

BRONISŁAW CYMBOROWSKI

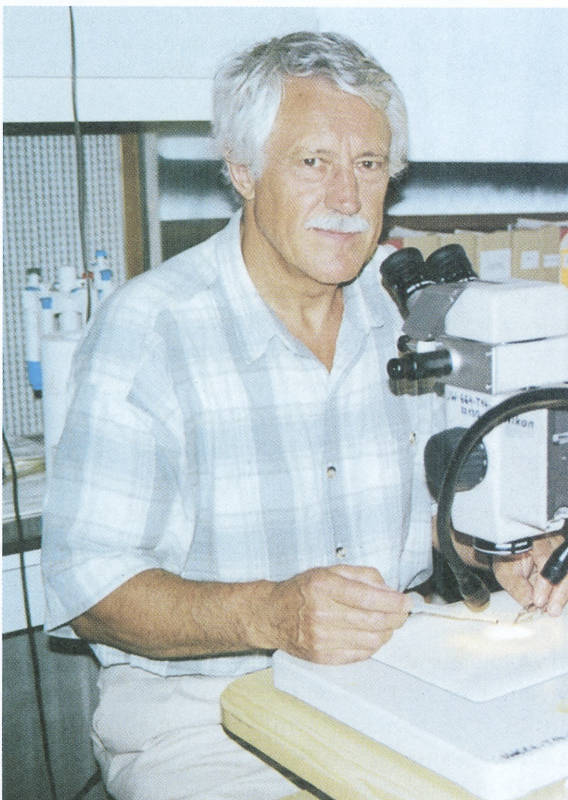
Zakład Fizjologii Bezkręgowców
Uniwersytet Warszawski
Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa
e-mail: bron@asp.biogeo.uw.edu.pl

*Wszystko ma swój czas i
każda sprawa pod niebem ma swoją porę.
Jest czas rodzenia i czas umierania;
jest czas sadzenia i czas wrywania tego,
co zasadzono.
To, co jest, było już dawno, a to,
co będzie, też już jest od dawna.
Księga Salomona 2,3-3,15*

ZEGAR BIOLOGICZNY KOŃCA MILENIUM: OD ZEGARA KWIATOWEGO DO ZEGARA MOLEKULARNEGO

Rośliny i zwierzęta przystosowały się do środowiska na drodze ewolucji zajmując nie tylko określone nisze ekologiczne, ale dzieląc je rów-

nież pomiędzy siebie, uwzględniając czynnik czasu. Jednakże, aby element czasowy mógł istotnie pełnić adaptacyjną rolę w życiu organi-



Urodziłem się w 1939 r. we wsi Nowowola. Studia biologiczne odbyłem na Uniwersytecie Warszawskim

specjalizując się w zakresie fizjologii porównawczej zwierząt pod kierunkiem Prof. Mariana Rybickiego. Od ukończenia studiów w 1964 r. do chwili obecnej pracuję na Uniwersytecie Warszawskim, gdzie w 1969 r. uzyskałem stopień doktora nauk przyrodniczych, której promotorem był Prof. Zygmunt Kraczkiewicz. W roku akademickim 1970/71 przebywałem na stypendium British Council pracując w Imperial College, University of London.

W 1973 r. uzyskałem stopień doktora habilitowanego na Uniwersytecie Warszawskim i w rok później zostałem docentem tej uczelni. Przez rok (1977/78) pracowałem w Uniwersytecie Harvarda w USA pod kierunkiem C. M. Williamsa nad hormonalną regulacją rozwoju i metamorfozy owadów.

Przez 5 lat prowadziłem badania we współpracy z United States Departments of Agriculture (USDA) na temat „Circadian rhythms and the endocrine system of some stored-product insects”, za które otrzymałem w 1980 r. od Ministerstwa Rolnictwa USA „Certificate of Appreciation”.

Przez cały okres mojej pracy na Uniwersytecie Warszawskim prowadziłem badania publikując 120 prace naukowe w międzynarodowych i krajowych czasopismach. Opublikowałem 2 książki oraz kilkadziesiąt artykułów popularno-naukowych, a także kilka rozdziałów do książek polskich i zagranicznych.

zmów, musiały one w toku ewolucji wytworzyć najróżniejsze mechanizmy zdolne do jego pomiaru w cyklu dobowym, księżycowym czy rocznym. Oczywiście bardzo niewiele wiemy na

na Ziemi dołączały coraz to inne rytmicznie zmieniające się czynniki środowiska, do których musiały się dopasowywać wszystkie organizmy. To te rytmiczne zmiany zachodzące w

Linea Blumen-Uhr



Ryc. 1. Ilustracja przedstawiająca zegar kwiatowy Linneusza.

