

*Zegar tyka. Wszystkich
Stanisław Jerzy Lec*

BRONISŁAW CYMBOROWSKI

*Zakład Fizjologii Bezkręgowców,
Uniwersytet Warszawski
ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa
e-mail: bron@asp.biogeo.uw.edu.pl*

GENY ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Wiele procesów fizjologicznych, biochemicznych czy związanych z zachowaniem się organizmów, począwszy od bakterii (wykryto je nawet u cyjanobakterii — KONDO i współaut. 1994) a skończywszy na człowieku, wykazuje wyraźną rytmiczność (CYMBOROWSKI 1984, 1991, 1992; HASTINGS i współaut. 1991). Procesy cykliczne obejmują bardzo szeroki zakres: od sekund (np. skurcze serca) przez tygodnie (np. cykl menstruacyjny) do miesięcy (np. zmiany sezonowe). Wiele z tych procesów przebiega w rytmie obrotu Kuli Ziemskiej dookoła własnej osi, dopasowując się do dnia i nocy. Ewidentnym tego przykładem jest nasz rytm aktywności i snu. Te dobowe rytmy są pod kontrolą endogennych zegarów komórkowych, które mogą być synchronizowane przez bodźce środowiskowe, wśród których najsilniejszym jest światło. W tak zwanych warunkach stałych, na przykład w stałej ciemności lub w stałym oświetleniu, co łatwo można uzyskać w laboratorium, rytmy ciągle istnieją, zmienia się tylko ich okres z 24-godzinnego na krótszy lub dłuższy stąd zwane są rytмами cirkadialnymi (łac. *circa* — około; *dies* — dzień) lub okołodobowymi. Jest to jeden z pierwszych dowodów na istnienie endogennego zegara biologicznego. Zaś ostatnie lata badań z tego zakresu dowiodły, że podstawą funkcjonowania tego mechanizmu są tak zwane geny zegara. Wiele z nich zostało już dokładnie zbadanych, przynajmniej te, które okazały się niezbędne do ujawniania się rytmiki różnych procesów fizjologicznych w warunkach stałych,

czyli pozbawionych dawców czasu (niem. Zeitgeber) pochodzących ze środowiska. We wszystkich badanych przypadkach niezbędnym czynnikiem warunkującym określony rytm jest cyklicznie zmieniający się poziom przynajmniej jednego z białkowych produktów licznych genów zegarowych (CROSTHWAITE i współaut. 1995).

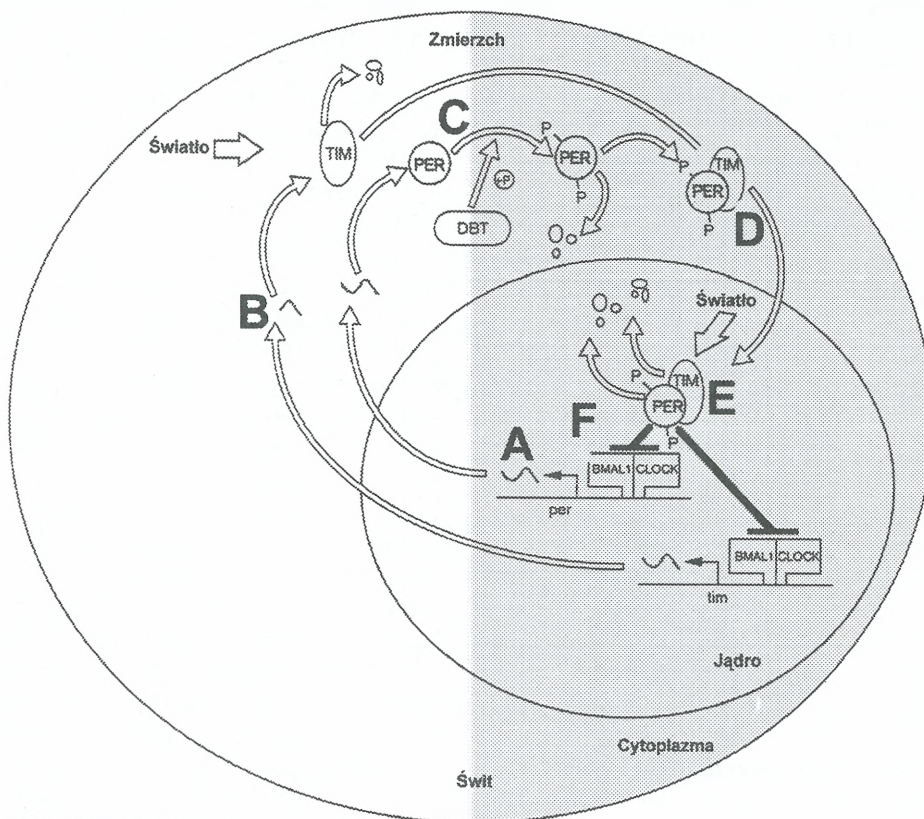
Chociaż nie poznano jeszcze dokładnie w jaki sposób „utrzymywane” są w organizmie dobowe zmiany poziomu białek zegarowych, to w przypadku najlepiej dotychczas zbadanych pod tym względem organizmów: muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i pleśni (*Neurospora crassa*) należącej do grzybów workowców, wydaje się pewne, że białka te regulują transkrypcję własnych genów na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego (KLOSS i współaut. 1998, PRICE i współaut. 1998). Znalazło to swój wyraz w wielu artykułach przeglądowych zamieszczonych w prestiżowych czasopismach takich jak „Nature” czy „Science” (m.in. DUNLAP 1998, REPPERT 1998, SASSONE-CORSI 1998, SCHIBLER, 1998, YOUNG 1998). W niektórych z nich pisze się wprost o „eksplozji” prac związanych z genetycznymi badaniami nad mechanizmem zegara biologicznego.

Ponieważ rozpoczęto też badania nad genetycznym uwarunkowaniem zegara biologicznego ssaków, nie wyłączając także człowieka (BAE i współaut. 1998, ZYLKA i współaut. 1998), zagadnieniom tym będzie poświęcona ostatnia część tego artykułu.

