



Vuorokausirytmien toiminta ja säätely selkärankaisilla

750376A LuK-tutkielma

Sonja Pikkupeura

Oulun yliopisto 2017

Asiasanat:

vuorokausirytmien

suprakiasmaattinen tumake

ajastus

retinohypotalaminen reitti

GABA

Tiivistelmä

Eliöille on kehittynyt sisäiseksi kelloksi vuorokausirytmä ajan mittaamista ja ajankulkuun reagoimista varten. Vuorokausirytmistä on eliöille etua, ja jonkinlainen sisäinen kello esiintyy jossain muodossa kaikilla aiotumallisilla ja osalla esitumallisista. Vuorokausirytmä mittaa ajanjaksoa, joka kestää noin vuorokauden. Vuorokausirytmä tahdistaa eliön kudokset ja elintoiminnot toimimaan rytmissä ympäristön vuorokaudenaikojen kanssa. Vuorokausirytmä toimii ympäristöstä riippumatta, eli se on elimistön sisäinen ominaisuus. Oikeassa tahdissa vuorokaudenaikojen kanssa pysyäkseen vuorokausirytmä vaatii kuitenkin ajastusta eli merkkisignaaleja ympäristöstä. Ilman näitä signaaleja rytmä alkaa edistämään tai jättämään. Tärkein vuorokausirytmä edistävä signaali on valo. Valon lisäksi tietyt kemialliset aineet, sosiaalinen vuorovaikutus ja fyysinen rasitus voivat ajastaa vuorokausirytmä. Vuorokausirytmä säädellään elimistössä hierakisella systeemillä, jonka ylimpänä keskuksena selkärankaisilla on aivojen hypotalamuksessa sijaitseva suprakiasmaattinen tumake. Valosignaalin ympäristöstä vastaanottavat verkkokalvolla tähän tehtävään erikoistuneet solut ja signaali kulkee suprakiasmaattiseen tumakkeeseen retinohypotalamista reittiä pitkin. Vuorokausirytmä syntyy suprakiasmaattisen tumakkeen soluissa tiettyjen geenien rytmisellä ilmentämisellä ja proteiinien pitoisuuksien muutoksilla. Tärkeimpiä vuorokausirytmäin vaikuttavia genejä ovat *clock* ja *bmal1*. Gamma-aminovoihapolla on lisäksi suuri vaikutus vuorokausirytmäin synnyssä ja säätelyssä suprakiasmaattisessa tumakkeessa. Häiriöt vuorokausirytmäissä voivat olla terveydelle haitallisia, ja ne voivat altistaa ihmisen univaikeuksille sekä sairauksille kuten aineenvaihdunnan häiriöille ja masennukselle. Vuorokausirytmäin häiriöitä voidaan hoitaa sekä lääke- että valohoidolla.

Sisällys

Tiivistelmä	2
1. Johdanto	4
2. Biologiset kellot ja niiden toiminta	6
3. Vuorokausirytmä	7
4. Vuorokausirytmän säätely	8
4.1. Suprakiasmaattinen tumake	8
4.2. Suprakiasmaattisen tumakkeen ajastus ympäristön aikaan	9
4.3. Ympäristön muu vaikutus vuorokausirytmään	11
4.4. Ajastussignaalin kuljettaminen suprakiasmaattiseen tumakkeeseen	12
4.5. Ajastussignaalin vastaanottavat valopigmentit verkkokalvolla	13
5. Vuorokausirytmän syntyminen suprakiasmaattisessa tumakkeessa	15
6. Vuorokausirytmän nopeuteen vaikuttavat tekijät	18
7. Solujen yhteydenpito suprakiasmaattisessa tumakkeessa ja GABA:n vaikutus vuorokausirytmään	19
8. Vuorokausirytmän häiriöiden terveydellisistä vaikutuksista	21
9. Yhteenveto	23
10. Kirjallisuusviitteet	24

1. Johdanto

Maapallolla elävien eläinten ympäristö on jatkuvassa muutostilassa. Aurinko nousee ja laskee, vuorovesi vaihtuu ja lämpötilat vaihtelevat. Petojen saaliseläimet ovat liikkeessä vain joinain vuorokaudenaikoina, parittelukausi kestää vain osan vuodesta ja emojen tulee osata vieroittaa jälkeläisensä määrätyn ajan kuluessa. Jotta eläin menestyisi ja saisi omia jälkeläisiä, sen tulee näin ollen olla tietoinen ympäristöstään sekä kuluva ajasta, sekä kyetä mukauttamaan elimistönsä toimintaa ajanhetkestä toiseen (Hill *ym.* 2012).

Eläimillä elintoiminnot eivät pysy muuttumattomina tunnista ja päivästä toiseen, vaan ne muuttuvat yhdessä ympäristön kanssa. Esimerkiksi uni-valverytmi on vuorokaudenaikaa seuraava fysiologinen rytmi. On olemassa myös muita vuorokauden- ja vuodenaikoja seuraavia elintoimintoja ja erilaisia fysiologisia tiloja. Lisäksi jo kehon homeostasian eli elimistön sisäisen tasapainon ylläpito vaatii fysiologisia muutoksia vasteena ulkoisen ympäristön tai elimistön sisäisiin muutoksiin. Esimerkiksi aterian jälkeen verensokeri nousee, johon elimistön tulee reagoida erittämällä insuliinia saavuttaakseen jälleen tasapainotilan eli normaalin verensokerin. Päiväaktiivisilla eläimillä yön aikana verensokeri laskee, jolloin elimistön on pystyttävä mukauttamaan toimintaansa sen mukaan. Jonkinlainen vuorokausirytmä on siis tarpeen jo eläimen elintoimintojen vuoksi. Vuorokausirytmän muodostamiseksi on elimistöön kehittynyt etenkin selkärankaisille monimutkainen kellokoneisto (Hill *ym.* 2012).

Muutokset ympäristössä ovat yleensä hyvin säännöllisiä, ja vuorokauden- ja vuodenaajan seuraaminen pimeyden ja valon suhteen voisi ajatella olevan suhteellisen helppoa ilman elimistön omaa kelloa (Hill *ym.* 2012). Onkin aiheellista pohtia, miksi eläimille on ylipäätään kehittynyt paljon resursseja vievä sisäinen järjestelmä ajan kulun mittaamiseen (Golombek & Rosenstein 2010). On kuitenkin olemassa monta syytä, jotka tekevät sisäisestä kellosta selkärankaisille arvokkaan ja välttämättömän ominaisuuden. Ensimmäinen syy on se, että ympäristön muutokset eivät aina ole tarpeeksi säännöllisiä, jotta niillä voisi suoraan ajastaa elintoimintoja ja käytöstä. Esimerkiksi pohjoisella kalottialueella aurinko ei nouse talvella eikä laske kesällä lainkaan jopa reiluun kuukauteen. Näinäkin aikoina alueella asuvien eläinten täytyy osata ruokailla, nukkua ja herätä säännöllisesti. Lisäksi pelkkä ympäristön signaalien seuraaminen olisi liian häiriöaltista ja esimerkiksi valo keskellä yötä voisi sekoittaa rytmin. Eläimille on näin ollen kehittynyt oma sisäinen kellojärjestelmä kuluva ajan havaitsemiseen ja ajankuluun reagoimiseen (Hill *ym.* 2012). Tämän sisäisen kellon avulla eläin voi myös ennakoida ympäristössään tapahtuvia säännöllisiä muutoksia ja valmistautua niihin pelkän passiivisen ympäristön merkkeihin reagoimisen sijaan

(Golombek & Rosenstein 2010). Sisäisestä kellosta on ollut yksilöille hyötyä niin paljon, että piirre kattaa selkärankaisten lisäksi jossain muodossa kaikki eukaryootit eli aitotumalliset sekä osan prokaryooteista eli esitumallisista. Näin ollen ominaisuuden on täytynyt syntyä hyvin varhain eliökunnan historiassa (Hill *ym.* 2012).

Vuorokausirytmä havaittiin ensimmäisenä lehtiään rytmisesti ylös- ja alaspäin liikuttavissa kasveissa. Vuonna 1729 ranskalainen tutkija M. de Meira todisti, että tämä rytmi säilyy, vaikka kasvit pidetään jatkuvassa pimeydessä muuttumattomassa lämpötilassa (Hill *ym.* 2012). Nisäkkäiden sisäisen kellon sijainnin jäljille päästiin myöhemmin, vasta 1970-luvulla. Kuitenkin jo 60-luvulla osattiin arvella, että silmillä, valolla ja ajalla voisi olla jotain tekemistä toistensa kanssa: argentiinalainen Julio Cortázar kirjoittikin vuonna 1960, että ”aika kulkee silmien kautta, kaikkihan se tietävät” (vapaa suomennos). Vaikka aika itsessään ei kulje silmien kautta, auttoi päätelmä myöhemmin löytämään sen reitin, jota pitkin valosignaalit kulkevat silmien kautta biologisen kellon säätelijöiksi (Golombek & Rosenstein 2010).

Sisäisen kellon aika täytyy vastata ympäristön aikaa mahdollisimman hyvin ollakseen hyödyllinen. Sisäinen kello virittyy ympäristön aikaan vastaanottamalla erilaisia merkkejä ympäristöstä. Selkärankaisilla hermoston tehtävänä on ottaa vastaan näitä merkkejä ja lisäksi välittää ne eteenpäin yhdessä tiettyjen hormonien kanssa muulle elimistölle. Tätä välittämistä kutsutaan endogeeniseksi eli sisäiseksi prosessiksi, koska se ei ole enää suoraan seurausta ympäristöstä vaan peräisin elimistöstä itsestään (Hill *ym.* 2012).