Lewa strona (od 6-tej rano do 12 w południe) przedstawia gatunki roślin, które zakwitają. Prawa strona (od 12-tej do 6-tej wieczorem) przedstawia godziny, w których kwiaty zamykają się (z wyjątkiem pierwiosnka, który zaczyna rozchyłać swoje płatki kwiatowe o 5 po południu). Uwagę zwraca fakt, że niektóre gatunki roślin zakwitają dwukrotnie w ciągu dnia, rano i wieczorem (Wg. MOORE-EDEA i współaut. 1982).

temat pierwszych etapów rozwoju życia na Ziemi, kiedy powstawało w Prekambrze około 4 miliardy lat temu. Niewątpliwie rodziło się ono w warunkach dramatycznych zmian dobowych: bardzo niskie temperatury w nocy i bardzo wysokie w dzień. Dodatkowo brak warstwy ozonowej był przyczyną dobowych zmian promieniowania ultrafioletowego. Promieniowanie to było potężnym źródłem energii dla rozwijającego się życia, ale jednocześnie mogło to życie zniszczyć w zarodku, gdyby organizmy nie „wynały” skutecznej przed nim ochrony, przesuwając swoje wrażliwe na UV procesy życiowe na okres nocny. I tak prawdopodobnie powstawały pierwsze rytmy dobowe. W miarę rozwoju życia

przyrodzie nieożywionej zmusiły, i zmuszają nadal, wszystkie istoty do prowadzenia ściśle określonego trybu życia, a tym samym do precyzyjnego odczytywania pory doby.

Zjawisko pomiaru czasu przez organizmy zostało wykryte już w początkach XVIII w., kiedy to Karol Linneusz zaobserwował dobowe ruchy płatków kwiatowych i ułożył z różnych gatunków roślin zegar kwiatowy w swoim ogrodzie w Uppsali (Ryc. 1), zaś francuski astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan opublikował w 1729 r. swoje obserwacje na temat dobowych ruchów liści mimozy, których rytm, o dziwo, nie zanikał również w stałej ciemności, z tym że jego okres stawał się wtedy dłuższy lub krótszy od

Opracowałem też 2 monografie naukowe, z których „Zegary biologiczne” doczekały się już trzech wydań w PWN. Natomiast monografia „Endokrynologia owadów” wydana przez PWN w 1984 r., w 1992 r. została wydana przez Elsevier pt. „Insect Endocrinology”. Od 1978 r. jestem kierownikiem Zakładu Fizjologii Bezkręgowców UW. W 1983 r. otrzymałem tytuł profesora nadzwyczajnego, a 1991 r. profesora zwyczajnego. Pełniłem też funkcje prodziekana a następnie w latach: 1984–1987 byłem dziekanem Wydziału Biologii UW. Pod moim kierunkiem wykonano dotychczas 35 prac magisterskich, 12 doktorskich (4 inne są w toku) oraz 2 osoby z mojego Zakładu uzyskały stopnie doktora habilitowanego.

24 godzin, stąd później nazwano te rytmy okołodobowymi lub cirkadialnymi (łac. *circa* — około, *dies* — dzień). Był, to wtedy pierwszy dowód na istnienie endogennego mechanizmu zdolnego do pomiaru czasu — zegara biologicznego.

Tak więc, wszystko zaczęło się od roślin i zegara kwiatowego, jednak poznanie jego mechanizmu molekularnego zajęło badaczom około 300 lat (SOMERS 1999, NELSON i współ. 2000). Z biegiem lat podobnych dowodów pojawiało się coraz więcej, gdy zaczęto prowadzić intensywne badania na różnych organizmach, z człowiekiem włącznie. Wyniki świadczące o endogenym charakterze rytmów biologicznych nie przekonały jednakże, przynajmniej jednego ze znanych mi badaczy rytmów, a mianowicie F.A. Browna, który uważa, że wszystkie cykliczne zmiany zachodzące w organizmie są odbiciem rytmicznie zmieniających się warunków geofizycznych, włączając w nie także czynniki pozaziemskie, jak promieniowanie kosmiczne czy oddziaływanie określonych układów gwiazd (BROWN 1960, 1980).

