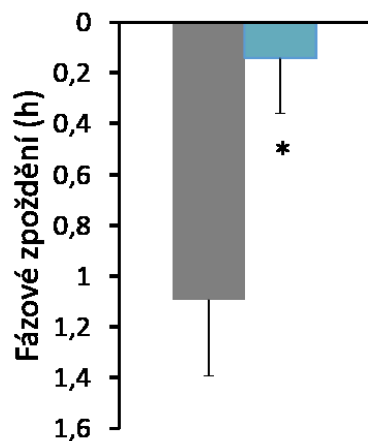


Obr. 13. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u potkana s antagonistou CB1 receptorů

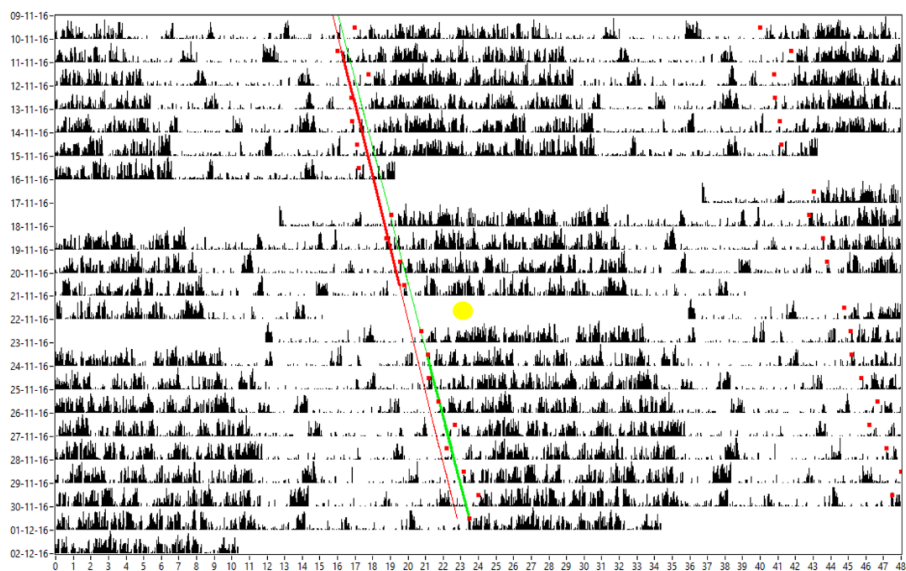
Žlutý bod představuje čas podání antagonisty CB1 receptorů AM251 (1mg/kg) a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun ( $h$ ).

## 5.2. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na fázový posun v pohybové aktivitě potkana indukovaný světelným pulsem o intenzitě 400 luxů

U kontrolních zvířat bez aplikovaného agonisty či antagonisty bylo zaznamenáno fázové zpoždění po světelném pulsu v CT15 1,09 hodiny. Po podání agonisty se světlem indukované fázové zpoždění signifikantně snížilo ( $p = 0,0281$ ) na 0,14 h (obr. 14). Reprezentativní aktogramy ukazují lokomoční záznam kontrolního potkana (obr. 15) a potkana s podaným agonistou CB1 receptorů (obr. 16).

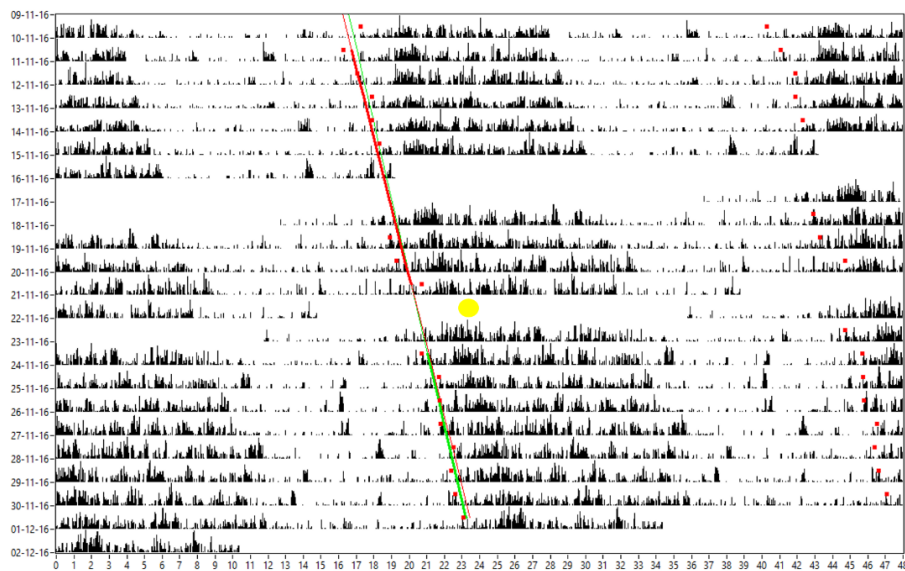


Obr. 14. Velikost fázového posunu u kontrolních potkanů a potkanů s podaným agonistou CB1 receptorů CP55940 (0,1 mg/kg) a následným světelným pulsem v CT15 o intenzitě 400 luxů;  $n = 6$ ;  $*p < 0.05$



Obr. 15. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u kontrolního potkana

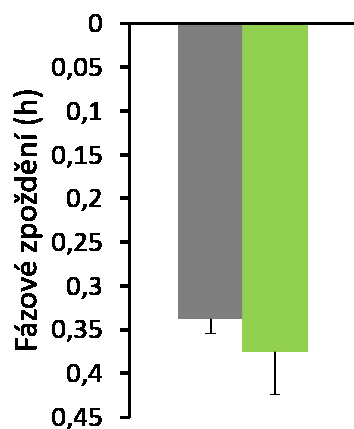
Žlutý bod představuje čas podání fyziologického roztoku s DMSO a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).



Obr. 16. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u potkana s agonistou CB1 receptorů

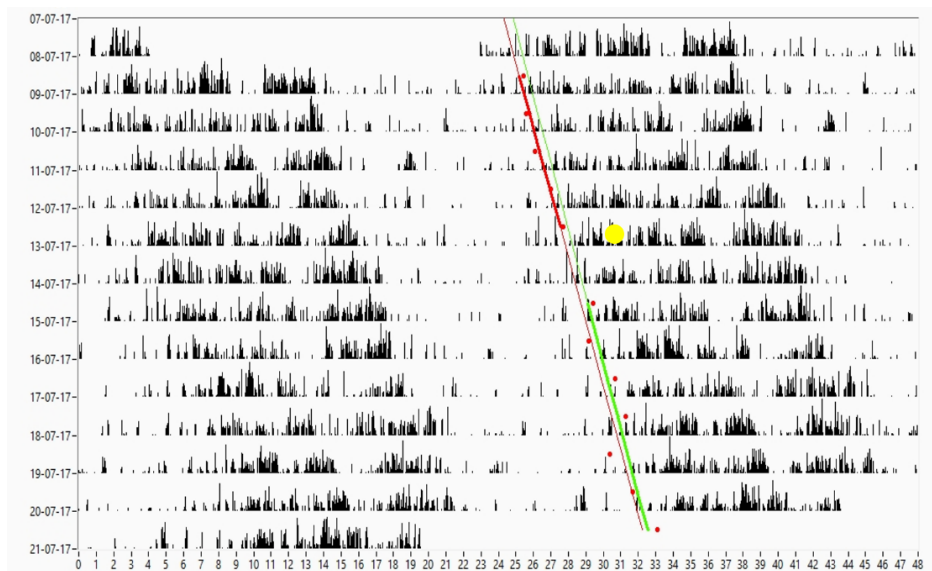
Žlutý bod představuje čas podání agonisty CB1 receptorů CP55940 (0,1 mg/kg) a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).

Aplikace antagonisty před světelným pulsem způsobila mírné nesignifikantní zvýšení fázového zpoždění (0,38 h) ve srovnání s kontrolami (0,34 h; obr. 17). Reprezentativní aktogramy ukazují lokomoční záznam kontrolního potkana (obr. 18) a potkana s podaným agonistou CB1 receptorů (obr. 19).



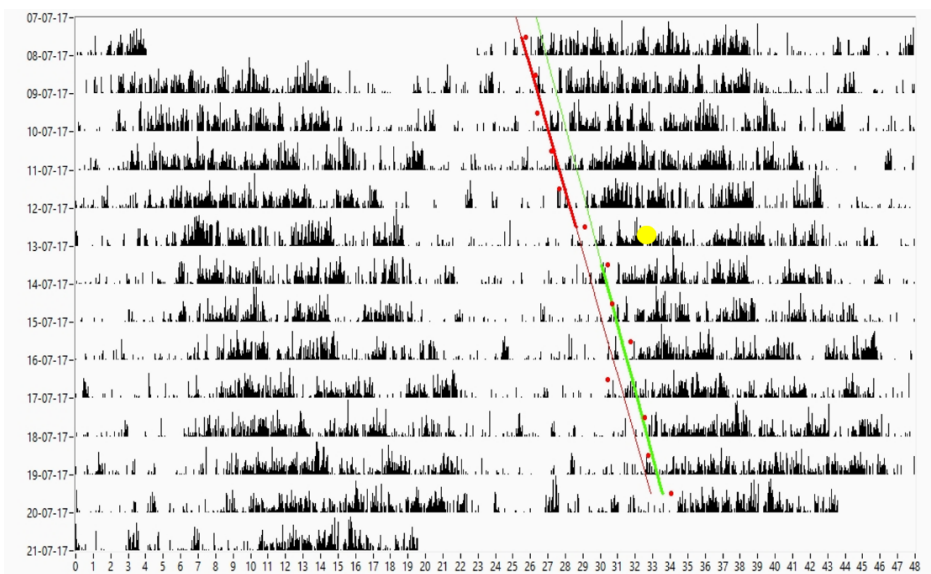
Obr. 17. Velikost fázového posunu u kontrolních potkanů a potkanů s podaným antagonistou CB1 receptorů AM251 (1 mg/kg) a následným světelným pulsem o intenzitě 10 luxů; n = 4





Obr. 18. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u kontrolního potkana

Žlutý bod představuje čas podání fyziologického roztoku s DMSO a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).