ZEGAR MUSZKI OWOCOWEJ

Już około 30 lat temu KONOPKA i BENZER (1971) stwierdzili, że gen *per* (ang. periodicity) jest niezbędny do uwidocznienia się w warunkach stałej ciemności (DD) rytmu aktywności lokomotorycznej muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Aktywność tego genu niezbędna jest również w procesie rytmicznego wychodzenia tych owadów z poczwerek, tak zwanych linień imaginalnych. Autorzy ci otrzymali trzy grupy mutantów muszek, różniących się między sobą długością okresu spontanicznego rytmu aktywności i wspomnianych już linień imaginalnych. Jedną grupę stanowiły owady o krótkim (19 godz) okresie rytmu (*per^S*), drugą owady o długim (28 godz) rytmie (*per^L*), zaś trzecią grupą były owady, które w wyniku mutacji utraciły całkowicie rytm (*per⁰*). Przypomnijmy, że owady normalne w warunkach stałej ciemności wykazują rytmy, których okresy są zbliżone do 24 godz.

W dalszych badaniach oprócz genu *per* stwierdzono u muszki owocowej obecność jeszcze innego genu *tim* (timeless), którego mutacja prowadzi również do utraty badanych rytmów (SEHGAL i współaut. 1994, 1995). U tego gatunku zidentyfikowano także gen *dClock* (*d* - od *Drosophila*), którego produkt spełnia funkcję czynnika aktywującego transkrypcję genów *per* i *tim*. (CHOOGON i współaut. 1998). Na tym jeszcze nie koniec. Badania ostatnich kilku miesięcy dostarczyły danych o obecności jeszcze jednego genu *cyc* (ang. cycle), którego odpowiednikiem u ssaków jest gen *Bmal1* (ang. brain and muscle ARNT-like factor), i którego mutacja powoduje arytmiczność, obniżenie ekspresji genu *per* (GEKAKIS i współaut. 1998, RUTILA i współaut. 1998, DARLINGTON i współaut. 1998), zaś ekspresja genu *tim* zachodzi wtedy w rytmie 18 i 27 godzin (PRICE i współaut. 1998, KLOSS i



Current Opinion in Genetics & Development

Ryc. 1. „Chód” zegara biologicznego *Drosophila* odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Białka powstające w wyniku aktywacji genów zegara wędrują do jądra komórkowego hamując dalsze ich powstawanie poprzez blokowanie własnych genów (zaczernione linie dochodzące do CLOCK-BMAL1).

Zachodzenie kolejnych etapów w warunkach 12 godzin światła i 12 ciemności (fragment szary) zaznaczonych literami od A do F zajmuje 24 godzin. W warunkach stałej ciemności cały cykl zachodzi w ciągu około 24 godzin (rytmy okołodobowe) a zastosowanie w takich warunkach kilkuminutowych pulsów światła (duże strzałki) powoduje zmianę fazy rytmu (opóźnienie lub przyspieszenie). Małe elipsy różnych kształtów oznaczają zdegradowane białko. Dalsze objaśnienia w tekście. Według WILSBACHERA i TAKAHASHI (1998), zmodyfikowane.

współaut. 1998), stąd postulowanie obecności jeszcze jednego genu *dbt* (ang. double-time).

Na czym polega współdziałanie tych genów w kontroli badanych rytmów przedstawia Ryc. 1. Kolejność poszczególnych zdarzeń zaznaczona na schemacie literami: A–F zachodzi w komórce zegara w okresie 24 godzin w warunkach zmieniającego się światła i ciemności (np. LD 12:12) lub w okresie około 24 godzin w warunkach stałych (np. stałej ciemności DD). Białka powstałe w wyniku aktywacji genów *clock* i *bmal* tworzą heterodimery CLOCK-BMAL, które łączą się z promotorami genów *per* i *tim*, z sekwencją nukleotydową E (5'-CANNTG-3') w promotorach genów *per* i *tim*, aktywując transkrypcję i syntezę mRNA (WILSBACHER i TAKAHASHI 1998). Dalej mRNA jest transportowany do cytoplazmy i w wyniku translacji powstają białka PER i TIM. Maksymalne ich stężenie przypada na początek nocy w warunkach LD i jak stwierdzono, zależy ono od dwóch procesów degradujących te białka. Z jednej strony poziom białka TIM zależy od długości fotoperiodu, ponieważ podlega ono degradacji pod wpływem światła. Jest to niezmiernie istotny proces bowiem umożliwia organizmowi dostosowywanie się do zmiennych długości dnia w warunkach naturalnych (krótszy dzień — więcej TIM w komórce). Natomiast poziom białka PER może być regulowany na skutek fosforylowania go przez białko DBT, co częściowo obniża jego destabilizację. Z początkiem nocy PER i TIM tworzą stabilne heterodimery, co umożliwia ich transport do jądra komórkowego. Po wejściu do jądra komórkowego hamują transport heterodimerów CLOCK-BMAL, będących, jak już wiemy, czynnikami aktywującymi transkrypcję genów *per* i *tim* w wyniku czego jest hamowana produkcja białek PER i TIM. Przy braku produkcji obu tych białek oraz częściowej ich degradacji, zostaje zniesione hamowanie transkrypcji genów *per* i *tim* i cykl zaczyna się od nowa. Szczegóły dotyczące procesów hamowania aktywności tych genów nie są jeszcze znane, ale wydaje się pewne, że „chód” zegara biologicznego muszki owocowej odbywa się na zasadzie „samonapędzającego” się ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Gdzie jest zlokalizowany zegar u owadów? Jeszcze kilkanaście lat temu odpowiedź była prosta — w układzie nerwowym, a szczególnie w mózgu. Doświadczenia polegające na usuwaniu poszczególnych fragmentów tego narządu wskazywały, że zegar kontrolujący rytm aktywności lokomotorycznej znajduje się w płatach wzrokowych mózgu (PAGE 1985), jak to jest w przypadku karaczana (*Periplaneta americana*). U świerszcza domowego (*Acheta domestica*) główny mechanizm zegarowy kontrolujący ryt-

mikę aktywności lokomotorycznej znajduje się w komórkach neurosekrecyjnych międzymózgowia (CYMBOROWSKI i BRADY 1972, CYMBOROWSKI 1973). W tych komórkach odbywa się w sposób rytmiczny synteza RNA (CYMBOROWSKI i DUTKOWSKI 1969) oraz białek (CYMBOROWSKI i DUTKOWSKI 1970), w tym być może niektórych białek należących do grupy białek zegara. Jak wykazały bowiem badania z zastosowaniem tak zwanej parabiozy — łączenia owada rytmicznego z osobnikiem nierytmicznym, kontrola rytmu aktywności lokomotorycznej przez zegar odbywa się za pośrednictwem hemolimfy (CYMBOROWSKI i BRADY 1972). W pełni powiodła się też próba transplantacji zegara znajdującego się w mózgu z owada rytmicznego do nierytmicznego powodując powstanie u biorcy takiego rytmu, jakim charakteryzował się dawca (CYMBOROWSKI 1981).