Kiedy w początkach lat 60. ubiegłego wieku rozpoczynałem badania nad rytmami biologicznymi owadów, było już po pierwszym międzynarodowym sympozjum, które odbyło w 1960 r. w Cold Spring Harbor w Stanach Zjednoczonych. Do dzisiaj nie wiem jak to się stało, że tom XXV zawierający materiały zjazdowe tego sympozjum, a zatytułowany „Biological Clocks” znalazł się w bibliotece naszego Instytutu Zoologicznego UW, i był przez długie lata moja „biblia”. Zawierał artykuły sławnych już wtedy badaczy rytmów roślin i zwierząt takich jak: Colin S. Pittendrigh z Princeton University, Erwin Bünning z Uniwersytetu w Tybindze, czy Jürgen Aschoff z Instytutu Maxa-Plancka w Niemczech, z którymi potem wielokrotnie się spotykałem przy różnych okazjach. Jednak wtedy najbardziej zafascynował mnie artykuł Janet E. Harker z Uniwersytetu w Cambridge, w którym autorka lokalizowała zegar biologiczny w dwóch neurosekrecyjnych komórkach zwoju podprzetykowego *Periplaneta americana* (HARKER 1960). I chociaż późniejsze badania licznych autorów nie potwierdziły tego odkrycia (BRADY 1969), to praca ta pobudziła wyobraźnię wielu młodych badaczy wkraczających w zagadnienia rytmów biologicznych, wśród nich także i mnie.

Z chwila, gdy stało się jasne, że zegar biologiczny nie jest jakąś mistyczną funkcją organizmu, ale ma swoje morfologiczne podłoże, rozpoczęto intensywne badania nad jego lokalizacją. Ja również dołączyłem do grona osób poszukujących miejsca gdzie może znajdować się w organizmie zegar kontrolujący rytmy biologi-

czne. Prowadząc badania na świerszczach domowych (*Acheta domestica*) stwierdziłem, że główny mechanizm zegarowy kontrolujący dobowa rytmię aktywności lokomotorycznej jest zlokalizowany w ich mózgu, a mianowicie w komórkach neurosekrecyjnych międzymózgowia (*pars intercerebralis*). Usunięcie tego ośrodka prowadzi do natychmiastowej utraty rytmu ich aktywności. Rytm ten można przywrócić wykonując tak zwaną parabiozę owada nierytmicznego z rytmicznym (CYMBOROWSKI i BRADY 1972) lub implantując do organizmu owada nierytmicznego mózg pobrany wraz z komórkami neurosekrecyjnymi od owada rytmicznego (CYMBOROWSKI 1981). Było to możliwe dzięki temu, że w komórkach tych, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, odbywa się rytmiczna synteza RNA (CYMBOROWSKI i DUTKOWSKI 1969) oraz białek neurosekrecyjnych (CYMBOROWSKI i DUTKOWSKI 1970), które uwalniając się w rytmie dobowym do hemolimfy owada, powodują zmianę jego zachowania (CYMBOROWSKI 1973, 1992). Wiele lat później, we współpracy z kilkoma ośrodkami zagranicznymi, udało się stwierdzić, że w *pars intercerebralis* mózgu *Calliphora vicina* nie tylko zlokalizowany jest zegar biologiczny (CYMBOROWSKI i współaut. 1994), ale są tam także pozawzrokowe fotoreceptory, które odpowiedzialne są za synchronizację pracy zegara (CYMBOROWSKI i KORF 1994). Zegary biologiczne zlokalizowano też w innych narządach i tkankach owadów (CYMBOROWSKI i współaut. 1991, GIEBULTOWICZ 1999).

Zegary kontrolujące rytmy dobowe zostały wykryte w różnych ośrodkach układu nerwowego także kręgowców. U ssaków głównym ośrodkiem, w którym znajduje się zegar jest jądro nadskrzyżowaniowe (łac. *nucleus suprachiasmaticus* — SCN) podwzgórza, natomiast u ptaków, oprócz SCN, występuje on również w szyszynce. W licznych przypadkach ośrodki te udało się przetransplantować z jednego organizmu do drugiego bez zakłócenia ich funkcji. Na przykład, jeżeli młodym szczerom usunie się SCN, to utracą one swój normalny rytm aktywności lokomotorycznej. Rytm ten pojawi się ponownie w ciągu 2–8 tygodni, jeżeli implantuje się im do trzeciej komory mózgu analogiczny ośrodek podwzgórza pobrany od szczurzych noworodków (SAWAKI i współaut. 1984). Utratę rytmu aktywności lokomotorycznej u wróbla domowych (*Passer domesticus*), spowodowanego usunięciem szyszynki, można łatwo przywrócić implantując im ten organ pobrany od osobników normalnych, co już wcześniej wykazali GASTON i MENAKER (1968).