Endogeenisyydellä voidaan rytmeissä puhuttaessa viitata myös rytmin itsenäisyyteen eli sen jatkuvuuteen ympäristön merkeistä riippumatta. Näin ollen biologiset kellot eli rytmit, kuten vuorokausi- ja vuodenaikaisrytmi, ovat endogeenisiä eli sisäisiä toimintoja, sillä ne pysyvät toiminnassa myös ilman ympäristöstä tulevaa merkkiä. Esimerkiksi pimeään asuntoon jäävän ihmisen elintoiminnoissa, käytöksessä ja mm. uni-valverytmissä pysyy selkeä, noin vuorokautta noudattava rytmi (Hill *ym.* 2012).

Tässä tutkielmassa keskitytään selkärankaisten vuorokausirytmien. Tutkimuskysymyksiä ovat vuorokausirytmien toiminta yleistasolla sekä sen säätelyn perusperiaatteet ja rytmin syntyminen aivoissa. Säätelytekijöistä tarkemmin tutustutaan lisäksi gamma-aminovoihapon (GABA:n) rooliin.

2. Biologiset kellot ja niiden toiminta

Biologinen kello on harvinaisia poikkeuksia lukuun ottamatta osa eläimen hermostoa. Selkärankaisilla kello sijaitsee aivoissa hypotalamuksessa. Hyönteisillä kello on usein silmissä tai siihen liittyvissä rakenteissa (Hill *ym.* 2012).

Biologisten kellojen tehtävä on koordinoida solujen, kudosten ja elinten toiminta samaan rytmiin, ja näiden fysiologisten toimintojen yhdenaikaistaminen saa aikaan säännöllisesti ja rytmisesti vaihtuvan fysiologisen tilan koko elimistössä. Kellon avulla kehossa voi siis tapahtua ajallisesti koordinoituja muutoksia käytöksessä ja fysiologiassa (Hill *ym.* 2012).

Kellon virittävää signaalia kutsutaan saksan sanalla *zeitgeber* tai ”phasing factor” eli jaksottaja. Tämä signaali voi olla mm. valo ja sen voimakkuus, tietty lämpötila, ruoan saatavuus, sosiaalinen kommunikaatio tai ääni. Yleisin ja tärkein signaali on valo. Huomattavaa on, että lämpötila on kellon virittäjänä hyvin harvinaisen. Tämä on seurausta siitä, että muutoin ympäristön lämpötilan äkillinen vaihtelu voisi sekoittaa eläimen sisäisen kellon täysin. Endogeenisten rytmien alhainen herkkyys lämpötilan muutoksille on näin ollen sopeuma eli adaptiivinen ominaisuus. Huomattavan asiasta tekee se, että lämpötilan muutoksilla on kuitenkin suuri vaikutus muihin elimistön molekyyli-tason prosesseihin, kuten entsyymien ja kemiallisten reaktioiden toiminnan nopeuteen, eikä tiedetä mikä estää sitä vaikuttamasta vuorokausirytmiiin (Hill *ym.* 2012).

Endogeenisen kellon avulla elimistön toiminta ei ole riippuvainen ympäristön signaaleista tai niiden puutteesta. Esimerkiksi yöaktiivisen eläimen kello toimii läpi yön ajoittaen kehon toimintoja, vaikka yön aikana ajan kulusta ei kerro mikään ulkoinen merkki täyden pimeyden vallitessa. Riittää, kun kello virittyy oikeaan aikaan iltahämärän ja aamunkoiton avulla. Biologinen kello mahdollistaa myös päivänvalon pituuden eli fotoperiodin mittaamisen ja havaitsemisen, mikä on tärkeää vuodenaikojen hahmottamisessa ja mm. lisääntymisen ajoittamisessa. Lisäksi jotkin eläimet kykenevät ilmansuuntien havaitsemiseen oman sisäisen kellonsa avulla: auringon paistosuunnan ja vuorokaudenajan yhdistämällä on ilmansuunnan päättely mahdollista. Esimerkiksi pulut ja muut päivisin muuttavat linnut käyttävät tätä tekniikkaa muiden suunnistustekniikoiden ohella suunnistaessaan pitkillä lentomatoillaan (Hill *ym.* 2012).

3. Vuorokausirytm

Vuorokausi- eli sirkadianrytmeiksi kutsutaan endogeenisiä rytmejä, joissa yksi sykli kestää nimensä mukaisesti noin vuorokauden. Termi otettiin käyttöön 1950-luvulla (Golombek *ym.* 2010). Sana tulee latinan sanoista ”circa” ja ”dies”, jotka suomeksi käännettynä merkitsevät ”noin” ja ”päivä”. Vuorokausirytm ohjaa etenkin metaboliaa: esimerkiksi typpiaineenvaihdunta, glukoneogeneesi eli elimistön oma glukoosin tuottaminen verensokerin ollessa alhaalla ja myrkkyjen poistaminen kehosta seuraavat vuorokaudenaikaa. Päiväaktiivisilla selkärangkaisilla myös solut asettuvat öisin alemman metabolian tilaan (Hastings *ym.* 2014). Lisäksi mm. kehon lämpötila, virtsaneritys, hormonieritys, solunjakautuminen ja liikeaktiivisuus noudattavat selkärangkaisilla yleisesti vähintään jonkinasteista vuorokausirytmä (Cambras *ym.* 2006, Golombek & Rosenstein 2010, Schwartz *ym.* 2009).

Ympäristön kanssa samassa päivärytmissä pysyäkseen vuorokausirytm tarvitsevat kuitenkin ulkoisen signaalin kellon viritykseen. Signaalin puuttuessa rytm säilyy, mutta alkaa usein joko edistää tai jätättää. Rytmn sanotaan olevan vapaa, jos sitä ei synkronoi ympäristön aikaan mikään ulkoinen signaali (Reppert *ym.* 2001). Esimerkiksi liito-oravilla (*Glaucomys volans*) vapaa biologinen vuorokausikello jätättää noin 21 minuuttia 24 tunnissa (P.J. DeCoursey 2002).

4. Vuorokausirytmien säätely

4.1. Suprakiasmaattinen tumake

Vuorokausirytmien olemassaolo havaittiin suhteellisen varhain, mutta syntymekanismit on saatu selville vasta hiljattain. Uutta tietoa on saatu etenkin tutkimalla geenimutaatioita jyrksijöillä ja banaanikärpäsessä. Yksittäinen, paljon tutkittu ja tutkimusta eteenpäin vienyt mutaatio on hamstereilla esiintyvä *tau*-mutaatio, joka aiheuttaa vuorokausirytmien lyhentymisen normaalista 24 tunnista 22 tuntiin heterotsygooteilla ja 20 tuntiin homotsygooteilla. Tätä mutaatiota hyväksi käyttäen Martin R. Ralph *ym.* (1990) todistivat ensimmäisenä, että aivojen hypothalamuksessa sijaitseva suprakiasmaattinen tumake (SCN, suprachiasmatic nucleus) toimii elimistön ylimpänä vuorokausirytmien säätelijänä. Hamstereilla tehdyssä tutkimuksessa homo- tai heterotsygoottisesti *tau*-mutaation omaavilta luovuttajilta siirrettiin SCN villityypin vastaanottajille, joiden oma SCN oli tuhottu ja sen seurauksena vuorokausirytmistö todistettavasti kadonnut. Vastaanottajien vuorokausi palasi siirroksen jälkeen ja se vastasi aina luovuttajan vuorokausirytmistöä: mutaation suhteen homotsygootti siirre sai aikaan 20 tunnin ja heterotsygootti siirre 22 tunnin rytmin, eikä vastaanottajan genotyyppi vaikuttanut rytmiin lainkaan. Tästä Ralph *ym.* päättelivät, että rytmiä todellakin säätelee SCN.

Eläinten elimistöissä useassa kudoksessa ja yksittäisissä soluissa on kyky tuottaa endogeenisiä rytmejä ja toimia kellon tavoin. Koko elimistön biologista kelloa ohjaa kuitenkin tyypillisesti yksi kudokseksi tai rakenne. (Hill *ym.* 2012) Vuorokausirytmien toiminta on näin ollen hierarkista (Reppert & Weaver 2002). Selkärankaisten biologista kelloa säätelee ylimpänä hypothalamuksessa sijaitseva, noin 20 000 neuronista koostuva suprakiasmaattinen tumake (SCN, suprachiasmatic nucleus). SCN on muusta hermoston toiminnasta erillään olevana omalaatuinen ja erityinen osa nisäkkäiden fysiologiaa. SCN:n tärkein tehtävä on vastaanottaa ajastussignaaleja ja niiden perusteella avulla luoda vuorokausirytmistö ja välittää se muulle elimistölle (Reppert & Weaver 2002). Rytmistö syntyy tumakkeessa geenien ilmenemisen ja proteiinipitoisuuksien säätelyllä. Vaihtelevat proteiinipitoisuudet välittävät lopulta viestiä tumakkeesta eteenpäin muulle elimistölle (Golombek & Rosenstein 2010). Viestin välittyminen on tärkeää, sillä kudoksissa noin 10% geenien ilmentämisestä ja proteiinituotannosta on sidoksissa vuorokausirytmistöön ja ovat täten kellosolujen toiminnasta riippuvaisia (Akhtar *ym.* 2002).

Varsinaisia ns. kellosoluja eli biologisia rytmejä tuottavia soluja ovat suprakiasmaattisen tumakkeen yksittäiset oskillaattorisolut, joista jokainen sisältää koneiston rytmien tuottamiseen. Kellosolut ovat

näin ollen itsenäisesti toimivia, mutta ne toimivat yhdessä yhtenä yksikkönä. On arveltu, että liki kaikki SCN:n solut ovat kellosoluja (Reppert & Weaver 2002). On esitetty, että SCN:n kellosolut voivat edelleen jakautua keskenään eri tehtäviä suorittaviin solupopulaatioihin (Jagota *ym.* 2000, Low-Zeddies *ym.* 2001, Hamada *ym.* 2001 ja Reppert & Weaver 2002). SCN:n solut voivat sekä itse tuottaa rytmiä että säädellä koko eläimen käytöstä vuorokausirytmien mukaisesti (Ralph *ym.* 1990).