Obr. 19. Reprezentativní aktogram ukazuje fázový posun po světelném pulsu u potkana s agonistou CB1 receptorů

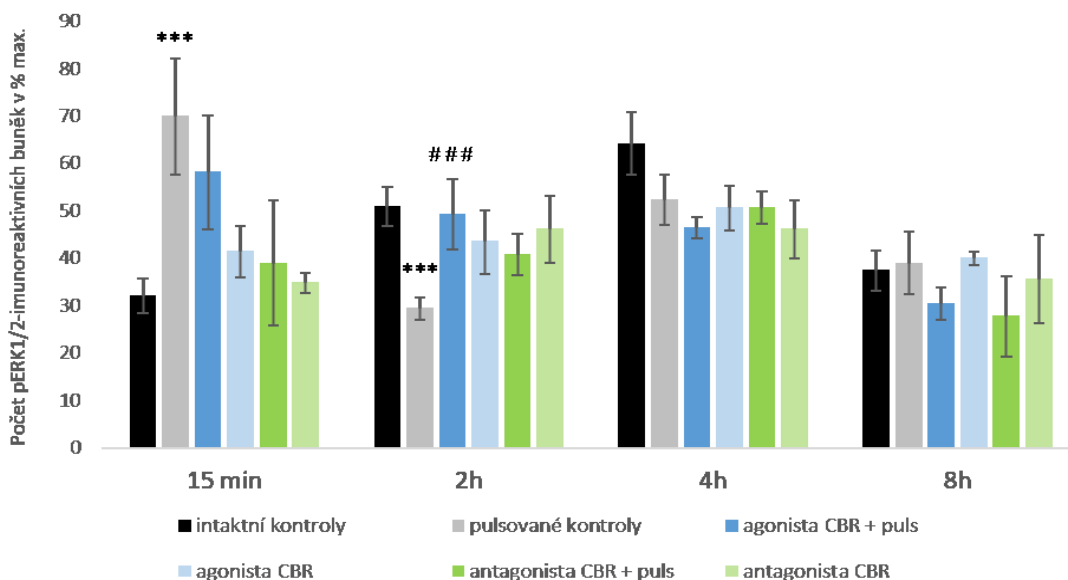
Žlutý bod představuje čas podání antagonisty CB1 receptorů AM251 (1 mg/kg) a následný světelný puls v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu před světelným pulsem, zelená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulsu. Úhel mezi oběma liniemi vyjadřuje fázový posun (h).

### 5.3. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na hladiny světlem indukovaných markerů v SCN potkanů adaptovaných na nízkou intenzitu světla (10 luxů)

Pomocí imunohistochemie byla stanovena hladina proteinů c-Fos a fosforylovaných forem kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  ve ventrolaterální části SCN potkanů.

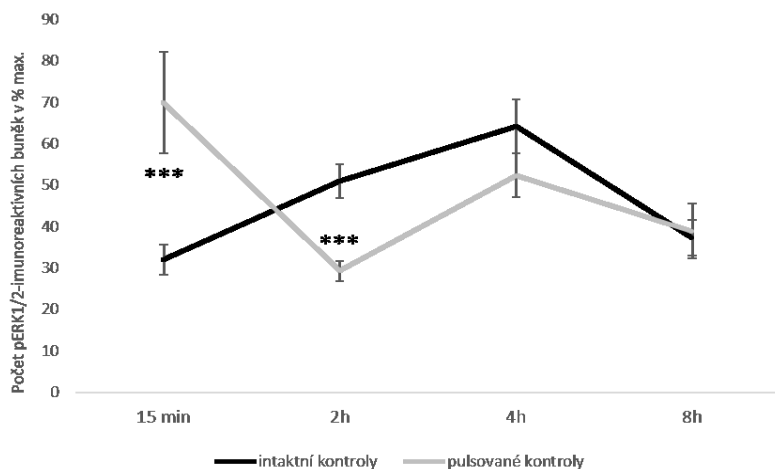
#### 5.3.1. Hladiny kinázy pERK1/2

Samotný světelný puls v CT15 způsobil okamžitý nárůst hladiny pERK1/2 15 minut po pulsu oproti intaktním, nepulsovaným kontrolám ( $p = 0,003$ ). V čase 2 hodiny po světelném pulsu jsme naopak zaznamenali výrazný pokles hladiny pERK1/2 u pulsovaných kontrol oproti hodnotám u intaktních kontrol ( $p = 0,001$ ; obr. 20, 21 a 22). Po podání agonisty CB1 receptorů a následném světelném pulsu byl tento efekt potlačen, hladina kinázy pERK1/2 byla 2 hodiny po pulsu srovnatelná s kontrolami a signifikantně vyšší než u pulsované skupiny ( $p = 0,009$ ; obr. 20 a 23). U ostatních experimentálních skupin a v časech 4 hodiny a 8 hodin po pulsu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny (obr. 20).

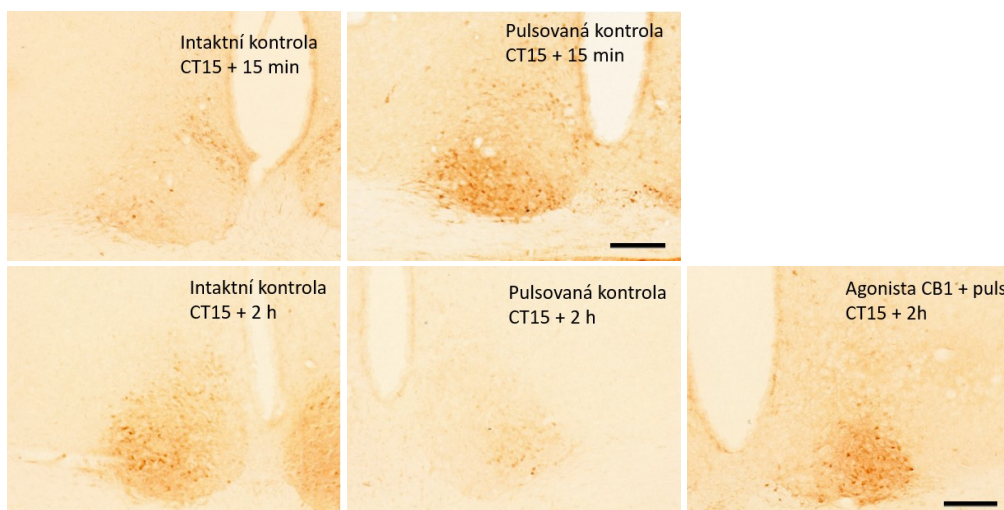


Obr. 20. Počet pERK1/2-*imunopozitivních buněk v procentech maxima ve ventrolaterálním SCN u potkanů adaptovaných na nízkou intenzitu světla (10 luxů). Hladina kinázy pERK1/2 byla určena v časech 15 min, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu aplikovaném v CT15 (10 luxů), u kontrol v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3 - 4 hodnot  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.01$ ; ### $p < 0.01$*

\*porovnání s intaktními kontrolami v daném časovém bodě; #porovnání s pulsovanými kontrolami v daném časovém bodě



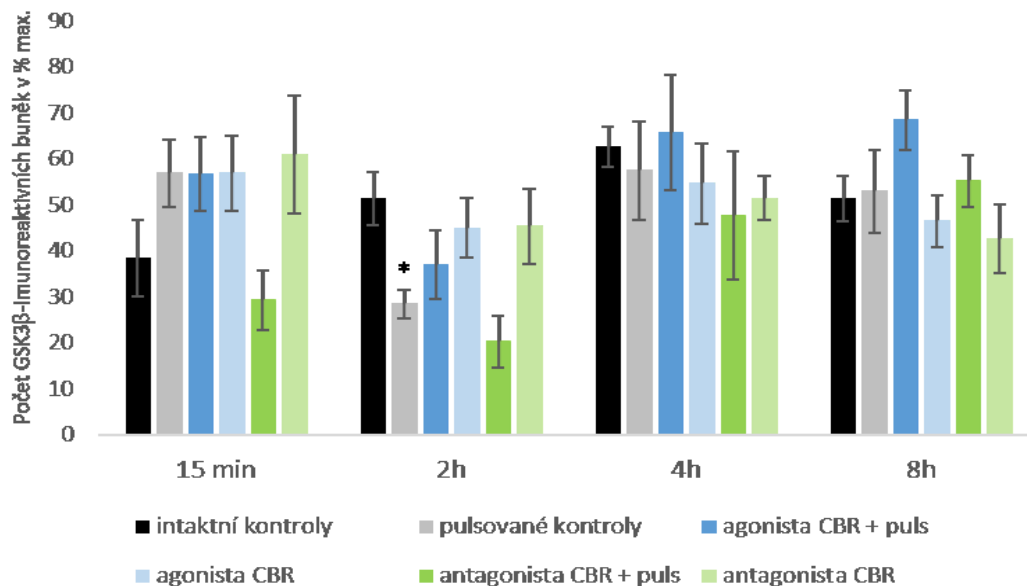
Obr. 21. Vliv světelného pulsu v CT15 (10 luxů) na změnu hladin pERK1/2 ve ventrolaterální části SCN u intaktních kontrol (černá linie) a kontrol se světelným pulsem (šedá linie) v časech 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po CT15. Potkani byli adaptováni na světlo o nízké intenzitě 10 luxů. \*\*\*  $p < 0.01$



Obr. 22. Reprezentativní mikrofotografie řezů SCN ukazující rozdílnou expresi pERK1/2 u intaktních kontrol (vlevo), kontrol se světelným pulsem v CT15 (uprostřed) a potkanů s agonistou CB1 receptorů CP55940 a následným světelným pulsem (vpravo) v časech 15 minut a 2 hodiny po světelném pulsu v CT15. Úsečka = 200  $\mu\text{m}$