Dalsze lata badań nad rytmami biologicznymi dotyczyły głównie charakterystyki zegara ni-

mi zarządzającego. Wkrótce stwierdzono, że główną jego cechą jest, wspomniane już uprzednio, ujawnianie się rytmiki spontanicznej (ang. free running rhythm) w warunkach środowiska pozbawionego tak zwanego dawcy czasu (niem. Zeitgeber), na przykład w stałej ciemności i stałej temperaturze. Inną, bardzo ważną właściwością zegara biologicznego, jest jego zdolność do precyzyjnego odmierzania czasu w szerokim zakresie zmian temperatury (kompensacja temperaturowa). Tu pozwolę sobie na dygresję odnośnie moich pierwszych doświadczeń z tego zakresu, prowadzonych na świerszczach domowych. Otóż, chcąc zbadać wpływ obniżonej temperatury na pracę zegara tych owadów, rejestrowałem przez kilka dni ich aktywność lokomotoryczną w stałej ciemności (wtedy właśnie ujawnia się praca zegara) w temperaturze optymalnej 29°C. Następnie, nie przerywając rejestracji, owady przenieśliem na kilka dni do lodówki o temperaturze około 4°C. W tej temperaturze owady były mało aktywne, co oczywiście jest zrozumiałe, ale niezrozumiałym było to, że całkowicie straciły swój pierwotny rytm. Gdybym na tym etapie przerwał doświadczenie, wysnułbym niewątpliwie wniosek, że obniżona temperatura zaburza pracę zegara i byłby to wniosek fałszywy. Bowiem po ponownym przeniesieniu owadów do temperatury optymalnej (co na szczęście zrobiłem) rozpoczynały one wzmożoną aktywność dokładnie według wskazań swego zegara, z uwzględnieniem współczynnika dryfowania rytmu. Doświadczenie to wskazuje, że niska temperatura miała wpływ tylko na aktywność ruchową („wskazówki zegara”) badanych owadów, nie miała zaś — na sam jego mechanizm (CYMBOROWSKI 1987). Dzisiaj znane jest już molekularne podłoże kompensacji temperaturowej zegara biologicznego (SAWYER i współaut. 1997).

Podleganie endogennego zegara pełnej synchronizacji do rytmicznie zmieniającego się światła i ciemności, to inna bardzo ważna jego cecha umożliwiająca przyspieszanie lub opóźnianie określonych faz rytmu. Można się o tym łatwo przekonać na przykład przerywając stałą ciemność krótkimi pulsami światła stosowanymi w różnych okresach doby. Otrzymuje się wtedy tak zwana krzywą odpowiedzi fazowej (ang. phase response curve PRC). Jest to niezwykle ważna cecha rytmów umożliwiająca adaptację organizmu do nowych warunków, na przykład po odbyciu podróży transkontynentalnych, kiedy to występuje tak zwane zjawisko przesunięcia czasu (ang. jet lag). Badaniom dotyczącym możliwości przesuwania faz rytmów biologicznych poświęcono ponad 40 lat, a ich wyniki zostały przedstawione niedawno w

świetnym artykule przeglądowym JOHNSONA (1999). Znany jest też molekularny mechanizm tego zjawiska u owadów (EDERY i współaut. 1994).

W swoich badaniach na *Calliphora vicina* udało mi się wykazać, że bodziec świetlny, zdolny do przesunięcia fazy rytmu aktywności lokomotorycznej tego owada, powoduje aktywację genu *c-fos* w komórkach neurosekrecyjnych mózgu (CYMBOROWSKI i KING 1996). A jak powiedziałem wcześniej, w tych właśnie komórkach znajduje się zegar biologiczny badanych owadów, jest to więc dowód, że bodziec świetlny działa bezpośrednio na molekularny mechanizm zegara. Jaki jest ten molekularny mechanizm? Bodźce świetlne najprawdopodobniej docierają do zegara przy udziale wrażliwych na światło kryptochromów, których dwa geny, *Cry1* i *Cry2*, zidentyfikowano zarówno u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), jak i w siatkówce oka oraz w SCN ssaków (RANDY i współaut. 1998, HARDY i GLOSSOP 1999).