Podobnie zegar zlokalizowany jest w mózgu również u muchy domowej (*Musca domestica*) i muchy mięsnej (*Calliphora vicina*) co stwierdzili HELFRICH i współaut. (1985) i CYMBOROWSKI i współaut. (1994). To samo dotyczy muszki owocowej (HELFRICH-FÖSTER 1996). Ostatnio ukazał się bardzo obszerny artykuł podsumowujący wyniki wieloletnich badań nad anatomiczną lokalizacją zegara biologicznego owadów (HELFRICH-FÖSTER i współaut. 1998). Liczne badania dowodziły, że w tych właśnie strukturach gdzie jest zlokalizowany zegar zachodzi głównie ekspresja genu *per*. Wynalezienie jednak w ostatnich latach techniki otrzymywania transgenicznych muszek posiadających reporterowy gen *lucyferazy* podłączony do promotora genu *per*, odpowiedź na temat lokalizacji zegara bardzo skomplikowało (BRANDES i współaut. 1996). Okazało się, że u muszki owocowej gen *per* jest włączany i wyłączony w różnych częściach ciała (nawet w komórkach skrzydeł), a także w różnych okresach w ciągu doby (GREEN 1998). U larw mola woskowego (*Galleria mellonella*) zegar biologiczny regulujący dobowy rytm uwalniania do hemolimfy ekdysteroidów jest zlokalizowany w gruczołach protorakalnych (CYMBOROWSKI i współaut. 1989, 1991). Coraz więcej danych wskazuje, że w organizmie owada występują liczne zegary funkcjonujące niezależnie od układu nerwowego (HEGE i współaut. 1997). Znalazło to też wyraz w świetnym artykule przeglądowym GIEBULTOWICZ (1999). Szczęśliwie, wszystkie wyniki wskazują, że ekspresja genu *per* zachodzi z największą intensywnością w tych częściach mózgu, które od dawna są uznawane za główne ośrodki zegara. Jednakże, czy takie „nadrzędne” zegary są potrzebne w organizmie, w sytuacji gdy praktycznie każda komórka posiada swój własny zegar i do tego

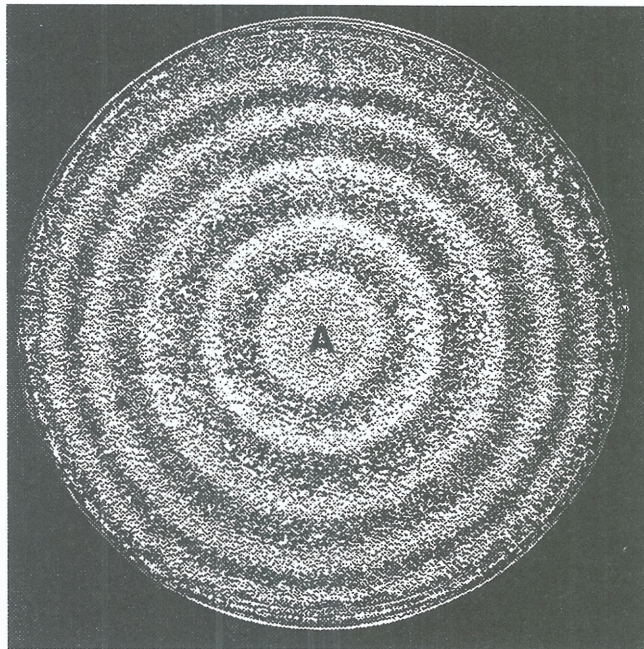
specjalne barwniki (kryptochromy) wrażliwe na niebieskie światło (pozawzrokowa fotorecepcja)? Może wystarczy światło słoneczne, jako

główny zegar, czy dawca czasu dla organizmu? Jak jest naprawdę, pokażą przyszłe badania.

ZEGAR PLEŚNI *NEUROSPORA CRASSA*

U powszechnie występującej pleśni *Neurospora crassa* należącej do grzybów workowców, która w rytmie 24-godzinny wytwarza zarodniki wegetatywne (konidia) (Ryc. 2), wykryto gen *frq* (ang. frequency) kontrolujący ten rytm

(ARONSON i współaut. 1994). Natomiast wspomniane geny *wc-1* i *wc-2* kodujące białka zawierające tak zwane palce cynkowe — elementy strukturalne uczestniczące w oddziaływaniu z DNA — wydają się być zaangażowane w regulację



Ryc. 2. U pleśni *Neurospora crassa* hodowanej na szalce w warunkach światła i ciemności, wytwarzanie konidiosporów (jasne kręgi) odbywa się dokładnie co 24 godziny. W warunkach stałej ciemności rytm ten ciągle istnieje na skutek rytmicznej ekspresji genu *frq* i jest rytmem okołodobowym. A – punkt startowy wzrostu grzybnii.