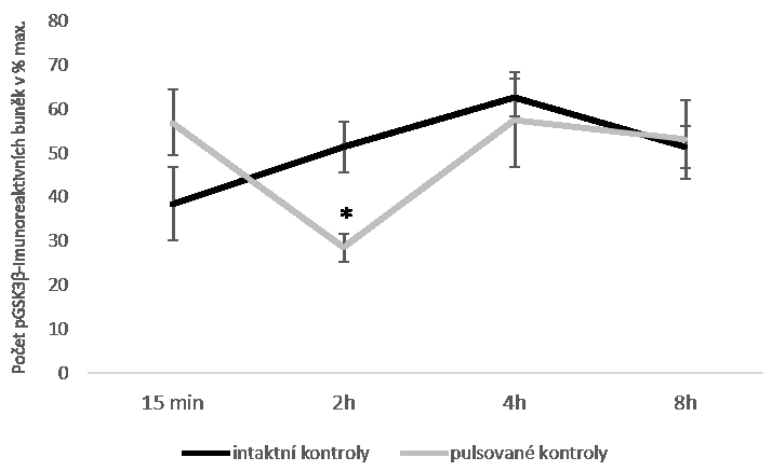
### 5.3.2. Hladiny kinázy pGSK3 $\beta$

Samotný světelný puls v CT15 měl vliv na snížení hladin pGSK3 $\beta$  v čase 2 hodiny po CT15 ( $p = 0,012$ ) ve srovnání s intaktními kontrolami (obr. 23, 24). Agonista ani antagonist CB1 receptorů neměl signifikantní efekt na hladiny pGSK3 $\beta$  v žádném časovém bodě (obr. 23).

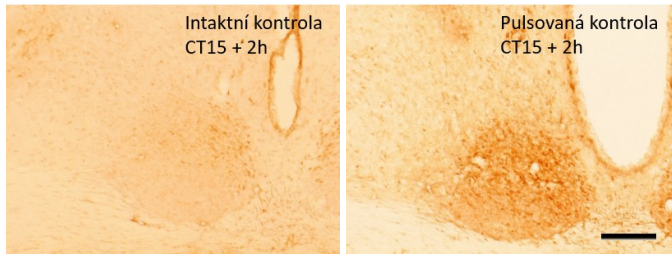


Obr. 23. Počet pGSK3 $\beta$ -imunopozitivních buněk v procentech maxima ve ventrolaterálním SCN u potkanů adaptovaných na nízkou intenzitu světla (10 luxů). Hladina kinázy pGSK3 $\beta$  byla určena v časech 15 min, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu aplikovaném v CT15 (10 luxů), u kontrol v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3 - 4 hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka. \* $p < 0.05$

\* porovnání s intaktními kontrolami v daném časovém bodě



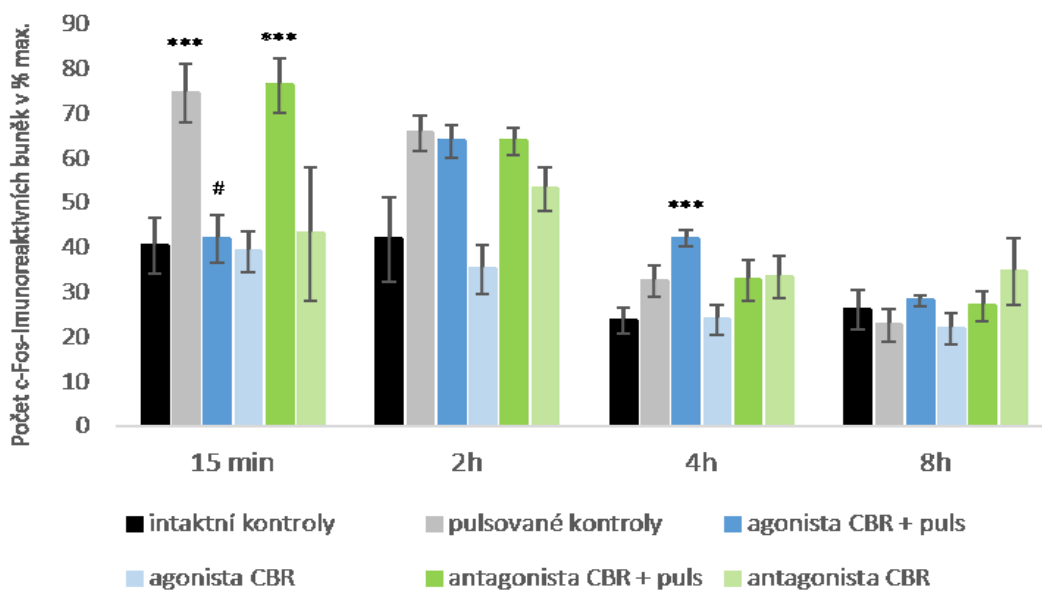
Obr. 24. Vliv světelného pulsu v CT15 (10 luxů) na změnu hladiny pGSK3 $\beta$  ve ventrolaterální části SCN u intaktních kontrol (černá linie) a kontrol se světelným pulsem (šedá linie) v časech 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po CT15. Potkani byli adaptováni na světlo o nízké intenzitě 10 luxů. \* $p < 0.05$



Obr. 25. Reprezentativní mikrofotografie řezů SCN ukazující rozdílnou expresi pGSK3 $\beta$  u intaktních kontrol (vlevo) a kontrol se světelným pulsem v CT15 (vpravo) v čase 2 hodiny po světelném pulsu v CT15. Úsečka = 200  $\mu$ m

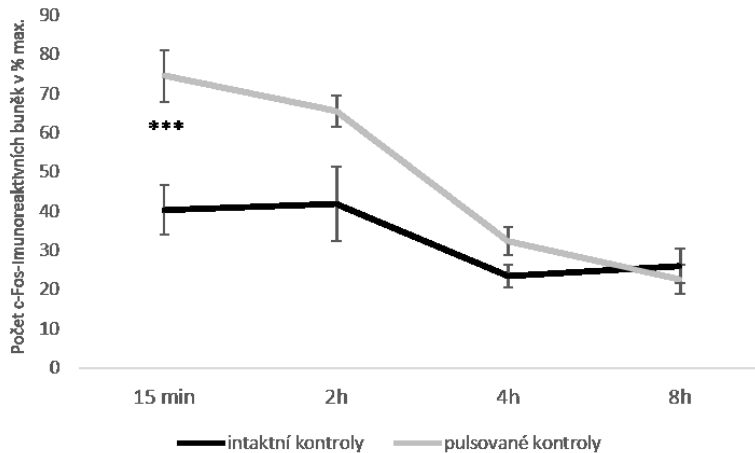
### 5.3.3. Hladiny proteinu c-Fos

Světelný puls v CT15 způsobil okamžitý nárůst exprese proteinu c-Fos ve ventrolaterální části SCN potkana v čase již 15 minut po pulsu ( $p = 0,0003$ ; viz obr. 26, 27 a 28). Agonista CB1 receptorů s následným pulsem naopak snížil hladinu c-Fos oproti pulsovaným kontrolám ( $p = 0,012$ ) v čase 15 minut po pulsu. Antagonista CB1 receptorů měl účinek na světlem indukovanou hladinu c-Fos a počet značených buněk podobný jako ve skupině se samotným světelným pulsem (antagonista + puls vs intaktní kontroly;  $p < 0,0009$ ). Čtyři hodiny po světelném pulsu v CT15 způsobil agonista CB1 receptorů s pulsem signifikantní zvýšení hladin c-Fos oproti intaktním kontrolám ( $p < 0,0001$ ). U ostatních experimentálních skupin a v časech 2 hodiny a 8 hodin po pulsu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny (obr. 26).

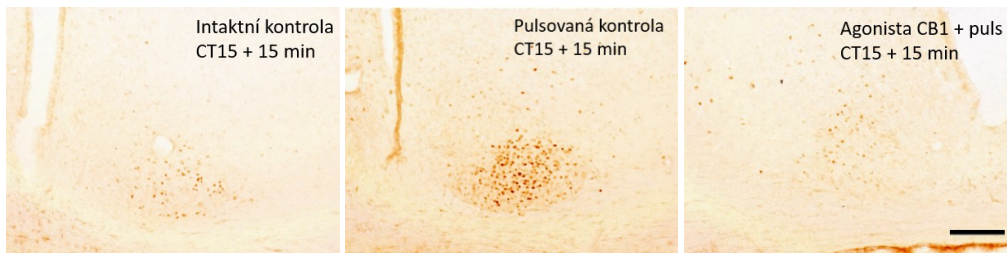


Obr. 26. Počet c-Fos-imunopozitivních buněk v procentech maxima ve ventrolaterálním SCN u potkanů adaptovaných na nízkou intenzitu světla (10 luxů). Hladina proteinů c-Fos byla určena v časech 15 min, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu aplikovaném v CT15 (10 luxů), u kontrol v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3 - 4 hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka. \*\*\* $p < 0.01$

\* porovnání s intaktními kontrolami v daném časovém bodě



Obr. 27. Vliv světelného pulsu v CT15 (10 luxů) na změnu hladiny proteinu c-Fos ve ventrolaterální části SCN u intaktních kontrol (černá linie) a kontrol se světelným pulsem (šedá linie) v časech 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po CT15. Potkani byli adaptováni na světlo o nízké intenzitě 10 luxů. \*\*\* $p < 0.01$