Suprakiasmaattisessa tumakkeessa on Colin Pittendrighin (1975) hypoteesin mukaan kahdenlaisia oskillaattorisoluja, jotka eroavat toisistaan toiminnan kautta. Solutyypit nimettiin aamu- ja iltasoluiksi niiden suurimpien aktiivisuusajankohtien mukaan. Nämä solut mm. ns. tallentavat eliön fotoperiodista historiaa eli kuluneita pimeä-valojaksoja ja päivän pituutta sekä reagoivat eri tavoin tästä historiasta riippuen. On esitetty, että kellogeneilla voisi olla eriytyneitä toimintoja näissä kahdessa eri solutyypissä, mutta aiheesta tarvitaan lisää tutkimustietoa (Iganaki *ym.* 2007 ja Golombek & Rosenstein 2010).

SCN:n lisäksi kellosoluja on melkein kaikkialla elimistössä, kuten munuaisissa, maksassa ja sydämessä (Schibler & Sassone-Corsi 2002). Kellosoluja on havaittu myös jopa viljellyissä solulinjoissa. Oskillaattorisolujen kellokoneistoa säätelevien geenien ilmenemistä on havaittu lisäksi SCN:n ulkopuolisilla aivoalueilla (Balsalobre *ym.* 1998, Zylka *ym.* 1998, Yamazaki *ym.* 2000 Reppert *ym.* 2002). SCN:n ulkopuolisia kellosoluja kutsutaan alan kirjallisuudessa ”orjasoluksi”, sillä ne pystyvät tuottamaan 24 tunnin rytmejä ainoastaan muutaman vuorokauden ajan ilman SCN:n ohjausta. Ne eivät siis itsenäisiä vaan riippuvaisia SCN:n ohjeista. Orjasolut säätelevät paikallisesti vuorokausirytmiiin liittyviä fysiologisia toimintoja ja käyttäytymistä. On arveltu, että tällainen hierarkkinen systeemi on syntynyt, koska vain se on tarpeeksi vakaa ja mahdollistaa tarkan säätelyn koko kehon laajuisen rytmien ylläpitämiseksi (Reppert *ym.* 2002).

Molekyylitason mekaniikka orjasoluissa ja SCN:n kellosoluissa on hyvin samankaltainen. Orjasolujen ja SCN:n solujen toiminnassa on kuitenkin edellä kuvattuja eroja. On arveltu, että erot johtuvat kuitenkin enemmän proteiinien pitoisuuseroista ja/tai proteiinien kinetiikasta sen sijaan, että SCN:ssä ilmentyisi jokin erityinen proteiini tai geeni (Reppert *ym.* 2002).

4.2. Suprakiasmaattisen tumakkeen ajastus ympäristön aikaan

Vaikka vuorokausirytmii toimii endogeenisesti eli riippumatta ulkoisesta ympäristöstä, tarvitsee se ympäristöä vastaavassa ajassa pysyäkseen eli synkronoituakseen ajastajan eli edellä mainitun

ympäristön merkkisignaalin. Muuten kello kulkee vapaasti ja alkaa jättämään tai edistämään. Näihin ajastajiin reagoiminen on seurausta evolutiivisesta adaptaatiosta. Suurimmalle osalle eläimistä päivä-yö-rytmi on tärkeä, toisaalta esimerkiksi merten läheisyydessä eläville selkärangkaisille vuorovesirytmit ja kuun kierto ovat merkittäviä (Hill *ym.* 2012). Endogeeniset rytmit ovat yleensä valmiiksi lähellä ympäristön rytmiä, mutta ajastuksella mahdollistuu reagoiminen ja selviäminen muuttuvassa sekä uudessa ympäristössä. Lisäksi, esimerkiksi ihmisillä terveiden aikuisten keskiarvoltaan noin 24,2 tunnin endogeeninen rytmi kääntyisi ilman ajastusta päälaelleen vain kolmen kuukauden kuluttua (Czeisler *ym.* 1999 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Tärkein ajastaja on selkärangkaisilla valo. Se synkronoi SCN:n ympäristön aikaan selkärangkaisilla silmän verkkokalvon eli retinan gangliosolujen kautta. Verkkokalvolta tumakkeeseen ajastajasignaali kulkee pääasiassa retinohypotalamisen reitin kautta (Wright & Czeisler 2002, Lucas *ym.* 2001 ja Reppert *ym.* 2002).

Tärkeimpiä ajankohtia valon avulla tapahtuvalle ajastukselle ovat aamu- ja iltahämärä. Verkkokalvon solut vastaanottavat tällöin tärkeimmät signaalit, jotka ajastavat vuorokausirytmia ympäristöön aikaan sopivaksi (Golombek & Rosenstein 2010). Tämä johtuu siitä, että suprakiasmaattisen tumakkeen solut ovat erityisen herkkiä solukalvon sähkönjohtavuuden muutoksille (Meijer & Schwartz 2003). Valosignaali yleensä pienentää solukalvon sähkönjohtavuutta, ja SCN on herkimmillään kun valon määrä nopeasti vähenee illalla tai nousee aamulla (Meijer & Rietveld 1989). Tumake havaitsee valoa herkimmin 0,1-1 luxin voimakkuudella, mikä vastaa hyvin hämärää valoa (Meijer & Schwartz 2003).

Myös yöeläimet käyttävät valoa kellonsa ajastamiseen: Patricia DeCourseyn (1986) tutkimuksissa havaittiin ja todistettiin, että yöeläimet vastaanottavat valosignaaleja ennen iltahämärän aikaan ennen yön alkamista, ja käyttävät näitä signaaleja ajastamaan kellonsa vastaamaan ympäristön aikaa. Ilman tätä valosignaalia tutkimuksessa käytetyn liito-oravan vuorokausirytmii alkoi edistämään (DeCoursey 1986 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Valon lisäksi on olemassa myös muita signaaleja, jotka pystyvät säätelemään biologisten kellojen rytmiä (Golombek & Rosenstein 2010). Tutkimusta on tehty esimerkiksi sokeilla ihmisillä, joilla sosiaalisen stimuluksen havaittiin olevan tärkein rytmiä ajastava tekijä (Lund 1974 ja Golombek *ym.* 2010). Myöhemmissä tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että jotkin kemialliset yhdisteet, tutkimuksissa käytettyjen koe-eläinten käsittely ja muiden koe-eläinten läsnäolo ja ihmisillä mm. fyysinen rasitus vaikuttavat vuorokausirytmiiin. Kemiallisia ajastajia voivat olla esimerkiksi jotkin lääkeaineet, sillä valosignaali kulkeutuu SCN:ään kemiallista signaalipolkua pitkin. Lääkemolekyylit

voi siis sitoutua samoihin reseptoreihin kuin valon aikaansaaman signaalipolun molekyylit (Golombek *ym.* 2010).

Valosta riippumattomien ajastajien vaikutusmekanismit eivät ole kuitenkaan vielä tarkalleen tunnettuja, eikä ole selvää voivatko ne vaikuttaa rytmiin yksistään vai ainoastaan yhdessä toistensa kanssa. On kuitenkin pystytty todistamaan, ettei valoon liittyvä ajastussignaali ole näiden vaikutusten taustalla, eli ne ovat siitä erillisiä vaikuttajia. Valon ollessa tärkein ajastaja, kaikki valoon liittymättömät ajastajat on ryhmitelty yhdeksi valosta riippumattomien eli ei-foottisten ajastajien ryhmäksi (Golombek & Rosenstein 2010).

4.3. Ympäristön muu vaikutus vuorokausirytmiiin

Ympäristö vaikuttaa vuorokausirytmiiin ajastuksen lisäksi myös toisella tavalla. Ympäristön signaalit voivat itsessään muokata sisäisen kellon vasteita ja vaikutuksia kehossa. Tiettyt signaalit voivat siis toisin sanoen ohittaa ajastusmekanismiin, ja vaikuttaa siihen, millaisia vaikutuksia kello saa elimistössä aikaan. Tätä ilmiötä kutsutaan peittämiseksi (eng. masking). Peittämisessä ajastuksen aikaansaamat muutokset vuorokausirytmiiä säätelevien geenien ilmentymisessä voidaan myös näin ollen ohittaa (Golombek & Rosenstein 2010 ja Marques & Waterhouse 1993). Peittäminen on kuitenkin riippuvaista vuorokaudenajasta: peittämistä voi tapahtua, jos sen aikaansaava signaali esiintyy juuri oikealla aikavälillä (Aschoff & von Goetz 1988). Muulloin ajastuksen normaalit mekanismit estävät peittämisen (Golombek & Rosenstein 2010 ja Marques & Waterhouse 1993).

Jotta peittäminen on voinut kehittyä, on siitä täytynyt olla jotain evolutiivista hyötyä. Tämän hyödyn arvellaan liittyvän yksilöä ympäristön ärsykkeisiin reagoimisen nopeutumisenä ja parantumisenä ja näin mahdollistavan paremman selviytymisen (Golombek *ym.* 2010).