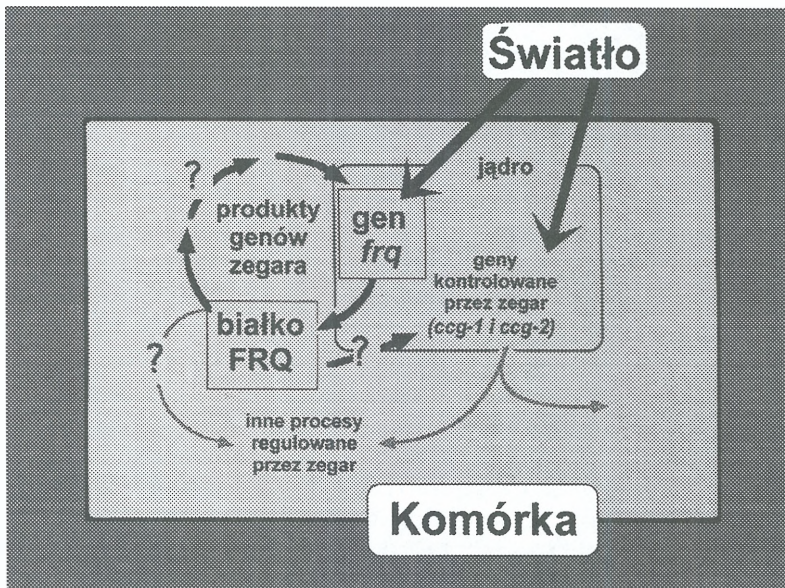
(LOROS 1995, DUNLAP 1996, BELL-PEDERSEN i współaut. 1996). Oprócz niego stwierdzono obecność dwu innych genów: *wc-1* i *wc-2* (white collar-1 i 2), które są także odpowiedzialne za rytm produkcji konidiów, ale również kontrolują poziom ekspresji genu *frq* (CROSTHWAITE i współaut. 1997). Tak, jak w przypadku muszki owocowej, także i u tego organizmu wykryto mutanty o krótkim i długim rytmie tworzenia konidiów, jak również mutanty nierytmiczne. Podobnie, jak białko PER u muszki, tak u tego organizmu białko FRQ wchodzi do jądra komórkowego i hamuje transkrypcję genu *frq* na zasadzie sprzężenia zwrotnego (Ryc. 3). Różnica polega na tym, że jak dotychczas nie wykryto innego białka tworzącego z FRQ heterodimerów przed jego translokacją do jądra. Jednakże i w tym przypadku cały cykl obserwowanych zjawisk zamyka się w granicach około 24 godzin

funkcji zegara. Szczególnie gen *wc-1* jest niezbędny do ekspresji genu *frq* wywoływanej przez światło (CROSTHWAITE i współaut. 1995). Jednakże nie stwierdzono dotychczas, by produkty tych genów łączyły się z promotorem genu *frq*, czy też pełniły funkcję czynników aktywacyjnych transkrypcji. Sekwencja aminokwasowa białka FRQ wydaje się wskazywać na możliwości pełnienia takich funkcji, ale brak ciągle na to jednoznacznych dowodów (LEWIS i współaut. 1997). Ostatnio badacze skłaniają się jednak do modelu, w którym białka WC-1 i WC-2 i prawdopodobnie białko CLOCK pełnią rolę czynników aktywacyjnych transkrypcji genu *frq*, zaś białko FRQ po spełnieniu funkcji zegara kontrolującego rytmiczną produkcję konidiów wchodzi do jądra i na zasadzie sprzężenia zwrotnego wyłącza własny gen.

ZEGAR SSAKÓW

Już od przeszło ćwierćwiecza jest wiadomo, że zegar biologiczny ssaków jest zlokalizowany

w jądrze nadskrzyżowaniowym (*nucleus supra-chiasmaticus*, SCN) podwzórza (WEAVER 1998).



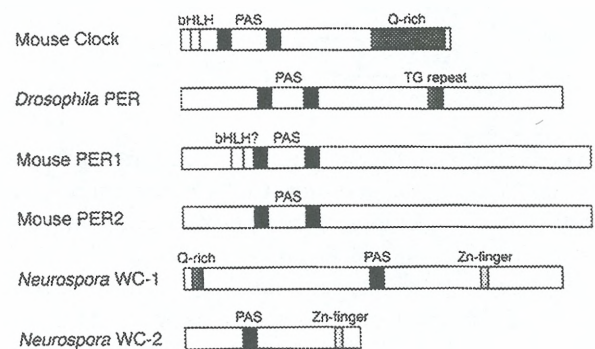
Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie mechanizmu zegarowego pleśni *Neurospora crassa* z udziałem genu *frq*.

Aktywacja tego genu odbywa się przy udziale światła w warunkach LD, lub zachodzi spontanicznie w warunkach stałej ciemności po spadku stężenia białka FRQ, które na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego hamuje ekspresję genu *frq*. Dalsze szczegóły w tekście. *ccg-1* i *ccg-2* — geny kontrolowane przez zegar (clock controlled genes). Według LOROSA (1995), zmodyfikowane.

Usunięcie tego jądra prowadzi do zaburzeń obserwowanego rytmu (np. zwierzę staje się nierytmiczne pod względem aktywności lokomotorycznej), zaś jego implantacja rytm taki przywraca (TUREK 1994). Dalej okazało się, że geny zegara homologiczne do zidentyfikowanych u *Drosophila* podlegają ekspresji również w SCN ssaków (ALBRECHT 1997). Po identyfikacji homologów *per* u myszy i człowieka (SUN i współaut. 1997, TEI i współaut. 1997, BAE i współaut. 1998) oraz po sklonowaniu genu *Clock* myszy (ANTOCH i współaut. 1997), wydaje się pewne, że mechanizm regulacji ich ekspresji jest podobny do opisanego powyżej dla muszki owocowej, tym bardziej, że w styczniu tego roku doniesiono o zidentyfikowaniu genu *tim* u myszy i człowieka (SANGORAM i współaut. 1999). Zarówno u myszy, jak i u człowieka wykryto trzy geny: *Per1*, *Per2*, *Per3*. Kodowane przez nie białka zawierają charakterystyczną domenę PAS (PER, ARNT, SINGLEMINDED), podobnie jak to jest u *Drosophila* i *Neurospora* (Ryc. 4). Ekspresja wszystkich trzech genów zachodzi w sposób rytmiczny w SCN myszy i to zarówno w LD 12 : 12, jak i w stałej ciemności, przesunięte są tylko względem siebie ich fazy maksymalnej aktywności. Funkcje czynników aktywacyjnych transkrypcji tych genów pełnią dimery CLOCK-BMAL, które łączą się z sekwencją nukleotydową E, podobnie jak to obserwowaliśmy u *Drosophila* (Ryc. 5). Podobnie też jak u muszki, również u ssaków wykryto kryptochromy (pierwotnie wykryte u roślin (SOMERS i współaut. 1998) wrażliwe na światło niebieskie i zidentyfikowano dwa geny (*Cry1* i *Cry2*) wyrażane zarówno w siatkówce oka, jak i w SCN (RANDY i współaut. 1998), co stawia je w rzędzie dobrych czynników pełniących funkcje synchronizacji chodu zegara biologicznego zgodnego z aktual-

nie panującymi warunkami środowiska (THRESHER i współaut. 1998).