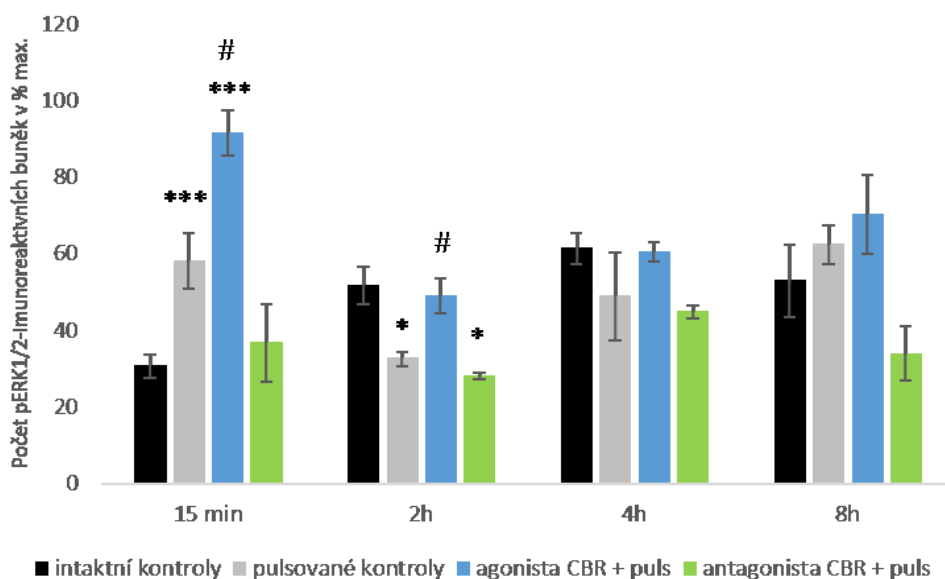


Obr. 28. Reprezentativní mikrofotografie řezů SCN ukazující rozdílnou expresi c-Fos u intaktních kontrol (vlevo), kontrol s pulsem v CT15 (uprostřed) a potkanů s agonistou CB1 receptorů CP55940 a následným světelným pulsem (vpravo) v čase 15 minut po světelném pulsu v CT15. Úsečka = 200  $\mu$ m

## 5.4. Vliv agonisty/antagonisty CB1 receptorů na hladiny světlem indukovaných markerů v SCN potkanů adaptovaných na vysokou intenzitu světla (400 luxů)

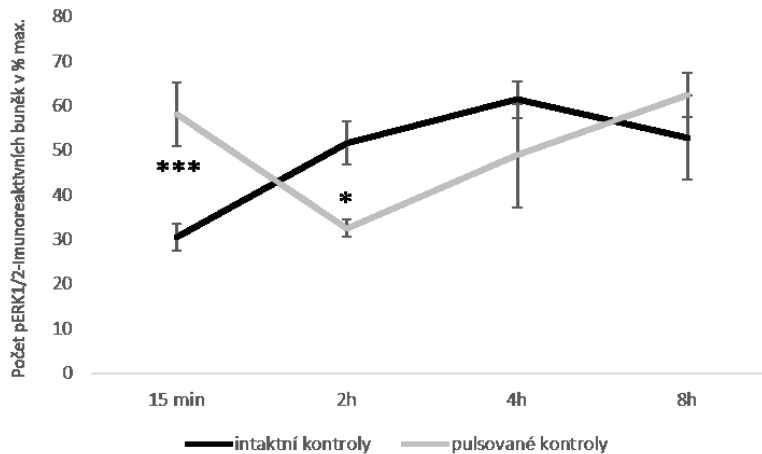
### 5.4.1. Hladiny kinázy pERK1/2

Po aplikaci světelného pulsu v CT15 byl patrný významný nárůst pERK1/2 již 15 minut po pulsu ( $p = 0,006$ ) a následný signifikantní pokles 2 hodiny po pulsu ve srovnání s intaktními kontrolami ( $p = 0,013$ ; obr. 29, 30, 31). Agonista CB1 receptorů před světelným pulsem zesílil světlem indukované zvýšení pERK1/2 15 minut po pulsu oproti intaktním kontrolám ( $p = 0,00005$ ). Tento nárůst je signifikantní také ve srovnání s pulsovanými kontrolami ( $p = 0,019$ ). V čase 2 hodiny po pulsu inhiboval agonista CB1 receptorů pokles hladiny pERK1/2 oproti pulsovaným kontrolám ( $p = 0,013$ ). Antagonista CB1 receptorů neměl žádný efekt a hladina pERK1/2 zůstala snižená ve srovnání s intaktními kontrolami ( $p = 0,011$ ), jako u pulsované skupiny bez agonisty či antagonisty (obr 29).



Obr. 29. Počet pERK1/2-*immunopozitivních buněk v procentech maxima ve ventrolaterálním SCN u potkanů adaptovaných na vysokou intenzitu světla (400 luxů). Hladina pERK1/2 byla určena v časech 15 min, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu aplikovaném v CT15 (400 luxů), u kontrol v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3 - 4 hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka. \*\*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$*

\* porovnání s intaktními kontrolami v daném časovém bodě; # porovnání s pulsovanými kontrolami v daném časovém bodě

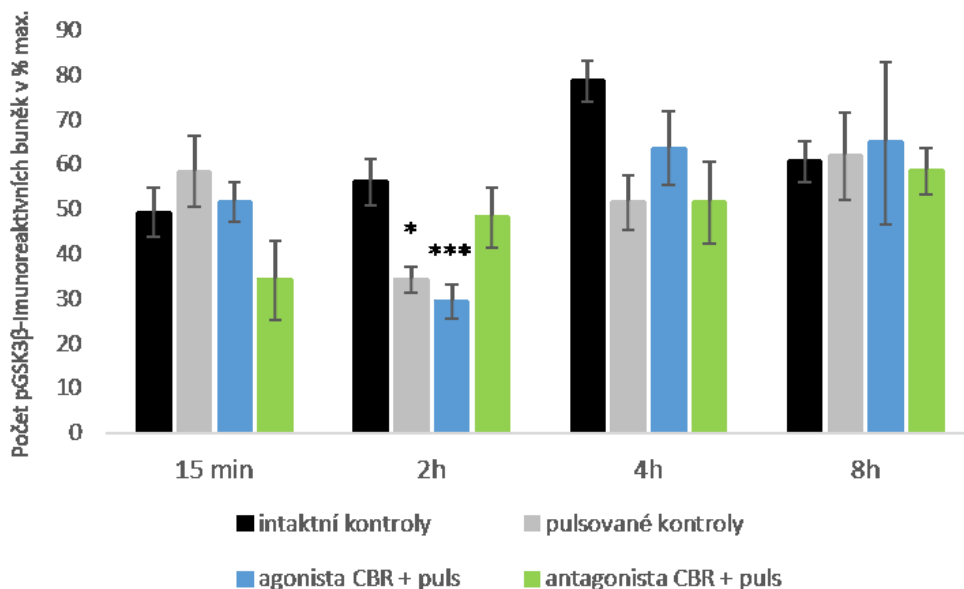


Obr. 30. Vliv světelného pulsu v CT15 na změnu hladiny pERK1/2 ve ventrolaterální části SCN u intaktních kontrol (černá linie) a kontrol se světelným pulsem (šedá linie) v časech 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu v aplikovaném v CT15. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.01$

#### 5.4.2. Hladiny kinázy pGSK3 $\beta$

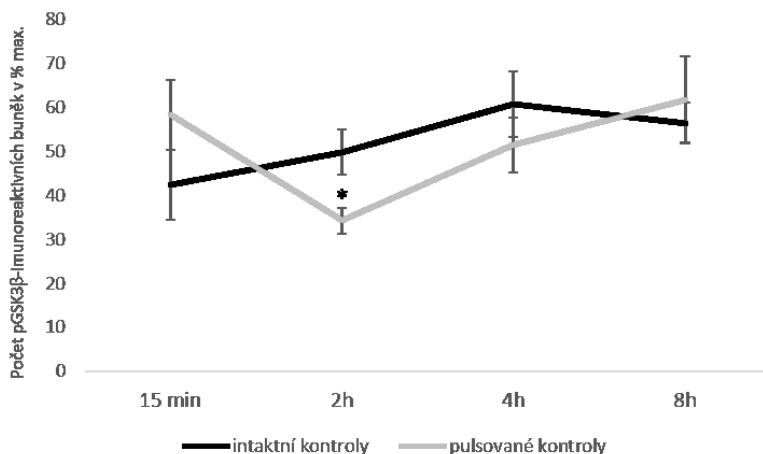
Hladina pGSK3 $\beta$  byla signifikantně snížena u skupiny pulsovaných kontrol oproti intaktním kontrolám v čase 2 hodiny po světelném pulsu ( $p = 0,024$ ; obr. 31, 32) a ještě významněji snížena při podání agonisty CB1 receptorů se světelným pulsem oproti intaktním kontrolám ( $p = 0,008$ ; obr. 31). V jiných experimentálních skupinách a časových bodech nebyla zaznamenána signifikantní změna hladin pGSK3 $\beta$  (obr. 31).





Obr. 31. Počet pGSK3β -imunopozitivních buněk v procentech maxima ve ventrolaterálním SCN u potkanů adaptovaných na vysokou intenzitu světla (400 luxů). Hladina pGSK3β byla určena v časech 15 min, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu aplikovaném v CT15 (400 luxů), u kontrol v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3 - 4 hodnot ± směrodatná odchylka. \*\*\*p < 0.01; \*p < 0.05

\* porovnání s intaktními kontrolami v daném časovém bodě



Obr. 32. Vliv světelného pulsu v CT15 na změnu hladiny pGSK3β ve ventrolaterální části SCN u intaktních kontrol (černá linie) a kontrol se světelným pulsem (šedá linie) v časech 15 minut, 2, 4 a 8 hodin po světelném pulsu v aplikovaném v CT15. \*p < 0.05

## 6. Diskuze

Endokanabinoidní systém je velmi rozšířeným systémem v mozku savců, který má schopnost modulovat synaptický přenos mezi jednotlivými neurony. Hladiny endogenních kanabinoidů a jejich receptorů vykazují rytmické oscilace v mozku savců s 24hodinovou periodou (Valenti et al., 2004). ECS je tedy pravděpodobně cirkadiánně regulován, a tudíž pod vlivem cirkadiánního pacemakeru v SCN hypotalamu. Zajímavou otázkou je, jak ECS ovlivňuje samotný cirkadiánní systém. V SCN myši a křečka byl popsán výskyt kanabinoidních receptorů typu CB1 (Sanford et al., 2008; Wittmann et al., 2007) a víme také, že aplikace agonisty CB1 receptorů *in vitro* zvyšuje frekvenci akčních potenciálů v SCN (Acuna-Goycolea et al., 2010). Cílem této práce bylo ověřit účinky kanabinoidní aktivace na fázový posun v lokomoční aktivitě a zjistit, jestli ECS ovlivňuje také světlem modulovanou hladinu některých molekul v SCN, které se účastní procesu synchronizace cirkadiánního pacemakeru se světelnými podmínkami. Naše výsledky ukázaly, že agonista CB1 receptorů může změnit světlem indukovanou expresi c-Fos a aktivitu kinázy ERK1/2 a naznačily tak, že modulační účinky agonisty CB1 receptoru na světlem indukovaný posun v rytmu pohybové aktivity, mohou odrážet změnu v nastavení samotného cirkadiánního pacemakeru v SCN.