Ei vielä tarkkaan tiedetä, mikä on peittämisen taustalla oleva mekanismi ja mitä reittiä signaali ympäristöstä aivoihin kulkee. Tutkimuksissa on havaittu, että peittämisen signaalireitit poikkeavat ajastuksen reittien tapaan värien näkemiselle välttämättömistä reiteistä. Ajastuksen mekanismeille välttämätön melanopsiini-valopigmentti on todennäköisesti mukana myös peittämisessä, sillä näitä molekyylejä sisältävien gangliosolujen tuhoaminen on koe-eläimiltä vienyt sekä ajastumisen että peittämisen (Mrosovsky *ym.* 1999). Myös muut hermoston välittäjäaineet reseptoreineen ovat osallisina peittämisessä (Doyle & Menaker 2007). On havaittu, että retinohypotalaminen välittäjäaine ja käpylisäkkeen adenylaattisyklaasin aktivoiva polypeptidi (PACAP) ja

proteiinikinaasireittiä aktivoiva deksametasooni-proteiini (eng. deksamethasone-binding protein) ovat tärkeitä, sillä niiden puute heikensi ympäristön signaalin aikaansaamaa vuorokausirytmien ajastusta sekä PACAP:in tapauksessa vähensi myös peittämistä. Deksametasoonin tapauksessa tätä ei kuitenkaan tapahtunut, joten ei-visuaalinen valon aistiminen ei välttämättä ole riippuvaista tästä molekyylisestä (Chen *ym.* 2004, Colwell *ym.* 2004 ja Golombek & Rosenstein 2010). Dopamiini ja D2-reseptorireitti ovat lisäksi mukana peittämisen mekanismeissa. Myös SCN:n humoraaliset signaalit säätelevät vuorokausirytmien fysiologiaa. Esimerkiksi prokinetisiini 2, EGF (epidermal growth factor) ja TGF-1 (transforming growth factor 1) säätelevät peittämistä ja sen herkkyyttä (Colwell *ym.* 2004 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Ajastus valolla ja valosta riippumattomilla tekijöillä sekä peittäminen yhdessä säätelevät ja hiovat vuorokausirytmien tarkkuutta ja lisäävät sen kykyä sopeutua erilaisiin ympäristöihin sekä muutoksiin. Tämä selittää, miksi hyvin erilaisilla lajeilla on samalla mekanismilla toimiva vuorokausirytmia ohjaava kellokoneisto (Golombek & Rosenstein 2010). Kellokoneiston proteiinien pitoisuuksien heilahteluita synnyttävät geenit ovat hyvin konservoituneita, ja ovat näkyvissä hyvin kaukaisissakin sukulaisissa. Tämä viittaa mekanismin yhteiseen alkuperään eli toisin sanoen ominaisuuden voidaan epäillä olevan monofyleettinen (Dunlap *ym.* 1999 ja Golombek & Rosenstein 2010).

4.4. Ajastussignaalin kuljettaminen suprakiasmaattiseen tumakkeeseen

Valosignaali kulkee retinasta SCN:ään retinohypotalamisen reitin (RHT) kautta. Reitti lähtee verkkokalvon gangliosoluista ja kulkee SCN:ään silmien takaa lähtevän optisen kiasman kautta (Golombek & Rosenstein 2010). Koska reitti on erillinen verkkokalvon näkemisestä vastaavista sauva- ja tappisolusta, myös sokeiden eläinten RHT voi toimia (Negróni *ym.* 1997). On kuitenkin havaittu, että joillain sokeilla ihmisillä gangliosolujen ajastuskyky on hävinnyt. On todennäköistä, että sokeutumistapa ja silmän vaurioitumisen laajuus vaikuttavat siihen, säilyvätkö gangliosolujen valopigmentit toimintakykyisinä. Jos gangliosolut eivät toimi, sokeilla ihmisillä osittainen ajastussignaali voidaan saada myös valosta riippumattomilla ajastajilla, joita on kuvattu edellä tarkemmin. Täysin sokeilla ihmisillä vuorokausirytmii ei kuitenkaan noudata täysin ympäristön rytmiä ajastussignaalien puutteen johdosta (Sack *ym.* 2000 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Välittäjäaineina RHT:llä toimivat mm. glutamaatti, aspartaatti ja PACAP. Suurin rooli on kuitenkin glutamaatilla. (Ebling 1996 Golombek & Rosenstein 2010). Retinan gangliosolut vapauttavat

valosignaalin vastaanotettuaan glutamaattia, joka kulkeutuu SCN:n hermotukisoluihin astrozyytteihin. Näissä soluissa glutamaatti vaikuttaa suoraan vuorokausirytmien toimintaa säätelevien geenien ilmenemiseen (Golombek & Rosenstein 2010). Hermosolujen ja astrozyttien pinnan glutamaattireseptorit poikkeavat toisistaan, mikä on merkki solujen erilaistumisesta ja eri rooleista ajastumisen alkuvaiheessa (Zhang 2006). Glutamaatti on siis avaintekijä valopulssin muuttamisessa biokemialliseksi signaaliksi SCN:ssä saaden aikaan rytmisiä heilahteluita kellogeenien ilmenemisessä ja proteiinien pitoisuuksissa soluissa (Golombek & Rosenstein 2010). Glutamaatin merkitystä ajastamisessa kuvaa myös havainto siitä, että glutamaattireseptoreiden estäminen SCN:ssä estää valopulssien vaikutukset vuorokausirytmiiin, eli toisin sanoen estää ajastamisen kokonaan (Zhang 2006).

Valosta riippumaton ajastus voi tapahtua kahta reittiä pitkin. Genikulohypotalaminen reitti (GHT) lähtee hypotalamuksen yläpuolisesta talamuksesta (thalamic intergeniculate leaflet) ja sen välittäjäaineina toimivat neuropeptidi-Y, gamma-aminovoihappo (GABA) ja endorfiinit (Biello *ym.* 1994 ja Golombek & Rosenstein 2010). Toisena reittinä on serotonerginen eli serotoniinia välittäjäaineena käyttävä reitti, joka on lähtöisin Raphen tumakkeesta aivorungosta (eng. raphe nuclei projection). Valon kuitenkin ollessa tärkein ajastaja, myös tärkein ajastussignaaleja kuljettava kanava on retinohypotalaminen reitti, eikä GHT:ä tai serotonergista reittiä ole tutkittu yhtä paljon (Golombek & Rosenstein 2010). Eri reitit vaikuttavat kuitenkin tekevän yhteistyötä keskenään, sillä GHT:n ja RHT:n on havaittu olevan yhteydessä toisiinsa huolimatta niiden anatomisesta erillisyydestä. Tästä todisteena on se, että jos GHT:hen aiheutetaan sen toiminnan estäviä vaurioita, häiritsee tämä myös RHT:n kautta tapahtuvaa ajastusta (Harrington & Rusak 1988).

4.5. Ajastussignaalin vastaanottavat valopigmentit verkkokalvolla

Vuorokausirytmiiä ajastava valosignaali vastaanotetaan verkkokalvon valolle herkissä gangliosoluissa. Gangliosolut ovat sauva- ja tappisolujen ohella kolmas verkkokalvon valoa aistivat soluryhmä (Van Gelder & Buhr 2016). Vaikka värien näkemiseen välttämättömät sauva- ja tappisolut vaurioituisivat, silmän kyky vastaanottaa ajastussignaaleja ei siis automaattisesti katoa (Sack *ym.* 2000 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Verkkokalvon gangliosoluissa valosignaalin vastaanottaa valopigmentti. Tärkein näistä pigmenteistä on melanopsiini. Sitä ekspressoidaan laajasti liki kaikissa gangliosoluissa, joista on suora yhteys SCN:ään (Hattar *ym.* 2002, Gooley *ym.* 2001 ja Hannibal *ym.* 2002). On havaittu

myös, että SCN:ään yhteydessä olevat melanopsiinia sisältävät gangliosolut reagoivat valoon jopa eristettyinä muusta verkkokalvosta, mikä korostaa niiden itsenäistä roolia (Hattar *ym.* 2002 ja Berson *ym.* 2002).

Melanopsiinin lisäksi verkkokalvon gangliosolut käyttävät muitakin pigmenttejä, kuten neuropsiinia valon havaitsemiseen. (Buhr *ym.* 2015). Uusimpien Van Gelderin ja Buhrin tutkimuksen (2016) mukaan myös silmän sarveiskalvo vastaanottaa ajastussignaaleja neuropsiinivalopigmenttien avulla. Neuropsiinia esiintyy myös muualla elimistössä, esimerkiksi ihon soluissa. Tämä teoriassa voisi mahdollistaa ihon aistivan myös vuorokausirytmää valopigmenttien avulla, mutta väite on nykytiedon mukaan täysin hypoteettinen ja aihe vaatii runsaasti lisää tutkimusta. Melanopsiinin ja neuropsiinin lisäksi enkefalopsiinin on myös ehdotettu olevan yksi verkkokalvon gangliosolujen valopigmenteistä (Van Gelder & Buhr 2016). Rodopsiinipigmenttien lisäksi verkkokalvossa on siis muitakin valopigmenttejä eli valon fotoneihin konformaatiomuutoksella reagoivia molekyylejä (Purves *ym.* 2008).

5. Vuorokausirytmien syntyminen suprakiasmaattisessa tumakkeessa

Vuorokausirythmi syntyy SCN:ssä geenien ilmenemisen säätelyllä ja sitä seuraavien proteiinipitoisuuksien muuttumisella. Tärkeimmät vuorokausirytmien aikaansaavat geenit ovat *CLOCK* ja *BMAL1*. Ne aktivoivat toisten geenien koodausta eli toimivat transkriptiotekijöinä sekä lisäävät geenien ilmenemistä. Tällä tavoin ne muodostavat rytmien syntymisen perustan (Gekakis *ym.* 1998 ja Reppert & Weaver 2002).

CLOCK ja *BMAL1* säätelevät rytmia kahdella eri mekanismilla. Ensimmäisessä säätelyreitissä ne muodostavat ensin aktivoituessaan heterodimeerin eli kahdesta erilaisesta osasta muodostuvan molekyylien yhteenliittymän eli kompleksin. Tämä kompleksi puolestaan aktivoi kolmen period-geenin (*PER1-3*) ja kahden kryptokromi-geenin (*CRY1-2*) transkription sitoutumalla niiden E-box-säätelyalueelle nukleotidisekvenssiin CACGTG (Gekakis *ym.* 1998). Näiden geenien koodaamat period- ja kryptokromiproteiinit muodostavat kompleksin ja kulkeutuvat takaisin tumaan, jossa kryptokromiproteiinit estävät *CLOCK*- ja *BMAL1*-heterodimeeriä ja vähentävät niiden geenien ilmenemistä. Tätä reittiä kutsutaan negatiiviseksi proteiinien *CLOCK*-*BMAL1*-kompleksia estävän vaikutuksen vuoksi (Shearman *ym.* 2000).