Zadziwiający jest też stopień homologii sekwencji aminokwasowej białek zegara (Ryc. 6). Na uwagę zasługuje fakt, że między białkiem PER człowieka i myszy istnieje różnica długości tylko jednego aminokwasu, a identyczność sekwencji aminokwasowej wynosi aż 92%. Zarówno u ssaków, jak i muszki owocowej występują konserwowane rejony, a między nimi ten najważniejszy, wspomniany już PAS umożliwiający łączenie się białek w dimery (KAY 1997). Oprócz genu *per* jeszcze dwa inne: *jerk* i *cyc* są bardzo podobne ze stwierdzanymi u ssaków (REPPERT



Ryc. 4. Porównanie struktury białek zegara różnych organizmów. Uwagę zwraca fakt zawierania przez nie podobnych sekwencji zarówno u myszy (mouse), owadów (*Drosophila*) i grzybów (*Neurospora*), szczególnie dotyczy to sekwencji PAS, które umożliwiają łączenie się białek w dimery, co z kolei warunkuje ich wchodzenie do jądra komórki i hamowanie transkrypcji własnych genów.

Q-rich — obszar bogaty w glutaminę; TG repeat — obszar z powtórzeniami Treonina-Glicyna; Zn-finger — palec cynkowy; bHLH — domena: zasadowy heliks-pętla-heliks. Więcej szczegółów w tekście. Według GREENA (1998), zmodyfikowane.

1998), wydaje się więc, że podstawowe elementy wchodzące w skład zegara biologicznego podle-

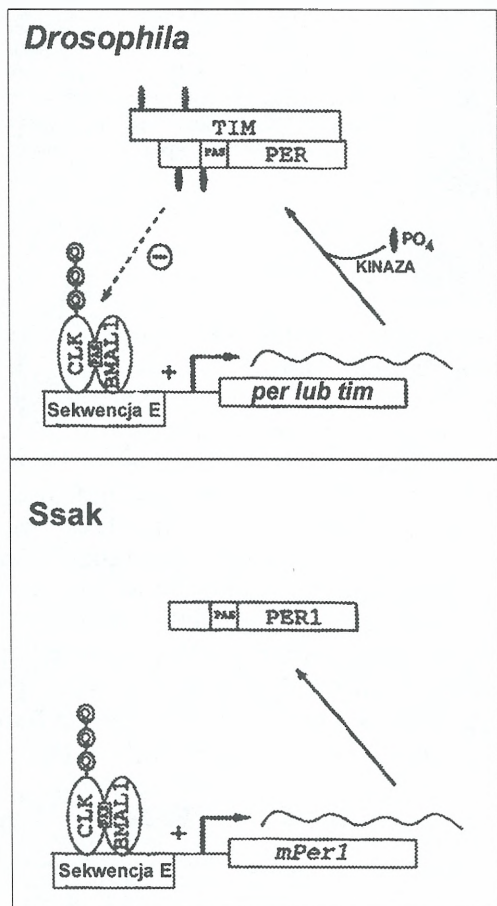
gały konserwacji podczas trwającej setki milionów lat ewolucji zwierząt.

JAK ŚWIATŁO PRZESUWA WSKAZÓWKI ZEGARA?

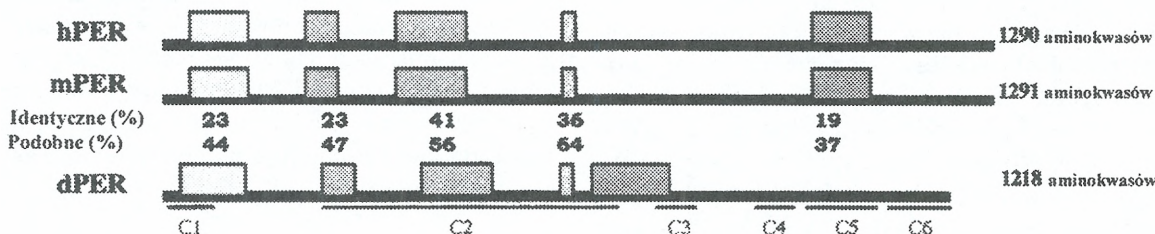
Stosunkowo mało wiadomo o sposobie oddziaływania światła na funkcję zegara biologicznego. U zwierząt sygnały świetlne nie wydają

się docierać do zegara poprzez normalne barwniki takie, jak opsyna. Na przykład mysz, która ma zdegenerowaną siatkówkę i nie reaguje na bodźce świetlne, jest ciągle wrażliwa na światło przesuwające fazy rytmu jej aktywności lokomotorycznej (PROVENCIO i FOSTER 1995). Wprost nieprawdopodobnym wydaje się doniesienie o możliwości przesuwania faz rytmów człowieka przez naświetlanie skóry w części podkolanowej (OREN i TERNAN 1998), co może mieć praktyczne znaczenie w stosowanej już od dawna fototerapii (TOUITOU i HAUS 1992). Podobnie u owadów, bodźce świetlne synchronizujące rytmy aktywności lokomotorycznej docierają do zegara drogą pozawzrokową, nawet bez udziału występujących u nich przyoczek (CYMBOROWSKI i współaut. 1994, CYMBOROWSKI 1995). W przypadku muchy (*Calliphora vicina*) udało się takie fotoreceptory zidentyfikować w różnych częściach mózgu (CYMBOROWSKI i KORF 1995). W dalszych badaniach wykazano, że wrażliwość tego owada na bodźce świetlne podlega modulacji z udziałem serotoniny (CYMBOROWSKI 1998).