### 6.1. Fázový posun v pohybové aktivitě

Dřívější studie ukázaly, že aktivace kanabinoidních receptorů výrazně potlačuje velikost fázového posunu v lokomoční aktivitě křečka (Sanford et al., 2008) a myši (Acuna-Goycolea et al., 2010). My jsme se pokusili tato zjištění ověřit a zjistit vliv agonisty CP55940 (0,1 mg/kg) a antagonisty AM251 (1 mg/kg) CB1 receptorů na velikost fázového zpoždění v lokomoční aktivitě potkana po aplikaci světelného pulsu v průběhu první poloviny subjektivní noci v CT15. Koncentrace látek byla zvolena s ohledem na jejich účinky ve studii Sanford et al., (2008). Experimenty byly prováděny primárně při nízké intenzitě světla (10 luxů), protože cirkadiánní systém nočních hlodavců je velmi citlivý na světlo a přílišná saturace světlem by mohla potlačit jemné modulační účinky kanabinoidní signalizace. Dřívější studie mechanismů světelné synchronizace uvádějí, že prahová intenzita bílého světla pro synchronizaci a fázový posun rytmu

pohybové aktivity nočních laboratorních hlodavců je 0,1 luxů, naopak saturační intenzita, při které se fázové posuny již nezvětšují, je uváděna mezi 100 a 300 luxy, v závislosti na typu experimentu (Nelson and Takahashi, 1991). Pro srovnání byla většina experimentů zopakována při vysoké intenzitě světla (400 luxů), běžně používané v cirkadiálních experimentech.

Výsledky z našich experimentů potvrdily, že agonista CB1 receptorů CP55940 signifikantně snižuje fázové zpoždění v lokomoční aktivitě. Tento efekt jsme pozorovali v obou světelných podmínkách. Podání agonisty 30 minut před světelným pulsem o nízké intenzitě vedlo ke snížení fázového zpoždění o 79 % ve srovnání s kontrolami. Po pulsu o vysoké intenzitě byl tento efekt ještě výraznější, s poklesem o 87 %. Aktivace CB1 receptorů měla v našich experimentech větší vliv na fázový posun než ve studii Acuna-Goycolea et al., (2010), kde byla pozorována inhibice fázového zpoždění v lokomoční aktivitě myši o cca 60 % po aplikaci agonisty CB1 receptorů WIN55 a světelném pulsu v CT16. Studie Sanford et al., (2008) popsala vliv aktivace kanabinoidních receptorů také na fázové předběhnutí. Agonista CP55940 snížil efekt světelného pulsu v CT19 na fázové předběhnutí v lokomoční aktivitě křečka o 90 %.

Podání samotného agonisty CP55940 bez světelného pulsu způsobilo mírné, nesignifikantní fázové předběhnutí v lokomoční aktivitě. Naše výsledky se shodují se studiemi Acuna-Goycolea et al., (2010) a Sanford et al., (2008), ve kterých samotný agonista CP55940 ani agonista WIN55 také neměly žádný významný efekt na lokomoční rytmus. Antagonista AM251 aplikovaný 30 min před světelným pulsem v CT15 neměl signifikantní vliv na velikost fázového posunu v podmínkách nízké ani vysoké intenzity světla. Také ve studii Sanford et al., (2008) nebyl pozorován žádný efekt antagonisty LY320135 na fázový posun. Podání samotného antagonisty bez světelného pulsu nevedlo v našich experimentech k žádné změně v lokomoční aktivitě potkanů. Studie Acuna-Goycolea et al., (2010) popsala naopak indukci mírného fázového zpoždění samotným antagonistou AM251. Podání antagonisty AM251 současně s agonistou CP55940 zcela zablokovalo jeho inhibici fázového posunu a světlo u těchto zvířat indukovalo fázový posun stejně jako u kontrolních zvířat (Sanford et al., 2008). V našich experimentech s vysokou intenzitou světla nebyla zavedena skupina zvířat se samotnou účinnou látkou bez světelného pulsu. Důvodem byl nedostatek laboratorních zvířat, který nás nutil k rozhodnutí některou pokusnou skupinu vynechat. Vzhledem k tomu, že naše výsledky s nízkou intenzitou byly podobné

předchozím studiím (Acuna-Goycolea et al., 2010; Sanford et al., 2008) a nepřinesly výraznou změnu, rozhodli jsme se vynechat tyto experimentální skupiny.

Naše výsledky potvrzují dříve zjištěné poznatky, že systémové podání modulátorů endokanabinoidního systému potkana zasahuje do synchronizace cirkadiálního systému se světlem. Zablokování CB1 receptorů nemá žádný efekt na světlem indukovaný fázový posun, což naznačuje, že endogenní kanabinoidní systém nemá v tomto procesu svojí fyziologickou funkci a modulace cirkadiálního systému nastává pouze po exogenní stimulaci CB1 receptorů. Je však také možné, že hladina endokanabinoidů v hypotalamu je na začátku subjektivní noci nízká (Murillo-Rodriguez et al., 2006) a pouhé zablokování jejich receptorů nemá v této době fyziologický význam, který by mohlo získat v jiné denní dobu.

## 6.2. Světlem indukované markery VL SCN

Mechanismus, jakým kanabinoidní aktivace ovlivňuje synchronizaci cirkadiálního systému, může zahrnovat vstup synchronizujících informací do SCN (z RHT, IGL či rapheálních jader), intercelulární komunikaci mezi buňkami SCN, nebo výstupní signály z SCN. Abychom zjistili, zda ovlivnění světelné synchronizace kanabinoidní signalizací je pozorovatelné přímo v neuronech SCN, stanovili jsme zde hladiny proteinů reagujících na světlo, a to v několika časech po působení světelného pulsu na organismus v subjektivní noci (CT15). Expresí světločivných markerů byla imunohistochemicky stanovena ve ventrolaterální části SCN potkana, jelikož tato část přijímá informace o světle z RHT a hraje zásadní roli v adaptaci cirkadiálního pacemakeru na světelné podmínky.

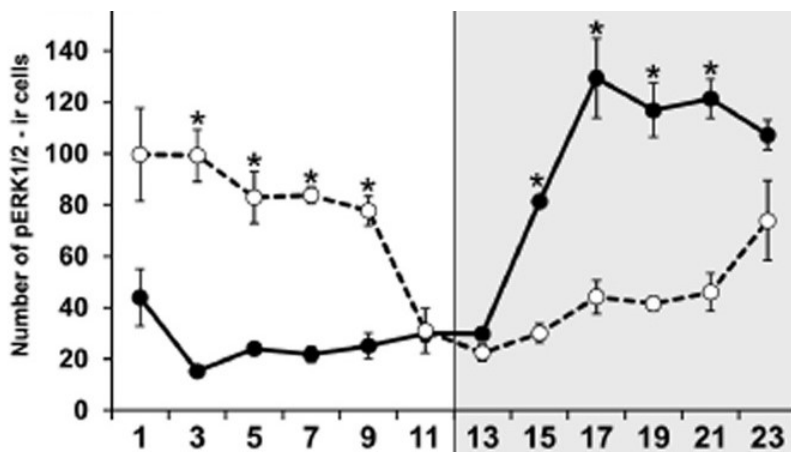
### 6.2.1. Kináza ERK1/2

Zjišťovali jsme aktivitu kinázy ERK1/2 značením její fosforylované formy. U kontrol pulsovaných světlem s vysokou i nízkou intenzitou jsme zaznamenali vysoký nárůst hladiny pERK1/2 v čase 15 minut po pulsu. V čase 2 hodiny po pulsu jsme pozorovali naopak signifikantní pokles pERK1/2 u pulsovaných kontrol pod bazální hladiny intaktních kontrol. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které také ukázaly přechodný nárůst pERK1/2 v reakci na světelný puls v subjektivní noci na myších i potkaních modelech (Butcher et al., 2003; Červená

et al., 2015; Coogan and Piggins, 2003; Obrietan et al., 1998). Butcher et al., (2003) popisuje nejvyšší hladinu pERK1/2 právě 15 min po světelném pulsu v subjektivní noci (CT15), která se po 45 minutách vrací zpět na svou bazální hladinu, a 60 - 120 min po pulsu je pak patrný signifikantní pokles pod hladiny u kontrol. Předchozí studie naší laboratoře popisuje dlouhodobě snížené hladiny pERK1/2 pod bazální hladinu v časech 2, 4, 6 a 8 hodin po pulsu v CT15 (Červená et al., 2015). Naše výsledky ukazují mírné snížení hladiny oproti kontrolám také v čase 4 hodiny po pulsu.

Agonista CB1 receptorů CP55940 30 min před světelným pulsem v CT15 potlačil světlem indukovaný pokles hladiny pERK1/2 v čase 2 hodiny po pulsu a vyrovnal hladinu pERK1/2 na úroveň intaktních kontrol. Tento efekt byl signifikantní při nízké i vysoké intenzitě pulsu. Antagonista CB1 receptorů AM251 s následným pulsem o intenzitě 400 luxů neměl žádný vliv na hladinu světlem indukovaného pERK1/2, hodnoty této skupiny byly podobné jako u pulsovaných kontrol.