Toisessa, monimutkaisemmassa reitissä *CLOCK*-*BMAL1*-kompleksi ensin aktivoi *PER*- ja *CRY*-geenien lisäksi Rev-Erb α -geenien ilmenemisen (Preitner *ym.* 2002). Säätelyreitin idea perustuu siihen, että *BMAL1*-geenin koodaaman proteiinin pitoisuus on huipussaan 12 tuntia period- ja kryptokromiproteiinien pitoisuuksien huipun jälkeen (Shearman *ym.* 2000). REV-ERB α -proteiinin tehtävänä on vähentää Bmal1-proteiinin määrää. Kun Bmal1-proteiinipitoisuus laskee, period- ja kryptokromiproteiinien pitoisuudet nousevat. Kryptokromiproteiinit vähentävät tumassa ensimmäisen reitin tavoin *CLOCK*-*BMAL1*-kompleksin ilmenemistä. Tämä vastaavasti laskee period- ja kryptokromi-proteiinien sekä REV-ERB α -proteiinien määrää, kun *CLOCK*-*BMAL1*-kompleksi ei ole aktivoimassa niiden ilmenemistä. Tämä poistaa REV-ERB α -proteiinien Bmal1:tä estävän vaikutuksen (Shearman *ym.* 2000 ja Reppert & Weaver 2002).

Period- ja kryptokromigeenit ja niiden proteiinit ovat välttämättömiä SCN:n toiminnalle, sillä *PER*- tai *CRY*-geenien toiminnan estäminen saa aikaan häiriöitä vuorokausirytmisissä. Yhden geenin mutaatio ei kuitenkaan välttämättä haittaa, sillä muut geenit voivat paikata tämän geenin puutteen (Bae *ym.* 2001).

Vuorokausirytmien säätelyyn toisen tason tuo edellä kuvattujen reiteillä toimivien proteiinien säätely. Fosforylaatiolla eli fosfaattiryhmän lisäämisellä on suuri merkitys, sillä itse asiassa CLOCK-BMAL1-kompleksi aktivoi geenien ilmenemistä eniten silloin, kun sen pitoisuus solussa pienimmillään (Lee *ym.* 2001). Tämä viittaa siihen, että kompleksin aktiivisuutta säätelee sen pitoisuuden sijaan se, onko kompleksi fosforyloitu vai ei. Tämän lisäksi on havaittu, että fosforylaatio vaikuttaa myös CLOCK-BMAL1-kompleksin kuljettamisessa tumaan ja kompleksia estävien molekyylien aktivaatiossa (Hirano *ym.* 2016).

Kinaasit ovat molekyyliä, jotka fosforyloivat toisia molekyyliä. Vuorokausirytmien säätelyn kannalta tärkeitä kinaaseja ovat kaseiini-kinaasi I ϵ (CKI ϵ), jonka puutos tai virheellinen geenimuoto aiheuttaa mm. hamstereissa tunnetun vuorokausirytmien lyhentävän *tau*-mutaation. Häiriöt aiheuttavat ihmisissä myös lyhempää vuorokausirytmien. CKI ϵ tehtävänä on fosforyloida PER1- ja PER2-proteiineja sekä CRY1-, CRY2- ja BMAL1-proteiineja. Toinen tärkeä kinaasi, kaseiini-kinaasi δ (CKI δ) vaikuttaa CKI ϵ :n tavoin (Eide *ym.* 2002).

Fosforylaation lisäksi vuorokausirytmien säätelymolekyyliin voidaan vaikuttaa niiden tumaan kuljetuksen säätelyllä. Period-proteiinit siirtävät muita kellokoneiston proteiineja tumaan, jolloin elimistö voi period-proteiineja säätelemällä vaikuttaa ylemmällä tasolla vuorokausirytmien (Vielhaber *ym.* 2001). Lisäksi *timeless*-geenin koodaama proteiini TIM kuljettaa period-proteiineja tumaan, ja on myös välttämätön vuorokausirytmien toiminnalle ainakin banaanikärpäksillä (Williams & Sehgal 2000 ja Reppert & Weaver 2002).

Kolmas tapa säädellä kellokoneiston molekyyliä on timeosomiksi (eng. timeosome) kutsutun kompleksin muodostamisella. Timeosomi koostuu samoista molekyyleistä, jotka vaikuttavat vuorokausirytmien säätelyssä: kryptokromi- ja period-proteiineista, CKI ϵ :stä ja CKI δ :stä sekä CLOCK-BMAL1-kompleksista (Lee *ym.* 2001). Timeosomi vaikuttaa muiden molekyylien toimintaan molemmissa säätelyreiteissä vähentäen proteiinien pitoisuuksia ja täten tuoden uuden tason reittien säätelyyn. Tämä moninaisten säätelytasojen olemassaolo on edelleen osoitus siitä, kuinka vuorokausirytmien tarkkuus ja sopeutuvuus on seurausta monimutkaisesta koneistosta (Reppert & Weaver 2002).

Eri geenien vaikutuksia monimutkaiseen vuorokausirytmien ajastuskoneistoon on tutkittu mutanttihiirillä, joilla jokin geeni puuttuu kokonaan (Golombek & Rosenstein 2010). Tuloksen eivät ole kuitenkaan yksiselitteisiä, sillä koneistoon osallistuvien geenien ja proteiinien vaikutukset ovat monimutkaisia ja vain harva niistä vaikuttaa ajastukseen yksinään tai edes vain yhteen osaan

koneistoa (Reppert & Weaver 2001). Sen sijaan koneistoa säätelee kaikista näistä tekijöistä muodostuva verkko: esimerkiksi ilman *cry*-geenejä koe-eläimet kadottavat vuorokausirytmensä jatkuvassa pimeydessä, mutta 24-tunnin valojaksoissa näiden geenien puuttuminen lisääkin herkkyyttä muuttaa kehon rytmiä ulkoisen ympäristön valo-pimeärytmiä vastaavaksi (Spoelstra *ym.* 2004). Transkriptiotekijä *Bmal1*:n täydellinen puuttuminen aiheuttaa koe-eläimissä vuorokausirytmien pieniä häiriöitä valo-pimeäolosuhteissa, mutta vakavampaa rytmien häiriintymistä vain kokoaikaisessa pimeydessä (Akashi & Takumi 2005). *Rev-erb α* :n puutos aiheuttaa puolestaan vuorokausirytmien edistymistä (Ueda *ym.* 2002). Näitä erilaisia kellokoneistoon vaikuttavia muutoksia on löydetty ainakin liki 20, ja vaikka jokaisen vaikutukset ovat hyvin erilaisia, yhteistä mutaatioille on kuitenkin se, että yksittäisinä geenipuutoksina mikään ei aiheuta rytmien pysähtymistä. Tämä tarkoittaa sitä, että mutaatioiden aiheuttamista häiriöistä kuten rytmien viivästyemisestä, aikaistumisesta tai esimerkiksi ajastumisen herkkyyden muutoksista huolimatta koneisto pystyy osittain kompensoimaan puutokset muiden geenien avulla (Reppert & Weaver 2002). Lisäksi se, että mutaatiolla on erilaisia vaikutuksia riippuen siitä, pidetäänkö koe-eläimiä jatkuvassa pimeydessä vai huoneissa, joissa on ajoittain myös valoa, kertoo siitä kuinka viallinenkin kellokoneisto osaa käyttää hyödykseen ympäristön signaaleja ja osittain kompensoida sillä omia puutteitaan. Moniosaisissa mekanismeissa yhden palan puuttuminen siis hajota koko laitetta (Golombek & Rosenstein 2010).

Geenitason lisäksi oman vaikeutensa kellokoneiston tutkimukseen tuo epigenetiikka. Kuten muihinkin elimistön geeneihin, kellogeenien säätelyyn vaikuttaa myös kromosomin epigeneettinen säätely eli DNA-molekyyliä sitovien histoni-molekyylien asetylaatiot ja metylaatiot, joiden avulla kromosomirihma voidaan joko avata geeniluennalle tai pakata niin tiiviisti, ettei transkriptio ole mahdollista. Kellogeenien kohdalla tämä tarkoittaa sitä, että *per*- ja *cry*-geenien aktivointi riippuu histonien asetylaatiosta (Travnickova-Bendova *ym.* 2002). Tämä kaikki tekee kehon kellokoneiston tutkimuksesta entistä monimutkaisempaa, mutta on edelleen osoitus koneiston hienotekoisuudesta (Golombek & Rosenstein 2010).

Kaikki edellä kuvatut esimerkit eri tavoista säädellä *SCN*:n molekyyliä ja siten vuorokausirytmien syntymistä kuvaavat hyvin sitä, kuinka lukemattoman monen tekijän yhteistyönä endogeeninen rytmi lopulta syntyy. Muutamien geenien tai proteiinien puute harvoin johtaa koko rytmien tuhoutumiseen luonnollisissa olosuhteissa. Eri geenien roolit koneistossa voidaan saada näkyviin keinotekoisissa laboratorio-olosuhteissa varta vasten suunnitelluilla mutanttihiirillä, mutta tulee kuitenkin muistaa, ettei vastaavia mutaatioita yleensä esiinny luonnossa, vaan ne ovat karsiutuneet valinnan kautta pois (Golombek & Rosenstein 2010).

6. Vuorokausirytmien nopeuteen vaikuttavat tekijät

Vuorokausirytmien toiminta riippuu sitä säätelevien geenien ja proteiinien toiminnasta. Näin ollen myös kellon nopeus riippuu näistä molekyyleistä. On olemassa lukuisia mutaatioita jotka saavat sisäisen kellon joko edistämään eli kulkemaan nopeammin tai jättämään eli kulkemaan hitaammin. Esimerkiksi mutaatio, jossa *clock*-geenistä puuttuu eksoni 19 aiheuttaa tavallista pidemmän vuorokausirytmien, sillä se vähentää *per*- ja *cry*-proteiinien ilmenemistä, mikä puolestaan hidastaa koko rytmiä. Vuorokausirytmien nopeuttaa esimerkiksi mutaatio kaseiinikinaaseissa CK1 ϵ ja δ . Nämä kinaasit fosforyloivat period-proteiineja, jotka seurauksena viedään solussa hajotettavaksi. Mutaatio kaseiinikinaasigeneissä saa ne toimimaan tehokkaammin ja fosforyloimaan proteiineja liian nopeasti, ja tämä lyhentää vuorokausirytmien pituutta (Gallego & Virshup 2007 ja Hastings *ym.* 2014).