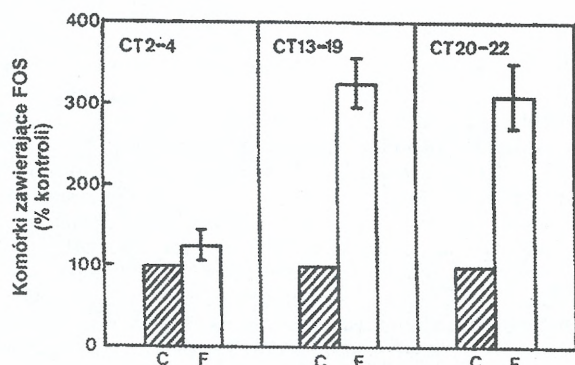
Ciągle jednak pozostaje pytanie w jaki sposób sygnały świetlne docierają do zegara przesuwając jego wskazówki. Wiele grup badaczy zegara ssaków przedstawiło dowody na udział genów kodujących czynniki transkrypcyjne (proto-onkogeny), w tym genu *c-fos*, w transmisji sygnałów świetlnych do SCN, gdzie zlokalizowany jest zegar (TAKAHASHI 1991). Wydaje się, że w podobny sposób światło dociera do zegara owadów. Przynajmniej tak jest w przypadku wspomnianej już muchy *Calliphora*. W badaniach immuno-histochemicznych stwierdzono, że ekspresja genu *c-fos* w mózgu tego owada zachodzi tylko w takich okresach doby, w których bodziec świetlny stosowany w warunkach stałej ciemności powoduje opóźnienie lub przyspieszenie fazy rytmu aktywności lokomotory-



Ryc. 5. Porównanie mechanizmu zegara muszki i ssaka. W obu przypadkach funkcję czynnika aktywującego transkrypcję genu *per* odgrywają dimery białek CLOCK — BMAL1 łączące się z ramką E. U ssaków brak tylko jeszcze ostatecznych dowodów na istnienie genu *tim*, chociaż są już pierwsze doniesienia na ten temat. Według REPPERTA (1998), zmodyfikowane.



Ryc. 6 Porównanie sekwencji aminokwasowej zidentyfikowanych białek zegara. Prostokątami zaznaczono silnie homologiczne sekwencje białek człowieka (h), myszy (m) i muszki owocowej (d). Dalsze objaśnienia w tekście. Według TEI i współaut. (1997), zmodyfikowane.



Ryc. 7. Komórki neurosekrecyjne *pars intercerebralis* mózgu *Calliphora vicina* zawierające białko FOS:

(F) po zastosowaniu w różnych okresach doby w warunkach stałej ciemności (CT – circadian time) godzinowego pulsu światła. Wyniki przedstawiono w procentach owadów kontrolnych (słupki zakreskowane), których mózgi pobierano do badań immunohistochemicznych o tych samych porach doby lecz bez stosowania pulsu światła. Uwagę zwraca fakt ekspresji genu *c-fos* tylko w okresach kiedy puls światła powodował opóźnienie (CT13–19) fazy rytmu lub jego przyspieszenie (CT20–22). Reakcji na bodziec świetlny nie obserwowano w okresie kiedy nie występowało przesunięcie fazy rytmu (CT2–4). Dane przedstawiają wartości średnie z 3–4 mózgów SD. Według CYMBOROWSKIEGO i KINGA (1996), zmodyfikowane.

cznej (CYMBOROWSKI i KING 1996). W okresach kiedy nie stwierdzano takiego przesunięcia rytmu, ekspresja *c-fos* w komórkach neurosekrecyjnych *pars intercerebralis* mózgu nie zachodziła (Ryc. 7). Należy zaznaczyć, że właśnie w tej części mózgu jest lokalizowany zegar badanych owadów. Wydaje się więc, że badania nad mo-

lekularnym uwarunkowaniem funkcji zegara biologicznego mogą mieć uniwersalny charakter.

Bardzo dziękuję Prof. Dr hab. Piotrowi Węgleńskiemu i Dr hab. Janowi Fronkowi za uważne i krytyczne przeczytanie maszynopisu.

PODSUMOWANIE

W ostatnich kilku latach zrobiono ogromny postęp w badaniach nad molekularnymi podstawami zegara biologicznego. Zidentyfikowano wiele nowych genów zegara, z których większość udało się sklonować i scharakteryzować. Szczególnie wyraźny postęp w tym zakresie zaznaczył się w badaniach zegara biologicznego owadów i pleśni *Neurospora crassa*. Poznaliśmy już w miarę dobrze molekularne podstawy takich zjawisk jak synchronizacja rytmów do zmieniających się warunków środowiska (w tym przesuwanie faz określonych rytmów), czy kompensacja temperaturowa. Wiele danych eksperymentalnych uzyskano na temat pozawzrokowej fotorecepcji i udziału w tym procesie specjalnych barwników (kryptochromów) bezkręgowców i kręgowców (w tym również człowieka) oraz szlaków transdukcji bodźca świetlnego do

zegara biologicznego. Dużą rolę w tym procesie wydają się odgrywać geny kodujące czynniki transkrypcyjne, w tym szczególnie *c-fos*. Wszystkie te badania wskazują na zadziwiającą wprost uniwersalność procesów molekularnych leżących u podstaw funkcjonowania zegara biologicznego badanych dotychczas organizmów.

Przyszłe badania niewątpliwie będą dotyczyły roli poszczególnych genów zegara w kontroli procesów rytmicznych, oraz współdziałania między nimi w komórce podczas utrzymywaniu tych procesów. Dalszych badań wymagają coraz częściej stwierdzone, fakty istnienia procesów rytmicznych całkowicie niezależnych od układu nerwowego. Powinny one doprowadzić do lepszego zrozumienia synchronizacji procesów fizjologicznych organizmu z uwzględnieniem czynnika czasu.