Kináza ERK1/2 patří do rodiny MAP kináz. MAP kinázová dráha je rozšířenou buněčnou dráhou, která může reagovat na široké spektrum stimulů. ERK1/2 je poslední kinázou této dráhy, její aktivita je spouštěna pomocí nadřazených MAP kináz (Raf-MEK-ERK), které se navzájem fosforylují a tím aktivují (Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013). Aktivovaná kináza ERK1/2 se v SCN přesouvá do jádra, kde může ovlivňovat transkripci hodinových genů (Dziema et al., 2003). Hladiny pERK1/2 jsou v neuronech SCN cirkadiánně regulovány, avšak hladiny samotné kinázy ERK1/2 se s časem nemění, regulace její aktivity je tedy na úrovni regulace kináz a fosfatáz, které ji modifikují. Pokles pERK1/2 je spojen se zvýšenou expresí fosfatázy MKP-1 (MAPK-dependent phosphatase-1), která defosforyluje pERK1/2 a inaktivuje tuto kinázu. MKP-1 a MKP-3 jsou exprimovány v SCN (Butcher et al., 2003). Fosforylace ERK1/2 má opačný cirkadiánní rytmus v obou částech SCN. V DM SCN vykazuje vysoké hladiny přes den a nízké v noci, zatímco ve VL SCN je patrný nárůst během noci (Lee et al., 2003; Obrietan et al., 1998; Pačesová et al., 2015; obr. 34). Výskyt pERK1/2 ve VL SCN je podmíněn synaptickým spojením s RHT (Lee et al., 2003).



Obr. 34. Časový profil pERK1/2 ve VL SCN (souvislá linie) a DM SCN (přerušovaná linie). Převzato podle Pačesová et al., (2015)

Aktivace ERK1/2 je indukována světelným pulsem v subjektivní noci, nikoliv ve dne (Obrietan et al., 1998). Aktivace této kinázy v subjektivní noci je zřejmě jedním z mechanismů vzniku fázového posunu. Narušení signalizace ERK1/2 v SCN totiž blokuje fázové zpoždění (Butcher et al., 2002), transkripci genů přes transkripční faktor CREB i expresi světlem indukovaných časných genů (Dziema et al., 2003). Pokles aktivity kinázy ERK1/2 2 hodiny po pulsu může mít také svoji roli ve světelné synchronizaci molekulárních hodin v SCN. Nárůst i následný pokles pod kontrolní hladiny je pozorován po aplikaci světla během brzké i pozdní subjektivní noci, vedoucí k fázovému zpoždění i předběhnutí (Červená et al., 2015; Obrietan et al., 1998).

Fyziologický význam indukovaného poklesu byl popsán např. na expresi hodinového genu *Per1*. Nesvětelný podnět v době subjektivního dne způsobí pokles exprese *Per1* a fázové předběhnutí cirkadiánních rytmů (Maywood et al., 1999). Kromě poklesu exprese *Per1* je po nesvětelném stimulu pozorován také pokles pERK1/2 (Antle et al., 2008; Coogan and Piggins, 2005).

Po aplikaci světelného pulsu v subjektivní noci nastává tzv. refrakterní perioda, kdy cirkadiánní systém není schopný reagovat na další světelný puls. Interval mezi pulsy musí být cca 2 hodiny, aby druhý puls vedl k plnohodnotnému fázovému posunu (Best et al., 1999). Puls aplikovaný pouze 1 hodinu po prvním pulsu vede sice k indukci některých změn na molekulární úrovni, např. fosforylaci transkripčního faktoru CREB, tato doba ale není dostatečná pro celkový posun rytmů pozorovatelný v lokomoční aktivitě. Pro vznik fázového posunu celého systému

zřejmě není důležitá jen okamžitá indukce genové exprese, ale i buněčné mechanismy odehrávající se v neuronech během intervalu této refrakterní periody (Best et al., 1999). Tím může být například zmíněný pokles aktivity kinázy ERK1/2.

Pokud je pokles pERK1/2 pod bazální hladiny v čase 2 hodiny po pulsu důležitý pro fázový posun, potlačení tohoto poklesu by mohlo být součástí mechanismu, jakým aktivace CB1 receptorů inhibuje fázové zpoždění, které pozorujeme v lokomoční aktivitě. Jaký má ale modulace hladin pERK1/2 v SCN význam, se ukáže až ve chvíli, kdy se bude zřejmá fyziologická funkce této kinázy v procesu světelné synchronizace.

Agonista CB1 receptorů, aplikovaný před světelným pulsem o intenzitě 400 luxů (nikoliv 10 luxů) měl výrazný efekt na zvýšení hladin pERK1/2 15 minut po pulsu, oproti intaktním kontrolám i kontrolám se světelným pulsem. Naše výsledky naznačují, že u zvířat adaptovaných a pulsovaných vysokou intenzitou světla má agonista silnější efekt na světlem indukované změny v hladině pERK1/2. To je poněkud v rozporu s naší původní domněnkou, že nízká intenzita světla naopak dovolí vyniknout modulačním účinkům CB1 aktivace. Je možné, že vysoká intenzita světelného pulsu působí jako stresový faktor, který zvyšuje hladinu endokannabinoidů v hypotalamu (Hill et al., 2010) a může tak umocňovat účinky exogenního agonisty.

### 6.2.2. Kináza GSK3 $\beta$

Světelný puls o nízké i vysoké intenzitě světla v CT15 signifikantně snížil hladinu fosforylované formy kinázy GSK3 $\beta$  2 hodiny po pulsu podobně jako v předchozích studiích (Červená et al., 2015; Paul et al., 2017). Tato kináza je fosforylací inhibována, světelný puls tedy vedl k její aktivaci. Agonista CB1 receptorů s následným světelným pulsem vedl ke stejnému snížení hladiny pGSK3 $\beta$ , jaké bylo naměřeno u kontrol se samotným pulsem. Antagonista CB1 receptorů neměl vliv na hladiny pGSK3 $\beta$  po světelném pulsu ve srovnání s intaktními ani pulsovanými kontrolami.

GSK3 $\beta$  je kináza ovlivňující amplitudu i délku periody molekulárních hodin modifikací několika hodinových genů. Její působení vede například k degradaci proteinů BMAL1, CRY2, k přesunu PER2 do jádra nebo k inhibici exprese *Bmal1* přes fosforylaci proteinu REV-ERB $\alpha$  (Harada et al., 2005; Iitaka et al., 2005; Sahar et al., 2010; Yin et al., 2006). Její hladina v SCN

vykazuje cirkadiánní oscilace s vrcholem během noci (Iitaka et al., 2005; Pačesová et al., 2015). Pokles hladiny pGSK3 $\beta$  byl pozorován 2 hodiny po světelném pulsu v první polovině (CT15) i druhé polovině subjektivní noci (CT21) (Červená et al., 2015). Aktivní GSK3 $\beta$  po světelném pulsu tak může fosforylovat hodinové geny a ovlivnit dynamiku hodinové smyčky. Studie (Paul et al., 2017) uvádí její aktivitu zvýšenou světelným pulsem do souvislosti s posunem elektrické aktivity SCN, který vede k fázovému posunu rytmů. Z našich výsledků ale vyplývá, že kanabinoidní systém do tohoto procesu spíše nezasahuje.

### 6.2.3. Protein c-Fos

Indukce c-Fos v SCN světlem v subjektivní noci je dobře popsáným jevem (Kornhauser et al., 1990). Také naše výsledky ukázaly prudký nárůst exprese c-Fos v čase 15 minut po světelném pulsu v CT15. Světelný puls zvýšil hladinu c-Fos přibližně o polovinu ve srovnání s intaktními kontrolami.

Agonista CB1 receptorů aplikovaný před světelným pulsem inhiboval efekt samotného pulsu a snížil hladinu c-Fos 15 minut po pulsu na hladinu srovnatelnou s intaktními kontrolami. Podání antagonisty CB1 receptorů před světelným pulsem nemělo žádný vliv, světelný puls indukoval c-Fos do stejné míry jako u pulsovaných kontrol bez antagonisty. V čase 4 hodiny po pulsu se u skupiny s agonistou CB1 receptorů zvýšila hladina c-Fos ve srovnání s intaktními kontrolami. To může také znamenat agonistou indukované zpomalení poklesu exprese c-Fos k bazální hladině.

Hladina c-Fos reaguje na světlo výhradně během subjektivní noci, nikoli ve dne (Kornhauser et al., 1990). V SCN má c-Fos cirkadiánní rytmus s vysokou hladinou přes den a nízkou v noci (Coogan and Piggins, 2003). Studie Wollnik et al., (1995) popsala, že inhibice exprese c-Fos pomocí antisense oligonukleotidů zablokuje světlem indukovaný fázový posunu u potkanů. Podle této studie má tedy exprese c-Fos v reakci na světlo nezbytnou funkci ve světelné synchronizaci. Nicméně výzkum na myších s mutací v genu c-Fos ukázal, že myši s nefunkčním genem c-Fos jsou stále schopny fázového posunu, synchronizace se světelným režimem pouze trvá déle než u kontrol (Honrado et al., 1996). Funkce proteinu c-Fos v SCN tedy není zcela objasněná, ale indukce jeho exprese v noci zřejmě napomáhá synchronizaci cirkadiánního systému se světelným režimem.



Naše výsledky ukázaly, že aktivace kanabinoidní signalizace má vliv na buněčné procesy v SCN související s působením světla v subjektivní noci. Změna fosforylace kinázy ERK1/2 2 hodiny po světelném pulsu a inhibice exprese c-Fos, objevující se ihned po světelném pulsu v CT15, koreluje s inhibicí světlem indukovaného fázového posunu v lokomoční aktivitě.