Chociaż nie poznano jeszcze wszystkich molekularnych „trybików i kół zębatych” zegara biologicznego, to w przypadku najlepiej dotychczas zbadanych pod tym względem organizmów: muszki owocowej i pleśni (*Neurospora crassa*) należącej do grzybów workowców, wydaje się pewne, że białka zegarowe regulują transkrypcję własnych genów na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Znalazło to swój wyraz w wielu artykułach przeglądowych zamieszczonych w prestiżowych czasopismach takich jak „Nature” czy „Science” (m.in. BELL-PEDERSEN i współaut. 1996, DUNLAP 1996 1998, 1999, SASSONE-CORSI 1998, SCHIBLER 1998, YOUNG 1998). W niektórych z nich pisze się wprost o eksplozji (np. A clockwork explosion, REPERT 1998) prac związanych z genetycznymi badaniami nad mechanizmem zegara biologicznego.

Jak to się zaczęło? Otóż już około 30 lat temu KONOPKA i BENZER (1971) stwierdzili, że gen *per* (ang. periodicity) jest niezbędny do uwidocznienia się rytmu aktywności lokomotorycznej muszki owocowej w warunkach stałej ciemności. Autorzy ci otrzymali trzy grupy mutantów muszek, różniące się między sobą długością okresu spontanicznego rytmu aktywności. 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 (per^0). Przypomnijmy, że owady normalne w warunkach stałej ciemności wykazują rytmy, których okresy są zbliżone do 24 godzin.

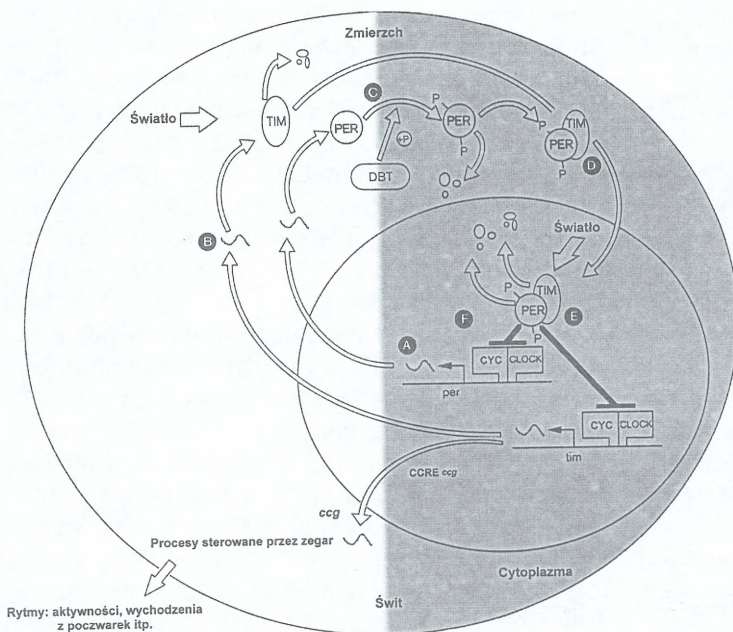
Był to wspaniały okres w badaniach nad mechanizmem zegara biologicznego. Zaczęły się

pojawiać prace o tak intrygujących tytułach jak: „Genetic dissection of the *Drosophila* circadian system” (KONOPKA 1979) sugerujące, że poznaliśmy już genetyczne podstawy zachowania się zwierząt. Po ukazaniu się tych prac spotkał mnie także komplement ze strony jednego z naszych czołowych genetyków Wydziału Biologii UW, który gratulował mi, że „zajmuję się prawdziwą nauką”.

W dalszych badaniach oprócz genu *per* stwierdzono u muszki owocowej obecność jeszcze innego genu *tim* (ang. timeless), którego mutacja prowadzi również do utraty badanych rytmów (SEHGAL i współaut. 1995). U tego gatunku zidentyfikowano także gen *Clock* (od ang. zegar), którego produkt spełnia funkcję czynnika aktywującego transkrypcję genów *per* i *tim*. (CHOOGON i współaut. 1998). Na tym nie koniec. Badania ostatnich kilkunastu 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, zaś ekspresja genu *tim* zachodzi wtedy w rytmie 18 i 27 godzin (KLOSS i współaut. 1998), stąd postulowanie obecności jeszcze jednego genu *dbt* (ang. double-time).