THE GENES OF BIOLOGICAL CLOCKS

Summary

Circadian rhythms are common in living organisms, synchronising life functions at behavioural, physiological as well as molecular levels. The rhythms generating mechanisms, known as circadian clocks, are not fully understood in any organism. However, during the last few years tremendous progress towards molecular dissection of circadian clocks has been made. Identification of new clock genes and elucidation of regulatory mechanisms in diverse model organisms (insects, fungi and mammals, including humans) have underscored the universal nature of the circadian clock, yet also suggested phylogenetic differences in its function. The structure and function of the molecular gears that control these clocks through the regulation of gene expression, are now being unravelled. Molecular and genetic characterisation of circadian rhythmicity in the fruit

fly indicate that functioning of the clock requires the activity of proteins encoded by many genes, among them *per* and *tim* which are expressed with circadian rhythm. Heterodimerisation of proteins PER and TIM allows their entering the nucleus and suppression of further RNA synthesis by the PER/TIM complex. The recent discovery of PER and TIM homologues in mice and humans suggests that a similar mechanism controls mammalian circadian rhythmicity. Future studies will undoubtedly focus on each gene's functional role and interactions with other clock genes within the organism. This approach may increase our understanding of how circadian clocks are organised to orchestrate temporal integration of life processes in various organisms.

LITERATURA

- ALBRECHT U., SUN Z.S., EICHELE G., LEE C.C., 1997. A different response of two putative mammalian circadian regulators, *mpr1* and *mper2* to light. *Cell* 91, 1055–1064.
- ANTOCH M. P., SONG E.-J., CHANG A.-M., VITATERNA M. H., ZHAO Y., WILSBACHER L. D., SANGORAM A. M., KING D. P., PINTO L. H., TAKAHASHI J. S., 1997. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655–667.
- ARONSON B., JOHANSON K., LOROS J. J., DUNLAP J. C., 1994. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation in the clock gene frequency. *Science* 263, 1578–1584.
- BAE K., LEE C., SIDOTE D., CHUANG K.-Y., EDERY I., 1998. Circadian regulation of *Drosophila* homolog of the mammalian Clock gene: *PER* and *TIM* function as positive regulators. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6142–6151.
- BELL-PEDERSEN D., GARCEAU N., LOROS J. J., 1996. Circadian rhythms in fungi. *J. Genet.* 75, 387–401.
- BRANDES C., PLAUTZ J. D., STANEWSKY R., JAMISON C. F., STRAUME M., WOOD K. V., KAY S. A., HALL J. C., 1996. Novel features of *Drosophila* period transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 16, 687–692.
- CHOOGON L., BAE K., EDERY I., 1998. The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interactions with the *PER*-*TIM* complex. *Neuron* 21, 857–867.
- CROSTHWAITE S. K., LOROS J. J., DUNLAP J. C., 1995. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell* 81, 1003–1012.
- CROSTHWAITE S. K., DUNLAP J. C., LOROS J. J., 1997. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 276, 763–769.
- CYMBOROWSKI B., 1973. Control of the circadian rhythm of locomotor activity of the house cricket. *J. Insect Physiol.* 19, 1423–1440.
- CYMBOROWSKI B., 1981. Transplantation of circadian pacemaker in the house cricket (*Acheta domesticus*) J. interdiscipl. Cycle Res. 12, 133–140.
- CYMBOROWSKI B., 1984. *Zegary biologiczne*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- CYMBOROWSKI B. (Red. zeszytu), 1991. *Rytmu biologiczne*. Kosmos 40, 3–117.
- CYMBOROWSKI B., 1992. *Insect endocrinology*, Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
- CYMBOROWSKI B., 1995. Extraocular photoreception and circadian locomotor activity rhythms in the blow fly *Calliphora vicina*. [W:] *Insects Chemical, Physiological and Environmental Aspects*. KONOPKA D. (red.) Wrocław University Press, str. 61–69.
- CYMBOROWSKI B., 1998. Serotonin modulates a photic response in circadian locomotor rhythmicity of adults of the blow fly, *Calliphora vicina*. *Physiol. Entomol.* 23, 25–32.
- CYMBOROWSKI B., DUTKOWSKI A., 1969. Circadian changes in RNA synthesis in the neurosecretory cells of the brain and suboesophageal ganglion of the house cricket. *J. Insect Physiol.* 15, 1187–1197.
- CYMBOROWSKI B., DUTKOWSKI A., 1970. Circadian changes in protein synthesis in the neurosecretory cells of the central nervous system of *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* 16, 341–348.
- CYMBOROWSKI B., BRADY J. B., 1972. Insect circadian rhythms transmitted by parabiosis a re-examination. *Nature* 236, 221–222.
- CYMBOROWSKI B., KORF H.-W. 1995. Immunocytological demonstration of *S-antigen* (arrestin) in the brain of the blow fly *Calliphora vicina*. *Cell Tissue Res.* 279, 109–114.
- CYMBOROWSKI B., KING V., 1996. Circadian regulation of *Fos*-like expression in the brain of the blow fly *Calliphora vicina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 11C, 239–246.
- CYMBOROWSKI B., ŚMIETANKO A., DELBECQUE J. P., 1989. Circadian modulation of ecdysteroid titer in *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A, 431–438.
- CYMBOROWSKI B., MUSZYŃSKA-PYTEL M., PORCHERON P., CASSIER P., 1991. Hemolymph ecdysteroid titres controlled by circadian clock mechanism in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 37, 35–40.
- CYMBOROWSKI B., LEWIS R. D., HONG S.-F., SAUNDERS D. S., 1994. Circadian locomotor activity rhythms and their entrainment to light-dark cycles cocontinue in flies (*Calliphora vicina*) surgically deprived of their optic lobes. *J. Insect Physiol.* 40, 501–510.
- DARLINGTON T. K., WAGNER-SMITH K., CERIANI M. F., STAKNIS D., GEKAKIS N., STEEVES T. D. L., WIETZ C. J., TAKAHASHI J. S., KAY S. A., 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280, 1599–1603.
- DUNLAP J. C. 1996. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 30, 579–601.
- DUNLAP J. C., 1998. Circadian rhythms. An end in the beginning. *Science*, 280, 1548–1549.
- GEKAKIS N., STAKNIS D., NGUYEN H. B., DAVIS F. C., WILSBACHER L. D., KING D. P., TAKAHASHI J., WEITZ C. J., 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 28, 1564–1569.
- GIEBULTOWICZ J. M. 1999. Insect circadian clocks: is it all in their heads? *J. Insect Physiol.* (w druku).
- GREEN C. B., 1998. How cells tell time. *Trends Cell Biol.* 8, 224–230.
- HASTINGS J. W., RUSAK B., BOULOS Z., 1991. *Circadian rhythms: the physiology of biological timings*. Neural and Integrative Animal Physiology. PROSER C. L. (red.) New York: Wiley-Liss, str. 435–546.
- HEGE D. M., STANEWSKY R., HALL J. C., GIEBULTOWICZ J. M. 1997. Rhythmic expression of *PER*-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: Evidence for a brain-independent circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 12, 300–308.
- HELFRICH C., CYMBOROWSKI B., ENGELMANN W., 1985. Circadian activity rhythm of the house fly continues after optic tract severance and lobectomy. *Chronobiol. Intern.* 2, 19–32.
- HELFRICH-FÖSTER C., 1996. *Drosophila* rhythms: from brain to behavior. *Cell Dev. Biol.* 7, 791–802.
- HELFRICH-FÖSTER C., STENGL M., HOMBERG U., 1998. Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol. Intern.* 15, 567–594.
- KAY S. A., 1997. *PAS, present and future: Clues to the origins of circadian clocks*. *Science* 276, 753–754.
- KLOSS B., PRICE J. L., SAEZ L., BLAU J., ROTHENFLUH A., WESLEY C. S., YOUNG M. W., 1998. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I. *Cell* 94, 97–107.
- KONODO T., TSINOREMAS N. F., GOLDEN S. S., JOHNSON C. H., KUTSUNA S., ISHIURA M., 1994. Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266, 1233–1236.
- KONOPKA R. J. i BENZER., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68, 2112–2116.
- LEWIS M. T., MORGAN L. W., FELDMAN J. F., 1997. Analysis of frequency (*frq*) clock gene homologs: evidence for a helix-turn-helix transcription factor. *Mol. Gen. Genet.* 253, 401–414.