Liikaa edistävä tai jättävä vuorokausirytmien voi aiheuttaa monenlaisia ongelmia, joten kellon nopeuteen on kehitetty keinoja vaikuttaa myös lääkinällisesti (Hastings *ym.* 2014). Liikaa edistävään vuorokausirytmien voidaan käyttää mm. CK1 ϵ / δ -inhibiittoreita, jotka saavat period-proteiinien hajotuksen toimimaan hitaammin. Hiirillä onnistutaan näin luomaan jopa 30 tunnin mittaisia rytmejä (Meng *ym.* 2010 ja Hastings *ym.* 2014).

7. Solujen yhteydenpito suprakiasmaattisessa tumakkeessa ja GABA:n vaikutus vuorokausirytmiiin

SCN:n solut ovat yhteyksissä toisiinsa pääosin kemiallisten signaalien kautta (Reppert *ym.* 2001). Näitä signaaleja välittyy SCN:n hermosolujen välillä päivän aikana yli 50 miljardia (deWoskin *ym.* 2015). SCN:n tärkein välittäjäaine on GABA (Reppert *ym.* 2001). Se on ainoa välittäjäaine aivoissa, jota lähes kaikki SCN:n solut sekä tuottavat että vastaanottavat (Moore & Speh 1993, Liu & Reppert 2000 ja DeWoskin *ym.* 2015). Vuorokausirytmien osalta GABA lisää Wagnerin *ym.* (1997) mukaan päiväsaikaan tumakkeen sähköistä aktiivisuutta, mutta yöaikaan vähentää sitä. Suurimman osan neuroneista epäillään kuitenkin inhiboivan GABA:sta, eikä siitä eksitoituvien neuronien tarkkaa määrää tai sijaintia SCN:ssä vielä tunneta (DeWoskin *ym.* 2015). GABA:n kaksoisvaikutusten syitä ei tiedetä vielä tarkalleen (Moldavan *ym.* 2015). GABA:lla on joka tapauksessa suuri rooli SCN:n synkronisaatiossa ja tumakkeen herkkyydessä valosignaalille (Moore *ym.* 1993 ja Moldavan *ym.* 2015). Toisissa tutkimuksissa on toisaalta havaittu, että GABA pystyy myös häiritsemään SCN:n tuottamia rytmejä (Freeman *ym.* 2013 ja DeWoskin *ym.* 2015). Näin ollen voidaan todeta, että GABA:lla on kyky sekä suurentaa että pienentää hermosolujen kalvopotentiaalia. Kalvon jännite vaikuttaa jänniteohjattuihin kalsiumkanaviin, ja kalsiumin suurentunut pitoisuus saa aikaan CREB-elementin fosforylaation. Fosforyloitunut CREB sitoutuu CRE-transkriptiotekijään, mikä saa aikaan *Period*-geenien transkription. Tämä puolestaan vaikuttaa vuorokausirytmien säätelyyn (DeWoskin *ym.* 2015).

DeWoskinin *ym.* tutkimuksissa (2015) saatiin selville, mikä voi aiheuttaa GABA:n moninaiset ja osittain jopa paradoksaalisilta näyttävät vaikutukset solujen kemialliseen toimintaan. Heidän mukaansa kaikki riippuu siitä, mihin aikaan GABA alkaa vaikuttaa solussa: jos molekyyli läpäisee solukalvon heti solukalvon aktiopotentiaalin jälkeen, lyhenee aika seuraavan mahdollisen aktiopotentiaalin syntymiseen. Tämä mahdollistaa suuremman määrän aktiopotentiaaleja samassa ajassa. Solusta tulee siis sähköisesti aktiivisempi, eli GABA eksitoi solua. Jos GABA-molekyyli puolestaan saapuu soluun silloin, kun aktiopotentiaalista on jo kulunut merkittävä aika, pidentää se aikaa seuraavan aktiopotentiaalin muodostumiseen. Tämä hidastaa aktiopotentiaalien nopeutta ja näin vähentää solun sähköistä aktiivisuutta. Tämä vaikutus johtuu GABA:n reagoimisesta soluliman kloridipitoisuuteen, joka muuttuu SCN:n soluissa mm. aktiopotentiaalin vaiheiden mukaan (DeWoskin *ym.* 2015). Jos kloridi-ioneja on solussa paljon, kuten juuri aktiopotentiaalin jälkeen, vaikuttaa GABA siis eksitoivasti inhiboivan sijaan (Myung *ym.* 2015). Tutkijat havaitsivat tutkimuksissaan myös, että SCN:n takaosassa on enemmän soluja, joiden kloridikonsentraatio on

pysyvästi etuosan soluja suurempi. Tämä voi merkitä sitä, että osa soluista reagoi GABA:an pysyvästi eksitoituen tai inhiboituen. Jäljelle jäävien solujen reaktio molekyyliin riippuisi täten aktiopotentialien aikaansaamista kloridipitoisuuksien muutoksista. Saman tutkimuksen mukaan GABA:sta eksitoituvien solujen joukko aktivoituu synkronoidusti. Tämä kertoo, että SCN:ssä on olemassa GABA:n ohjaama solujen verkko, joka osaltaan ohjaa SCN:n toimintaa ja vuorokausirytmien toimeenpanoa elimistössä. DeWoskinin *ym.* (2015) mallinuksissa kuitenkin myös havaittiin, että SCN voi mahdollisesti muokata GABA:sta eksitoituvien ja inhiboituvien solujen suhdetta, ja että pienikin muutos tässä suhteessa saa aikaan muutoksia solujen synkronoidussa toiminnassa. Tämä vaikuttaa siis SCN:n solujen sähköisen aktiivisuuden määrään kokonaisuutena sekä mahdollistaa synkronisaation säilymisen solujen välillä, vaikka sähköisen aktiivisuuden rytmi muuttuisikin. Tämä lisää SCN:n solujen yhteysverkkoon säätelytason, jolla SCN voi mukauttaa omaa toimintaansa ympäristön tarpeisiin ja vuorokausirytmien kokonaisuuteen nähden (DeWoskin *ym.* 2015).

DeWoskinin *ym.* (2015) tutkimuksessa havaittiin lisäksi, että solujen GABA:n erityis riippuu niiden solukalvon jännitteestä. GABA:a vapautuu lyhyenä pulssina suuri pitoisuus jokaisen aktiopotentialin seurauksena, ja tätä tutkijat kutsuivat faasiseksi GABA:n erittämiseksi. Jotkin solut erittivät GABA:a myös toonisesti eli jatkuvasti pieninä pitoisuuksina ilman riippumatta aktiopotentialista. Toonista GABA:a erittyy päiväaktiivisilla eläimillä etenkin iltopäivällä. Toonisen GABA:n määrä on kuitenkin vain noin 5% faasisen GABA:n määrästä.

Toonisen GABA:n havaittiin säätelevän solujen vuorokausirytmia: GABA:sta eksitoituvat solut erittävät depolarisoituessaan GABA:a toonisesti, ja tällä tavoin säätelevät muiden SCN:n solujen rytmiä saamalla aikaan rytmisen *period*-geenien ilmenemisen. Näin ollen, vaikka toonisen GABA:n osuus on pieni, se on vastuussa SCN:n solujen välisestä viestinnästä ja vuorokausirytmien ylläpidosta. Faasista GABA:a tumake käyttää viestintään muulle elimistölle. Faasinen GABA on tähän hyvä väline, sillä se ei vaikuta tumakkeen omaan aktivoitumiseen eikä sillä ole tutkimuksen mukaan vaikutusta geenien ilmenemiseen (DeWoskin *ym.* 2015).

GABA:n vaikutus vuorokausirytmiiin on monimutkainen, ja edellä mainittujen vaikutusten lisäksi on olemassa muita mekanismeja, joilla se vaikuttaa SCN:n toimintaan (DeWoskin *ym.* 2015). GABA:n suuresta roolista elimistön kellokoneistossa kertoo kuitenkin mm. se, että sillä on vaikutusta myös vuodenaikaisrytmien säätelyssä (Myung *ym.* 2015).

8. Vuorokausirytmien häiriöiden terveydellisistä vaikutuksista

Nykymaailmassa omat haasteensa ihmisten vuorokausirytmille tuovat keinovalo sekä nopeat, ennustamattomat muutokset muussa elämän rytmissä. Kuten edellä on kuvattu, valon lisäksi myös sosiaalinen stimulaatio ja fyysinen liikkuminen vaikuttavat vuorokausirythmiin, joten esimerkiksi vuorotyötä tekevien ihmisten vuorokausirytmissä on usein häiriöitä (Hastings *ym.* 2014). Tämä johtuu siitä, että vuorokausirythmi on joustavuudestaan huolimatta kehittynyt vakaissa ja ennustettavissa olosuhteissa, joissa valonlähteenä on ainoastaan auringon valo. Toisin kuin länsimaisen yhteiskunnan aikataulut, selkärankaisilla SCN:n ohjaama rytmi ei kuitenkaan muutu silmänräpäyksessä. Sopeutumista esimerkiksi uuteen aikavyöhykkeeseen rajoittaakin siis kellokoneiston reagoinnin hitaus (Golombek & Rosenstein 2010).