Szczegóły dotyczące współdziałania tych genów w kontroli badanych rytmów zostały zamieszczone w moim artykule przeglądowym (CYMBOROWSKI 1999), a w bardzo uproszczonej formie przedstawia je Ryc. 2. 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 *cyc* tworzą heterodimery CLOCK-CYC, które łączą się z promotorami genów *per* i *tim*, z sekwencją nukleotydową E w promotorach genów *per* i *tim*, aktywując transkrypcję i syntezę mRNA. 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 hamują transport heterodimerów CLOCK-CYC, 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. Szcze-



Ryc. 2. „Tykanie” zegara molekularnego *Drosophila* odbywa się na zasadzie „samonapędzającego” się ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Białka powstające w wyniku aktywacji genów zegara wędrują do jądra komórkowego hamując dalsze ich powstawanie po przez blokowanie własnych genów (pogrubione linie dochodzące do CLOCK-CYC). Zachodzenie kolejnych etapów w warunkach 12 godzin światła i 12 godzin ciemności (fragment szary) zaznaczonych literami od A do F zajmuje 24 godzin. W warunkach stałej ciemności cały cykl zachodzi w ciągu około 24 godzin (rytmu okołodobowe) a zastosowanie w takich warunkach kilkuminutowych pulsów światła (duże strzałki) powodują zmianę fazy rytmu (opóźnienie lub przyspieszenie). Małe kółka różnych kształtów oznaczają zdegradowane białko. Ccg „geny kontrolowane przez zegar”; CCRE ccg „elementy regulacyjne genów zegara”. (Zmodyfikowane wg. WILSBACHERA, TAKAHASHI 1998).

góry 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.

Badania molekularnych podstaw zegara biologicznego ssaków zaczęły się dopiero około 10 lat temu. Budzą one olbrzymie zainteresowanie ze względu na otwierające się możliwości ich praktycznego zastosowania, między innymi do walki z rakiem (HRUSHESKY i BJARNASON 1993). Zapoczątkowały je odkrycia mutantów rytmu okołodobowego chomików syryjskich. Ponieważ mutacje te dotyczyły okresu ich rytmu aktywności i snu, zostały przez swych odkrywców RALPHA i MENAKERA (1988) nazwane mutantami *tau*. Ostatnio kiedy w styczniu odwiedzałem Centrum Badań Chronobiologicznych na Uniwersytecie w Virginii w USA, mój wykład (*notabene* pierwszy raz transmitowany z tego Centrum przez internet do innych ośrodków w Stanach), zaszczylił swoją obecnością właśnie Profesor MENAKER badający rytmy biologiczne ssaków. Po wykładzie zdradził mi, że jest współautorem pracy, która została wysłana do „Science” i z niepokojem oczekuje na decyzję redakcji. I oto parę miesięcy później ukazała się ta praca (LOWREY i współaut. 2000), którą miałem przyjemność przedstawić Czytelnikom Gazety Wyborczej (23.05.2000). Autorzy dokonując krzyżówek między chomikami posiadającymi normalny okres rytmu wynoszący 24 godziny z mutantami *tau*, które miały okres krótszy stwierdzili, że chomiki mające tylko jeden gen *tau* zmutowany (heterozygoty) — wykazywały rytm o okresie 22-godzinnym, zaś te, u których obie kopie tego genu były zmutowane (homozygoty) — miały rytm o okresie 20-godzinnym. W dalszych badaniach, stosując najróżniejsze techniki biologii molekularnej, badacze ci stwierdzili, że mutacja *tau* zachodziła w miejscu chromosomu chomika, w którym znajduje się gen kinazy kazeinowej I epsilon (*CKI*). Analiza genetyczna otrzymanych wyników krzyżówek wykazała, że obszar chromosomu chomika, w którym występuje gen *CKI* jest bardzo zbliżony do analogicznego obszaru znajdującego się w chromosomie 22 człowieka i w 15 chromosomie myszy. Jeszcze bardziej szokujące okazało się stwierdzenie, że wspomniana już mutacja zaburzająca rytm dobowej aktywności muszki owocowej nazwana *double-time (dbt)*, też jest związana z aktywnością kinazy kazeinowej I.