- LOROS J., 1995. *The molecular basis of the Neurospora clock*. *Neurosci.* 7, 3–13.
- OREN D. A., TERMAN M., 1998. *Tweaking the human circadian clock with light*. *Science* 279, 333–334.
- PAGE T. L., 1985. *Clocks and circadian rhythms*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. KERKUT G. A., GILBERT L. I. (red.) Pergamon Press 6, 577–652.
- PRICE J. L., BLAU J., ROTHENFLUH A., ABODELY M., KLOSS B., YOUNG M. W., 1998. *double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation*. *Cell* 94, 83–95.
- PROVENCIO I., FOSTER R. G., 1995. *Circadian rhythms in mice can be regulated by photoreceptors with cone-like characteristics*. *Brain Res.* 694, 183–190.
- RANDY J., VITATERNA M. H., MIYAMOTO Y., KAZNATSEV A., HSU D. S., PETTIT C., SELBY C. P., DAWUT L., SMITHIES O., TAKAHASHI J. S., SANCAR A., 1998. *Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoreponses*. *Science* 282, 1490–1494.
- REPPERT S. M., 1998. *A clockwork explosion!* *Neuron* 21, 1–4.
- RUTILA J. E., SURI V., LE M., SO W. V., ROSBASH M., 1998. *CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless*. *Cell* 93, 805–814.
- SANGORAM A. M., SAEZ L., ANTOCH M. P., GEKAKIS N., STAKNIS D., WHITELEY A., TAKAHASHI J. S., 1999. *Mammalian circadian autoregulatory loop: A timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. *Neuron* 21, 1101–1113.
- SASSONE-CORSI P., 1998. *Molecular clocks: mastering time by gene regulation*. *Nature* 392, 871–874.
- SEHGAL A., PRICE J. L., MAN B., YOUNG M. W., 1994. *Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in Drosophila mutant timeless*. *Science* 263, 1603–1606.
- SEHGAL A., ROTHENFTUH-HILFIKER A., HUNTER-ENSOR M., CHEN Y., MYERS M. P., YOUNG M. W., 1995. *Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation*. *Science* 270, 808–810.
- SCHIBLER U., 1998. *Circadian rhythms. New cogwheels in the clockworks*. *Nature* 393, 620–621.
- SOMERS D. E., DEVLIN P. F., KAY S. A., 1998. *Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock*. *Science* 282, 1488–1490.
- SUN Z. S., ALBRECHT U., ZHUCHENKO O., BAILEY J., EICHELE G., LEE C. C., 1997. *RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene*. *Cell* 90, 1003–1011.
- TAKAHASHI J. S., 1991. *Circadian rhythms: from gene expression to behavior*. *Current Opin. Neurobiol.* 1, 556–561.
- TEI H., OKAMURA H., SHIGEYOSHI Y., FUKUHARA C., OZAWA R., HIROSE M., SAKAKI Y., 1997. *Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene*. *Nature* 389, 512–516.
- THRESHER R. J., VITATERNA M. H., MIYAMOTO Y., KAZANTSEW A., HSU D. S., PETTIT C., SELBY C. P., DAWUT L., SMITHIES O., TAKAHASHI J. S., SANCAR A., 1998. *Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoreponses*. *Science* 282, 1490–1494.
- TUREK F. W., 1994. *Circadian rhythms. Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press 49, 43–90.
- TOUITOU Y., HAUS E. (red.), 1992. *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- WEAVER D. R., 1998. *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. *J. Biol. Rhythms* 13, 100–112.
- WILSBACHER L. D., TAKAHASHI J. S., 1998. *Circadian rhythms: molecular basis of the clock*. *Current Opin. Gen. Dev.* 8, 595–602.
- YOUNG M. W., 1998. *The molecular control of circadian behavioural rhythms and their entrainment in Drosophila*. *Ann. Rev. Biochem.*, 67, 135–152.
- ZYLKA M. J., SHEARMAN L. P., WEAVER D. R., REPPERT S. M., 1998. *Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside the brain*. *Neuron* 20, 1103–1110.