Kellokoneiston sopeutumisen hitaus tulee esiin esimerkiksi aikaerorasiuksessa eli ”jet-lagissa”. Siinä kehon paikallisten kellosolujen rytmi ei vastaa enää ympäristön rytmiä. Kellosolut eivät ole myöskään enää rytmissä keskenään (Golombek & Rosenstein 2010). Jet-lagin oireet kuten väsymys ja hämmennys ovat seurausta näiden kellojen uudelleenohjelmoinnista. Lyhytaikaisena tämä ei ole vaarallista; pitkittyessään esimerkiksi vuorotyön seurauksena aikaerorasiitus nostaa riskiä sairastua syöpään, diabetekseen ja mm. ylipainoon (Agostino *ym.* 2007 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Myös vuorokausirytmien muut häiriöt vaikuttavat terveyteen. Uni-valverytmien häiriintymisen lisäksi ihmisillä esimerkiksi keskittyminen ja tehokkuus kärsivät, reaktioaika pitenee ja riski sairastua esimerkiksi II-typin diabetekseen kasvaa. Esimerkiksi insuliiniresistanssi voi kehittyä vuorokausirytmien häiriintymisen seurauksena siten, että veren glukoositason säätely vaikeutuu, kun maksa, haima ja luustolihakset eivät ole keskenään samassa rytmissä (Agostino *ym.* 2007 ja Golombek & Rosenstein 2010).

Alkulähde vuorokausirytmien häiriölle voi olla missä vain kohtaa elimistön kellokoneistoa: koneiston virheellinen toiminta, rytmien toimeenpano elimistössä tai ristiriita elimistön ja ympäristön välillä voi saada aikaan ongelmia. Kellokoneiston virheellisestä toiminnasta esimerkkejä ovat mutaatiot, jotka aiheuttavat kaseinikinaasi CK1 ϵ/δ :n toimimattomuutta PER-proteiinien fosforylaatioissa. Seurauksena on edistävää vuorokausirythmiä, mikä puolestaan aiheuttaa unettomuutta. Kyseinen häiriö on seurausta mutaatiosta *ck1 δ* -geenissä, joka on ihmisillä polymorfinen. Osan unihäiriöistä kärsivien ihmisten oireet voidaan siis jäljittää kyseisiin geenimuotoon (Xu *ym.* 2005 Golombek & Rosenstein 2010).

Vuorokausirytmä vaikuttaa myös mielenterveyteen ja mielialaan, ja tutkimuksissa onkin havaittu yhteys masennuksen ja vuorokausirytmien häiriintymisen välillä. Mielenkiintoisesti yhteys toimii molempiin suuntiin: häiriöt voivat saada aikaan mielenterveysoireita, ja nämä oireet edelleen vaikuttavat vuorokausirytmien säätelyyn (McClung 2007 ja Golombek & Rosenstein 2010). Tämä tekee SCN:sta ja koko kehon kellokoneistosta myös terveydenhuollon kannalta tärkeän tutkimuskohteen. Tärkeyden havaitsemisesta huolimatta unen, valon määrän ja rytmien säätelyn välisistä vuorovaikutussuhteista ei tiedetä vielä kovin tarkasti ja uusien hoitokeinojen kehittäminen vaatii lisää tutkimusta (Golombek & Rosenstein 2010).

Vuorokausirytmien laajojen terveysvaikutusten johdosta sen häiriöihin on kehitetty erilaisia hoitokeinoja. Kronoterapia on lääketieteen ala, jossa elimistön sisäiseen kelloon yritetään vaikuttaa esimerkiksi valon avulla. Valoterapialla kuten kirkasvalolampuilla rytmä voidaan säätää oikeaan kohtaan etenkin aamuisin (Golombek & Rosenstein 2010). Flyktmanin *ym.* (2015) tutkimuksessa havaittiin, että valoterapiaa voi olla mahdollista antaa myös kallon läpi, sillä valoon reagoivat molekyylit aktivoituivat myös pelkästään korviin suunnatuilla valopulsseilla. Farmakologiassa unirytmien häiriöitä hoidetaan kronobiooteilla eli vuorokausiin vaikuttavilla molekyyleillä, kuten melatoniinilla. Lääkehoidolla on kuitenkin rajoituksensa, sillä eniten rytmäin vaikuttaa selkärankaisilla auttamattomasti valo. Omaa rytmäin voi parhaiten siis korjata mahdollisuuksien mukaan saamalla valoa auringosta tai sen aallonpituuksia matkivilta valonlähteiltä oikeaan aikaan vuorokaudesta. Etenkään pohjoisilla aluilla tämä ei ole useinkaan mahdollista, ja seurauksena on talvisin kaamosoireilua ja kesäisin unettomuutta (Arendt & Skene 2005).

Ikääntyessä kellokoneiston toiminnalle keskeiset proteiinipitoisuuksien vaihtelut pienenevät voimakkuudeltaan, mikä vaikeuttaa sopeutumista muuttuvaan ympäristöön (Gibson *ym.* 2009). Esimerkiksi Zhang *ym.* (1996) mukaan nuorilla hamstereilla on vanhoihin verrattuna noin 20-kertaa parempi sopeutumiskyky muutoksiin ympäristön valorytmisissä. Sama näyttäisi pätevän jollain tasolla myös ihmisiin, sillä esimerkiksi jet-lagin oireet muuttuvat yleensä iän myötä pahemmiksi. Vanhemmilla ihmisillä on myös tunnetusti aikaistunut vuorokausirytmä, mikä näkyy vähempänä unena ja aikasin heräämisenä (Kripke *ym.* 2007). Taustatekijöitä tälle ilmiölle ei tunneta, mutta on esitetty, että vanhetessa näiden vuorokausirytmien häiriöiden taustalla voi mahdollisesti olla silmäsairauksista kuten kaihista tai silmänpainetaudista eli glaukoomasta johtuva väheneminen verkkokalvolle pääsevän valon määrässä. On esitetty, että glaukoomassa syynä on se, että kohonnut paine silmässä vaurioittaa gangliosoluja, jotka tuottavat ajastuksen kannalta keskeistä melanopsiinia (Liu *ym.* 1997). Ikääntymiseen liittyvien anatomisten ja fysiologisten muutosten vaikutuksia vuorokausirytmien toimintaan on kuitenkin tutkittu vasta vähän (Golombek & Rosenstein 2010).

9. Yhteenveto

Vuorokausirytmä on selkärangaisilla hypotalamuksen suprakiasmaattisen tumakkeen säätämä sisäinen kello, joka mahdollistaa ajan kulun havaitsemisen, siihen reagoimisen sekä elintoimintojen rytmien säätelyn. Vuorokausirytmä voidaan tarkastella sekä sen toiminnan että säätelyn kannalta. Tässä tutkielmassa on käsitelty näitä molempia ja lisäksi havainnollistettu vuorokausirytmien tärkeyttä.

Vuorokausirytmä ohjaa mm. aineenvaihduntaa, kehon lämpötilaa ja solunjakautumista. Oikeanlainen rytmien toiminta on eliön jokapäiväisen toiminnan ja menestyksen kannalta hyvin olennainen, ja häiriöt toiminnassa voivat altistaa monenlaisille sairauksille. Vuorokausirytmien säätelyssä ajastus ja SCN ovat keskeisimpiä. Ajastuksessa tärkein on valo etenkin aamu- ja iltahämärän aikaan. Ajastuksesta ovat vastuussa verkkokalvon valopigmentit, joista tärkein on melanopsiini. SCN:ssä säätely tapahtuu geeni- ja proteiinitasolla monivaiheisia reittejä pitkin. Kaiken kaikkiaan vuorokausirytmä on monimutkainen systeemi, ja vaikka tärkeimmät säätelyyn vaikuttavat geenit on tunnistettu, ei kaikkia säätelytapoja ja vaikutuksia elimistössä ei vielä tunneta.

Tutkimustieto vuorokausirytmistä on lisääntynyt huomattavasti tällä vuosikymmenellä, ja esimerkiksi GABA:n rooli on selvinnyt tarkemmin vasta muutamien edellisten vuosien aikana. Lisäksi vuorokausirytmäin vaikuttavien geenien ja proteiinien verkosto on osoittautunut yhä mutkikkaammaksi, ja uusia vaikuttavia tekijöitä löydetään edelleen. Muita tutkimuskohteita viime aikoina ovat olleet SCN:n solujen välinen viestintä ja siihen liittyvät molekyylit. Vuorokausirytmien tutkinnassa on näin siirrytty yleisistä vaikutuksista molekyyli-tason tutkimukseen.

Vuorokausirytmien vaikutukset terveyteen ovat osoittautuneet hyvin laajoiksi, ja kiinnostava on etenkin mielenterveyden ja vuorokausirytmien molempiin suuntiin mahdollisesti ylettyvä vaikutus. Tämä asettaa vuorokausirytmien laajempaan asiayhteyteen ja osoittaa, kuinka elimistössä yhteyksiä löytyy odottamattomienkin asioiden väliltä. Vuorokausirytmien koneiston monimutkaisuus ja suuri merkitys tekevät siitä näin ollen edelleen mielenkiintoisen ja tärkeän tutkimuskohteen.