W dalszych badaniach starano się ustalić funkcję genu *CKI* w rytmie okołodobowym snu i aktywności chomików, innymi słowy, chciano odpowiedzieć na zasadnicze pytanie: dlaczego

mutacje *tau* powodują skrócenie okresu rytmu? By to zbadać naukowcy postanowili najpierw stwierdzić czy mutacja *tau* zmienia właściwości biochemiczne tego enzymu. Wkrótce doszli do wniosku, że enzym *CKI* oddziałuje z białkami zegara *PER*, które na zasadzie sprzężenia zwrotnego regulują „chód” zegara biologicznego. U ssaków wykryto i opisano dotychczas dziesięć genów zegara biologicznego, wśród nich trzy homologi odkrytego uprzednio u muszki owocowej genu *per*: *mPer1*, *mPer2* i *mPer3* (ZYLKA i współaut. 1998). Następnym więc zadaniem było ustalenie jaki wpływ ma mutacja *tau* na proces interakcji enzymu *CKI* z białkiem *PER*? Szybko okazało się, że ta mutacja w znacznym stopniu upośledza fosforylację i degradację białka *PER* zachodzącą w cytoplazmie komórki, w porównaniu z normalnie działającym enzymem. W tej sytuacji u heterozygotycznych mutantów *tau* zachodzi szybsze nagromadzenie się białka *PER*, które wchodząc do jądra komórkowego powoduje wcześniejsze hamowanie ekspresji genu *per* na skutek blokowania czynników aktywacji transkrypcji *CLOCK-BMAL1* i cykl snu i aktywności chomika się skraca. U mutantów homozygotycznych ten cykl jest jeszcze krótszy. Zatem u organizmów normalnych aktywność kinazy kazeinowej I epsilon powoduje opóźnianie pracy zegara w takim stopniu, by okres rytmu wynosił dokładnie 24 godziny. Natomiast, jeżeli zajdzie mutacja w genie tego enzymu, następuje skrócenie okresu *tau* rytmu.

Wyniki przedstawionych badań dobitnie wskazują na udział enzymu *CKI* w mechanizmie zegara biologicznego chomików. Ponieważ aktywność tego enzymu może być stosunkowo łatwo modyfikowana przez różne związki chemiczne, pozwoli to na badanie mechanizmu zegara biologicznego i odpowiedź na podstawowe pytanie: co powoduje, że zegar ssaków może „chodzić” wolniej lub szybciej? Być może także w niedalekiej przyszłości będzie można przedstawiać zegar biologiczny człowieka, umożliwiając mu szybsze przystosowanie się do różnych warunków, na przykład pracy zmianowej czy po przekroczeniu strefy czasu. Znanych jest także wiele chorób związanych z zaburzeniami rytmu snu i aktywności człowieka, jak chociażby sezonowa depresja, którym można będzie zapobiegać poprzez odpowiednie regulowanie tego rytmu. Więcej szczegółów i nowych danych na temat molekularnych mechanizmów zegara ssaków znajdzie Czytelnik w najnowszym artykule przeglądowym KINGA i TAKAHASHIEGO (2000).

Z chwilą, gdy zdaliśmy sobie sprawę, że biorytmy są podłożem wszystkich procesów życiowych roślin, zwierząt i człowieka, musimy

umieć wyciągnąć z tego faktu praktyczne wnioski. Powinniśmy poznać w miarę możliwości wszystkie czynniki, które oddziałują na nasze rytmy. Przyszłe badania niewątpliwie będą dotyczyły roli poszczególnych genów zegara w kontroli procesów rytmicznych, oraz współdziałania między nimi w komórce podczas utrzymy-

waniu tych procesów. Dalszych badań wymagają także, coraz liczniej stwierdzane, fakty istnienia procesów rytmicznych całkowicie niezależnych od układu nerwowego. Powinny one doprowadzić do lepszego zrozumienia synchronizacji procesów fizjologicznych organizmu z uwzględnieniem czynnika czasu.