Studie Acuna-Goycolea et al. zjišťovala účinek kanabinoidní aktivace v SCN *in vitro* pomocí elektrofyziologických měření. Agonista WIN55 měl excitační účinek na neurony SCN, zatímco antagonist AM251, ale také antagonist GABA-A receptorů tento účinek zablokovali. Dále byly měřeny inhibiční postsynaptické potenciály po výlevu GABA. Agonista CB1 receptorů WIN55 snížil inhibiční postsynaptický potenciál o 47 % ve srovnání s kontrolami, antagonist AM251 neměl žádný efekt. Z těchto výsledků vyplývá, že aktivace CB1 receptorů zřejmě blokuje výlev inhibičního neurotransmiteru GABA z presynaptických neuronů SCN (Acuna-Goycolea et al., 2010). Neurotransmitter GABA je velmi důležitý pro komunikaci buněk napříč SCN. 90% neuronů SCN obsahuje GABA (McNeill et al., 2018). Inhibice jeho působení na GABA-A receptory vede k rozdělení SCN na 2 samostatné oscilátory – VL a DM SCN (Albus et al., 2005). Synchronizace těchto dvou částí je přitom klíčová ke světelné synchronizaci cirkadiálního systému. VL SCN přijímá informace o světle, podle které nastavuje fázi molekulárních hodin a pomocí mediátorů synchronizuje fázi hodin také v DM SCN, které pak zajišťuje rytmické výstupy do dalších částí mozku a dále do těla (Moore et al., 2002). Stimulace CB1 receptoru nemá vliv na glutamátergní synapsi mezi RHT a VL SCN, jak bylo ukázáno v *in vitro* organotypických kulturách (Acuna-Goycolea et al., 2010). To naznačuje, že světelná informace může být přenášena do SCN nezměněna a výsledná inhibice fázového posunu může být výsledkem narušených spojení mezi VL a DM SCN.

Podle studie Acuna-Goycolea et al. je účinek kanabinoidů na inhibici výlevu GABA přítomný pouze po exogenním podání účinné látky (Acuna-Goycolea et al., 2010). Tomu odpovídají i naše výsledky, ve kterých zablokování CB1 receptorů nemělo významný efekt. Kanabinoidní signalizace v SCN ale může být časově specifická, s účinkem v jiné denní době než v časech našeho pozorování.

Kanabinoidní aktivace může také modulovat vstupy do SCN z oblastí přenášejících nesvětelný signál, jako jsou rapheální jádra nebo intergenikulární lístek talamu, který integruje světelné a nesvětelné stimuly. V obou těchto strukturách byl popsán výskyt CB1 receptorů

(Sanford et al., 2008). IGL vylévá do SCN neuropeptid Y, kterým může upravovat fázi hodin v SCN. NPY má také schopnost potlačit světlem indukovaný fázový posun (Yannielli and Harrington, 2001). Aplikace agonisty CB1 receptorů zvyšuje výlev NPY v hypothalamických kulturách (Gamber et al., 2005). Kanabinoidní aktivace by tedy mohla mít vliv na dráhu mezi IGL a SCN a tím inhibovat světlem indukovaný fázový posun (Vaughn et al., 2010). Rapheální jádra v mozkovém kmeni přinášejí do SCN informace o nesvětelných podnětech výlevem serotoninu. Serotonergní agonisté mohou také inhibovat fázové posuny v lokomoční aktivitě po světelném signálu v noci (Pickard et al., 1996). Zvýšení hladiny anadamidu v mozku vede k působení na CB1 receptory v dorzálním rapheálním jádře a způsobuje jeho zvýšenou aktivitu (Gobbi et al., 2005). Aplikace agonisty CB1 receptorů CP55940 vede ke zvýšení hladiny serotoninu v hypothalamu (Arévalo et al., 2001). Ovlivnění serotonergní dráhy do SCN tedy může být dalším potenciálním mechanismem inhibičního účinku kanabinoidů na světlem indukovaný fázový posun (Vaughn et al., 2010).

## 7. Závěr

Složky endokanabinoidního systému jsou cirkadiánně regulovány a nové poznatky naznačují, že tento systém také zpětně ovlivňuje cirkadiánně řízené projevy. Bylo prokázáno, že aktivace kanabinoidního systému v mozku laboratorních savců inhibuje světlem indukovaný fázový posun v lokomoční aktivitě a vede tak ke snížené synchronizaci cirkadiánního systému se světlem. Vliv kanabinoidní signalizace přímo v buňkách SCN však nebyl dosud studován. Naše výsledky ukazují, že aktivace kanabinoidní signalizace má vliv na buněčné procesy v SCN související s působením světla v subjektivní noci. Aktivace CB1 receptorů exogenním agonistou vedla ke změně fosforylace kinázy ERK1/2 2 hodiny po světelném pulsu a k inhibici světlem indukované okamžité exprese proteinu c-Fos v neuronech SCN, což koreluje s potlačením světlem indukovaného fázového posunu rytmů v lokomoční aktivitě. Zjistili jsme tedy, že aktivace kanabinoidního systému moduluje nastavení cirkadiánního pacemakeru v SCN a jeho citlivost ke světelné synchronizaci.

## 8. Literatura

Acuna-Goycolea, C., Obrietan, K., and van den Pol, A.N. (2010). Cannabinoids excite circadian clock neurons. *J. Neurosci.* *30*, 10061–10066.

Akashi, M., Hayasaka, N., Yamazaki, S., and Node, K. (2008). Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Functional Component of the Autonomous Circadian System in the Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurosci.* *28*, 4619–4623.

Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Shibata, S. (1999). Inhibition of Light- or Glutamate-Induced mPer1 Expression Represses the Phase Shifts into the Mouse Circadian Locomotor and Suprachiasmatic Firing Rhythms. *J. Neurosci.* *19*, 1115–1121.

Albrecht, U., and Eichele, G. (2003). The mammalian circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development* *13*, 271–277.

Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* *15*, 886–893.

Antle, M.C., Tse, F., Koke, S.J., Sterniczuk, R., and Hagel, K. (2008). Non-photoc phase shifting of the circadian clock: role of the extracellular signal-responsive kinases I/II/mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 2511–2518.

Arévalo, C., de Miguel, R., and Hernández-Tristán, R. (2001). Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *70*, 123–131.

Aton, S.J., and Herzog, E.D. (2005). Come Together, Right... Now: Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock. *Neuron* *48*, 531–534.

Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* *8*, 476–483.

Beinfeld, M.C., and Connolly, K. (2001). Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neurosci. Lett.* *301*, 69–71.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., and Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* *277*, 1094–1097.

Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.

Besing, R.C., Paul, J.R., Hablitz, L.M., Rogers, C.O., Johnson, R.L., Young, M.E., and Gamble, K.L. (2015). Circadian Rhythmicity of Active GSK3 Isoforms Modulates Molecular Clock Gene Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus. *J Biol Rhythms* 30, 155–160.

Best, J.D., Maywood, E.S., Smith, K.L., and Hastings, M.H. (1999). Rapid Resetting of the Mammalian Circadian Clock. *J. Neurosci.* 19, 828–835.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312, 637–641.

Breivogel, C.S., Sim, L.J., and Childers, S.R. (1997). Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1632–1642.

Buijs, R.M., Wortel, J., Van Heerikhuizen, J.J., Feenstra, M.G., Ter Horst, G.J., Romijn, H.J., and Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1535–1544.

Buijs, R.M., la Fleur, S.E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T.C., Kalsbeek, A., Nagai, K., and Nijijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J. Comp. Neurol.* 464, 36–48.

Butcher, G.Q., Dziema, H., Collamore, M., Burgoon, P.W., and Obrietan, K. (2002). The p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Couples Photic Input to Circadian Clock Entrainment. *J. Biol. Chem.* 277, 29519–29525.

Butcher, G.Q., Lee, B., and Obrietan, K. (2003). Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* 90, 3854–3863.

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., and Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* 16, 3934–3942.

Cadas, H., di Tomaso, E., and Piomelli, D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 1226–1242.

Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E., and Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76, 70–81.

Červená, K., Pačesová, D., Spišská, V., and Bendová, Z. (2015). Delayed Effect of the Light Pulse on Phosphorylated ERK1/2 and GSK3 $\beta$  Kinases in the Ventrolateral Suprachiasmatic Nucleus of Rat. *J. Mol. Neurosci.* *56*, 371–376.

Choi, H.J., Lee, C.J., Schroeder, A., Kim, Y.S., Jung, S.H., Kim, J.S., Kim, D.Y., Son, E.J., Han, H.C., Hong, S.K., et al. (2008). Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* *28*, 5450–5459.

Colwell, C.S. (2001). NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: Gating by the circadian system. *European Journal of Neuroscience* *13*, 1420–1428.

Colwell, C.S. (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 553–569.

Coogan, A.N., and Piggins, H.D. (2003). Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J. Neurosci.* *23*, 3085–3093.

Coogan, A.N., and Piggins, H.D. (2005). Dark pulse suppression of P-ERK and c-Fos in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 158–168.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., and Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* *384*, 83–87.

Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., and Lichtman, A.H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 9371–9376.

Daan, S., and Pittendrigh, C.S. (1976). A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J. Comp. Physiol.* *106*, 253–266.

De Jeu, M., and Pennartz, C. (2002). Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase. *J. Neurophysiol.* *87*, 834–844.

Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology* *72*, 517–549.

Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A., and Gillette, M.U. (1994). Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* *266*, 1713–1717.

Ding, J.M., Buchanan, G.F., Tischkau, S.A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L.E., Alster, J.M., McPherson, P.S., Campbell, K.P., and Gillette, M.U. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* *394*, 381–384.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 10819–10824.

Do, M.T.H., and Yau, K.-W. (2010). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Physiological Reviews* *90*, 1547–1581.

Dziema, H., Oatis, B., Butcher, G.Q., Yates, R., Hoyt, K.R., and Obrietan, K. (2003). The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 1617–1627.

Fukushima, T., Shimazoe, T., Shibata, S., Watanabe, A., Ono, M., Hamada, T., and Watanabe, S. (1997). The involvement of calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the circadian rhythms controlled by the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* *227*, 45–48.