10. Kirjallisuusviitteet

- Agostino, P. V., Plano, S. A., & Golombek, D. A. (2007). Sildenafil accelerates reentrainment of circadian rhythms after advancing light schedules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(23), 9834-9839. doi:10.1073/pnas.0703388104
- Akashi, M., & Takumi, T. (2005). The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(5), 441-448. doi:10.1038/nsmb925
- Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, *9*(1), 25-39. doi:10.1016/j.smrv.2004.05.002
- Aschoff, J., & Goetz, C. v. (1988). Masking of circadian activity rhythms in hamsters by darkness. *Journal of Comparative Physiology A*, *162*(4), 559-562. doi:10.1007/BF00612521
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, *30*(2), 525-536.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science; Washington*, *295*(5557), 1070-3.
- Biello, S. M., Janik, D., & Mrosovsky, N. (1994). Neuropeptide y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, *62*(1), 273-279. doi:10.1016/0306-4522(94)90331-X
- Buhr, E. D., Yue, W. W. S., Ren, X., Jiang, Z., Liao, H. R., Mei, X., Van Gelder, R. N. (2015). Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(42), 13093-13098. doi:10.1073/pnas.1516259112
- Cambras, T., Weller, J. R., Anglès-Pujoràs, M., Lee, M. L., Christopher, A., Díez-Noguera, A., Iglesia, Horacio O de la. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(18), 7634-7639. doi:10.1073/pnas.0702424104
- Cheng, H. M., Obrietan, K., Cain, S. W., Lee, B. Y., Agostino, P. V., Joza, N. A., . . . Penninger, J. M. (2004). Dexas1 potentiates photic and suppresses nonphotic responses of the circadian clock. *Neuron*, *43*(5), 715-728. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.021
- Czeisler, C. A., Duffy, J. F., Shanahan, T. L., Brown, E. N., Mitchell, J. F., Rimmer, D. W., Kronauer, R. E. (1999). Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5423), 2177-2181.
- DeCoursey, P. J. (1986). Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm. *Journal of Comparative Physiology A*, *159*(2), 161-169. doi:10.1007/BF00612299
- DeWoskin, D., Myung, J., Belle, M. D. C., Piggins, H. D., Takumi, T., & Forger, D. B. (2015). Distinct roles for GABA across multiple timescales in mammalian circadian timekeeping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(29), E3919. doi:10.1073/pnas.1420753112
- Doyle, S., & Menaker, M. (2007). Circadian photoreception in vertebrates. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *72*, 499-508. doi:10.1101/sqb.2007.72.003

- Dunlap, J. C., Loros, J. J., Liu, Y., & Crosthwaite, S. K. (1999). Eukaryotic circadian systems: Cycles in common. *Genes to Cells*, 4(1), 1. doi:10.1046/j.1365-2443.1999.00239.x
- Ebling, F. J. P. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 109-132. doi:10.1016/S0301-0082(96)00032-9
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., & Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 17248-17254. doi:10.1074/jbc.M111466200
- Flyktman Antti, Manttari Satu, Nissila Juuso, Timonen Markku, & Saarela Seppo. (2015). Transcranial light affects plasma monoamine levels and expression of brain encephalopsin in the mouse. *Journal of Experimental Biology*, 218(10), 1521-1526. doi:10.1242/jeb.111864
- Freeman Jr., G. M., Krock, R., Aton, S., Thaben, P., & Herzog, E. (2013). GABA networks destabilize genetic oscillations in the circadian pacemaker. *Neuron*, 78(5), 799-806. doi:10.1016/j.neuron.2013.04.003
- Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), 139-148. doi:10.1038/nrm2106
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5369), 1564-1569.
- Gelder, R. N. V., & Buhr, E. D. (2016). Ocular photoreception for circadian rhythm entrainment in mammals. *Annual Review of Vision Science*, 2(1), 153-169. doi:10.1146/annurev-vision-111815-114558
- Gibson, E. M., Williams III, W. P., & Kriegsfeld, L. J. (2009). Aging in the circadian system: Considerations for health, disease prevention and longevity. *Experimental Gerontology*, 44(1–2), 51-56. doi:10.1016/j.exger.2008.05.007
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063-1102. doi:10.1152/physrev.00009.2009
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature Neuroscience*, 4(12), 1165-1165. doi:10.1038/nn768
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J. M., & Silver, R. (2001). Expression of period genes: Rhythmic and non-rhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7742-7750.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., & Fahrenkrug, J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *Journal of Neuroscience*, 22(1), RC191.
- Harrington, M. E., & Rusak, B. (1988). Ablation of the geniculo-hypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. *Physiology & Behavior*, 42(2), 183-189. doi:10.1016/0031-9384(88)90296-X
- Hastings, M. H., Brancaccio, M., & Maywood, E. S. (2014). Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(1), 2-10. doi:10.1111/jne.12125

- Hattar, S., Liao, H. -, Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. -. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science; Washington*, 295(5557), 1065-70.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2012). *Animal physiology* (3rd ed.). Sunderland (Mass.): Sinauer.
- Hirano, A., Fu, Y., & Ptáček, L. J. (2016). The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(12), 1053-1060. doi:10.1038/nsmb.3326
- Meijer, J. H. & Rietveld, W. J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents ; *Physiological Reviews*, 69(3), 671-707.
- Jagota, A., de la Iglesia, Horacio O, & Schwartz, W. J. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nature Neuroscience*, 3(4), 372-376. doi:10.1038/73943
- Kripke, D. F., Elliott, J. A., Youngstedt, S. D., & Rex, K. M. (2007). Circadian phase response curves to light in older and young women and men. *Journal of Circadian Rhythms*, 5, 4. doi:10.1186/1740-3391-5-4
- Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107(7), 855-867.
- Liu, C., & Reppert, S. M. (2000). GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25(1), 123-128. doi:10.1016/S0896-6273(00)80876-4
- Liu, C., Weaver, D. R., Strogatz, S. H., & Reppert, S. M. (1997). Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 91(6), 855-860. doi:10.1016/S0092-8674(00)80473-0
- Low-Zeddies, S. S., & Takahashi, J. S. (2001). Chimera analysis of the clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell*, 105(1), 25-42. doi:10.1016/S0092-8674(01)00294-X
- Lucas, R. J., Freedman, M. S., Lupi, D., Munoz, M., David-Gray, Z. K., & Foster, R. G. (2001). Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 97-102. doi:10.1016/S0166-4328(01)00274-1
- Marques, M. D., & Waterhouse, J. M. (1994). Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiology International*, 11(3), 146-155. doi:10.3109/07420529409057234
- McClung, C. A. (2007). Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(2), 222-232. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.02.003
- Meijer, J. H., & Schwartz, W. J. (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 235-249. doi:10.1177/0748730403018003006
- Meng, Q., Maywood, E. S., Bechtold, D. A., Lu, W., Li, J., Gibbs, J. E., . . . Loudon, A. S. I. (2010). Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15240-15245. doi:10.1073/pnas.1005101107

- Moldavan, M. G., & Allen, C. N. (2013). GABAB receptor-mediated frequency-dependent and circadian changes in synaptic plasticity modulate retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Physiology*, *591*(10), 2475-2490. doi:10.1113/jphysiol.2012.248047
- Moldavan, M., Cravetchi, O., Williams, M., Irwin, R. P., Aicher, S. A., & Allen, C. N. (2015). Localization and expression of GABA transporters in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *42*(12), 3018-3032. doi:10.1111/ejn.13083
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, *150*(1), 112-116. doi:10.1016/0304-3940(93)90120-A
- Mrosovsky, N., Foster, R. G., & Salmon, P. A. (1999). Thresholds for masking responses to light in three strains of retinally degenerate mice. *Journal of Comparative Physiology A*, *184*(4), 423-428. doi:10.1007/s003590050341
- Myung, J., Hong, S., DeWoskin, D., De Schutter, E., Forger, D. B., & Takumi, T. (2015a). GABA-mediated repulsive coupling between circadian clock neurons in the SCN encodes seasonal time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(29), E3929. doi:10.1073/pnas.1421200112
- Negrone, J., Nevo, E., & Cooper, H. M. (1997). Neuropeptidergic organization of the suprachiasmatic nucleus in the blind mole rat (*spalax ehrenbergi*). *Brain Research Bulletin*, *44*(5), 633-639. doi:10.1016/S0361-9230(97)00306-7
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*, *106*(3), 223-252. doi:10.1007/BF01417856
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251-260.
- Purves, D., Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., Williams, S. M. (2008). *Neuroscience* (4th ed ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, *247*(4945), 975-978.
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.647
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*(6901), 935-941. doi:10.1038/nature00965
- Sack, R. L., Brandes, R. W., Kendall, A. R., & Lewy, A. J. (2000). Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *New England Journal of Medicine*, *343*(15), 1070-1077. doi:10.1056/NEJM200010123431503
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*, *111*(7), 919-922.
- Schwartz, M. D., Wotus, C., Liu, T., Friesen, W. O., Borjigin, J., Oda, G. A., & Iglesia, Horacio O de la. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(41), 17540-17545. doi:10.1073/pnas.0906382106

- Selby, C. P., Thompson, C., Schmitz, T. M., Gelder, R. N. V., & Sancar, A. (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(26), 14697-14702. doi:10.1073/pnas.260498597
- Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Reppert, S. M. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5468), 1013-1019.
- Spoelstra, K., Albrecht, U., van der Horst, Gijsbertus T J, Brauer, V., & Daan, S. (2004). Phase responses to light pulses in mice lacking functional per or cry genes. *Journal of Biological Rhythms*, *19*(6), 518-529. doi:10.1177/0748730404268122
- Thompson, C. L., Blaner, W. S., Gelder, R. N. V., Lai, K., Quadro, L., Colantuoni, V., . . . Sancar, A. (2001). Preservation of light signaling to the suprachiasmatic nucleus in vitamin A-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(20), 11708-11713. doi:10.1073/pnas.201301498
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(11), 7728-7733. doi:10.1073/pnas.102075599
- Ueda, H. R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Hashimoto, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, *418*(6897), 534-539. doi:10.1038/nature00906
- Vielhaber, E. L., Duricka, D., Ullman, K. S., & Virshup, D. M. (2001). Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(49), 45921-45927. doi:10.1074/jbc.M107726200
- Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., & Yarom, Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, *387*(6633), 598-603. doi:10.1038/42468
- Williams, J. A., & Sehgal, A. (2001). Molecular components of the circadian system in drosophila. *Annual Review of Physiology*, *63*, 729-755.
- Wright, K. P., & Czeisler, C. A. (2002). Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees. *Science; Washington*, *297*(5581), 571.
- Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., . . . Fu, Y. (2005). Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, *434*(7033), 640-644. doi:10.1038/nature03453
- Zhang, L., Kolaj, M., & Renaud, L. P. (2006). Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and gabaergic neurotransmission: State-dependent response patterns observed in vitro. *Neuroscience*, *141*(4), 2059-2066. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.042
- Zhang, Y., Kornhauser, J. M., Zee, P. C., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (1996). Effects of aging on light-induced phase-shifting of circadian behavioral rhythms, fos expression and creb phosphorylation in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, *70*(4), 951-961. doi:10.1016/0306-4522(95)00408-4