Gallego, M., and Virshup, D.M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 139–148.

Gallego, M., Eide, E.J., Woolf, M.F., Virshup, D.M., and Forger, D.B. (2006). An opposite role for tau in circadian rhythms revealed by mathematical modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10618–10623.

Gamber, K.M., Macarthur, H., and Westfall, T.C. (2005). Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* *49*, 646–652.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., and Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* *280*, 1564–1569.

Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* *77*, 299–318.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., et al. (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 18620–18625.

Goldsmith, C.S., and Bell-Pedersen, D. (2013). Diverse Roles for MAPK Signaling in Circadian Clocks. *Adv Genet* *84*, 1–39.

Golombek, D.A., and Rosenstein, R.E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* *90*, 1063–1102.

Golombek, D.A., Bussi, I.L., and Agostino, P.V. (2014). Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 369, 20120465.

Grewal, S.S., York, R.D., and Stork, P.J. (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 544–553.

Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U., and Mikkelsen, J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J. Neurosci.* 17, 2637–2644.

Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., and Fukada, Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 Is Degraded upon Synergistic Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 280, 31714–31721.

Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.-W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.

Heifets, B.D., and Castillo, P.E. (2009). Endocannabinoid Signaling and Long-term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Physiol* 71, 283–306.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.

Hill, M.N., Patel, S., Campolongo, P., Tasker, J.G., Wotjak, C.T., and Bains, J.S. (2010). Functional Interactions between Stress and the Endocannabinoid System: From Synaptic Signaling to Behavioral Output. *J. Neurosci.* 30, 14980–14986.

Hillard, C.J., Edgmond, W.S., Jarrahan, A., and Campbell, W.B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* 69, 631–638.

Honrado, G.I., Johnson, R.S., Golombek, D.A., Spiegelman, B.M., Papaioannou, V.E., and Ralph, M.R. (1996). The circadian system of c-fos deficient mice. *J. Comp. Physiol. A* 178, 563–570.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.

Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., and Porrino, L.J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 345–358.



Hrabovszky, E., Wittmann, G., Kalló, I., Füzesi, T., Fekete, C., and Liposits, Z. (2012). Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. *J. Comp. Neurol.* *520*, 1005–1020.

Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005). A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 29397–29402.

Kalsbeek, A., Palm, I.F., La Fleur, S.E., Scheer, F. a. J.L., Perreau-Lenz, S., Ruitter, M., Kreier, F., Cailotto, C., and Buijs, R.M. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms* *21*, 458–469.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* *89*, 309–380.

Koch, M., Dehghani, F., Habazettl, I., Schomerus, C., and Korf, H.-W. (2006). Cannabinoids attenuate norepinephrine-induced melatonin biosynthesis in the rat pineal gland by reducing arylalkylamine N-acetyltransferase activity without involvement of cannabinoid receptors. *J. Neurochem.* *98*, 267–278.

Koch, M., Habazettl, I., Dehghani, F., and Korf, H.-W. (2008). The rat pineal gland comprises an endocannabinoid system. *J. Pineal Res.* *45*, 351–360.

Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., et al. (2015a). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* *519*, 45–50.

Koch, M., Ferreirós, N., Geisslinger, G., Dehghani, F., and Korf, H.-W. (2015b). Rhythmic control of endocannabinoids in the rat pineal gland. *Chronobiol. Int.* *32*, 869–874.

Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E., and Takahashi, J.S. (1990). Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* *5*, 127–134.

Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* *29*, 717–727.

Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* *98*, 193–205.

Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., and Fukada, Y. (2010). DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1757–1768.

Lee, H.S., Nelms, J.L., Nguyen, M., Silver, R., and Lehman, M.N. (2003). The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience* *6*, 111–112.

Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K., and Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16, 527–531.

Liu, C., and Reppert, S.M. (2000). GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25, 123–128.

Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., and Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288, 483–492.

Lu, H.-C., and Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* 79, 516–525.

Maejima, T., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2001a). Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci. Res.* 40, 205–210.

Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., and Kano, M. (2001b). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31, 463–475.

Martínez-Vargas, M., Murillo-Rodríguez, E., González-Rivera, R., Landa, A., Méndez-Díaz, M., Prospero-García, O., and Navarro, L. (2003). Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117, 197–201.

Martinez-Vargas, M., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Hernandez-Enriquez, C., Perez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F., and Navarro, L. (2013). Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *Int J Mol Sci* 14, 23341–23355.

Mathur, A., Golombek, D.A., and Ralph, M.R. (1996). cGMP-dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 270, R1031–R1036.

Maywood, E.S., Mrosovsky, N., Field, M.D., and Hastings, M.H. (1999). Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15211–15216.

McNeill, J.K., Walton, J.C., and Albers, H.E. (2018). Functional Significance of the Excitatory Effects of GABA in the Suprachiasmatic Nucleus. *J. Biol. Rhythms* 748730418782820.

Mistlberger, R.E., and Antle, M.C. (2011). Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food. *Essays In Biochemistry* 49, 119–136.

Moore, R.Y., Speh, J.C., and Leak, R.K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309, 89–98.

Morris, M.E., Viswanathan, N., Kuhlman, S., Davis, F.C., and Weitz, C.J. (1998). A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 279, 1544–1547.

Murillo-Rodríguez, E., Désarnaud, F., and Prospéro-García, O. (2006). Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci.* 79, 30–37.

Nelson, D.E., and Takahashi, J.S. (1991). Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol* 439, 115–145.

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

Ohno-Shosaku, T., Sawada, S., and Yamamoto, C. (1998). Properties of depolarization-induced suppression of inhibitory transmission in cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch.* 435, 273–279.

Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Ano, M., Takeda, S., Tsubokawa, H., and Kano, M. (2007). Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 584, 407–418.

Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimotodani, Y., and Kano, M. (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist* 18, 119–132.

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* 279, 5298–5305.

O’Sullivan, S.E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152, 576–582.

Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Hejnová, L., Novotný, J., and Bendová, Z. (2015). Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 $\beta$  kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol* 172, 3638–3649.

Paul, J.R., DeWoskin, D., McMeekin, L.J., Cowell, R.M., Forger, D.B., and Gamble, K.L. (2016). Regulation of persistent sodium currents by glycogen synthase kinase 3 encodes daily rhythms of neuronal excitability. *Nat Commun* 7.

Paul, J.R., McKeown, A.S., Davis, J.A., Totsch, S.K., Mintz, E.M., Kraft, T.W., Cowell, R.M., and Gamble, K.L. (2017). Glycogen synthase kinase 3 regulates photic signaling in the suprachiasmatic nucleus. *The European Journal of Neuroscience* 45, 1102.

Pertwee, R.G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International Journal of Obesity* 30, S13–S18.

Pickard, G.E., Weber, E.T., Scott, P.A., Riberdy, A.F., and Rea, M.A. (1996). 5HT1B receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* *16*, 8208–8220.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience* *4*, 873–884.

Pistis, M., and O’Sullivan, S.E. (2017). The Role of Nuclear Hormone Receptors in Cannabinoid Function. *Adv. Pharmacol.* *80*, 291–328.

Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* *12*, 4122–4132.

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* *110*, 251–260.

Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975–978.

Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* *418*, 935–941.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A., and Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* *40*, 2–14.

Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2010). Regulation of BMAL1 Protein Stability and Circadian Function by GSK3 $\beta$ -Mediated Phosphorylation. *PLOS ONE* *5*, e8561.

Sanada, K., Harada, Y., Sakai, M., Todo, T., and Fukada, Y. (2004). Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes to Cells* *9*, 697–708.

Sanford, A.E., Castillo, E., and Gannon, R.L. (2008). Cannabinoids and hamster circadian activity rhythms. *Brain Res.* *1222*, 141–148.

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., and Hogenesch, J.B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* *43*, 527–537.

Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R., and Abood, M.E. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB<sub>2</sub>): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *278*, 989–999.

Spengler, M.L., Kuropatwinski, K.K., Schumer, M., and Antoch, M.P. (2009). A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle* 8, 4138–4146.

Stambolic, V., and Woodgett, J.R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical Journal* 303, 701–704.

Steindel, F., Lerner, R., Häring, M., Ruehle, S., Marsicano, G., Lutz, B., and Monory, K. (2013). Neuron-type specific cannabinoid-mediated G protein signalling in mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 124, 795–807.

Stella, N., Schweitzer, P., and Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773–778.

Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1583–1586.

Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S.-H., Buchanan, G.F., and Gillette, M.U. (2003). Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J. Biol. Chem.* 278, 718–723.

Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *PNAS* 99, 7728–7733.

Valenti, M., Viganò, D., Casico, M.G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D., and Di Marzo, V. (2004). Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 945–950.

Vaughn, L.K., Denning, G., Stuhr, K.L., de Wit, H., Hill, M.N., and Hillard, C.J. (2010). Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br J Pharmacol* 160, 530–543.

Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., and Turek, F.W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health* 25, 85–93.

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

Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu Rev Physiol* 72, 551–577.

Wenger, T., and Moldrich, G. (2002). The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 301–307.

Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.

Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678–682.

Wilson, R.I., Kunos, G., and Nicoll, R.A. (2001). Presynaptic Specificity of Endocannabinoid Signaling in the Hippocampus. *Neuron* 31, 453–462.

Wittmann, G., Deli, L., Kalló, I., Hrabovszky, E., Watanabe, M., Liposits, Z., and Fekete, C. (2007). Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 503, 270–279.

Wollnik, F., Brysch, W., Uhlmann, E., Gillardon, F., Bravo, R., Zimmermann, M., Schlingensiepen, K.H., and Herdegen, T. (1995). Block of c-Fos and JunB Expression by Antisense Oligonucleotides Inhibits Light-induced-Phase Shifts of the Mammalian Circadian Clock. *European Journal of Neuroscience* 7, 388–393.

Yannielli, P.C., and Harrington, M.E. (2001). Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22, 547–556.

Yin, L., Wang, J., Klein, P.S., and Lazar, M.A. (2006). Nuclear Receptor Rev-erb $\alpha$  Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science* 311, 1002–1005.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.