LITERATURA

- BELL-PEDERSEN D., GARCEAU N., LOROS J. J., 1996. *Circadian rhythms in fungi*. J. Gent. 75, 387-401.
- BRADY J., 1969. *How are insect circadian rhythms controlled?* Nature 223, 781-784.
- BROWN F. A. Jr., 1980. *The exogenous nature of rhythms*. [W:] *Chronobiology: Principles and applications to shifts in schedules*. L.E. SCHEWING, F. HALBERG (red). NATO Advanced Study Institutes Series. str. 127-135.
- BROWN F. A. Jr., 1960. *Response to pervasive geophysical factors and the biological clock problem*. [W:] *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 25, 57-73.
- 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.
- 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., 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., 1987. *Zegary biologiczne*, Wyd. III. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- CYMBOROWSKI B., LEWIS R. D., HONG S-F., SAUNDERS D. S., 1994. *Circadian locomotor activity rhythms and their entrainment to light-dark cycles continue in flies (Calliphora vicina) surgically deprived of their optic lobes*. J. Insect Physiol. 40, 501-510.
- 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., 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., 1992. *Insect endocrinology*, Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
- CYMBOROWSKI B., 1999. *Geny zegara biologicznego*. Kosmos, 48, 43-51.
- DE MAIRAN J., 1729. *Observation botanique*. [W:] *Histoire de l'Academie Royale des Sciences*, str. 35-36.
- 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, 15-48-1549.
- DUNLAP J. C., 1999. *Molecular bases for circadian clocks*. Cell 96, 271-290.
- EDERY I., RUTILA J. E., ROSBASH M., 1994. *Phase shifting of the circadian clock by induction of the Drosophila period protein*. Science 263, 237-240.
- GASTON S., MENAKER M., 1968. *Pineal function: The biological clock in the sparrow*. Science 160, 1125-1127.
- GIEBULTOWICZ J. M., 1999. *Insect circadian clocks: is it all in their heads?*. J. Insect Physiol. 45, 791-800.
- HARDIN P. E., GLOSSOP N. R. J., 1999. *The CRYs of flies and mice*. Science 286, 2460-2461.
- HARKER J. E., 1960. *Endocrine and nervous factors in insect circadian rhythms*. [W:] *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25, 279-287.
- HRUSHESKY W. J. M., BJARNASON G. A., 1993. *Circadian cancer therapy*. J. Clinical Oncol. 11, 1403-1417.
- JOHNSON C. H., 1999. *Forty years of PRCs - what have we learned?* Chronobiol. Intern. 16, 711-743.
- KING D. P., TAKAHASHI J. S., 2000. *Molecular genetics of circadian rhythms in mammals*. Ann. Rev. Neurosci. 23, 713-742.
- KLOSS B., PRICE J. L., SAEZ L., BLAU., 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.
- KONOPKA R. J., BENZER., 1971. *Clock mutants of Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2112-2116.
- KONOPKA R. J., 1979. *Genetic dissection of the Drosophila circadian system*. Feder. Proc. 38, 2602-2605.
- LOWREY P. L., SHIMOMURA K., ANTOCH M. P., YAMAZAKI S., ZEMENIDES P. D., RALPH M. R., MENAKER M., TAKAHASHI J. S., 2000. *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau*. Science 288, 483-491.
- NELSON D. C., LASSWELL J., ROGG L. E., COHEN M. A., BARTEL B., 2000. *FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis*. Cell. 101, 331-340.
- MOORE-EDE M. C., SULZMAN F. M., FULLER C. A., 1982. *The Clock that Time Us*. Harvard University Press, Cambridge MA.
- RALPH M. R., MENAKER M., 1988. *A mutation of the circadian system in golden hamsters*. Science 241, 1225-1227.
- RANDY J., VITATERNA M. H., MIYAMOTO Y., KAZNATSEV A., HSU D. S., PETIT C., SELBY C. P., DAWUT L., SMITHIES O., TAKAHASHI J. S., SANCAR A., 1998. *Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses*. Science 282, 1490-1494.
- REPPERT S. M., 1998. *A clockwork explosion!* Neuron 21, 1-4.
- SASSONE-CORSI P., 1998. *Molecular clocks: mastering time by gene regulation*. Nature 392, 871-874.
- SAWAKI Y., NIHONMATSU., KAWAMURA H., 1984. *Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions*. Neurosci. Res. 1, 67-72.

- SAWYER L. A., HENNESSY J. M., PEIXOTO A. A., ROSATO E., PARKINSON H., COSTA R., KYRIACOU C. P., 1997. *Natural variation in a Drosophila clock gene and temperature compensation*. *Science* 278, 2117-2120.
- SCHIBLER U., 1998. *Circadian rhythms. New cogwheels in the clockworks*. *Nature* 393, 620-621.
- 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.
- SOMERS D. S., 1999. *The Physiology and molecular bases of the plant circadian clock*, *Plant Physiol.* 121, 9-19.
- 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.
- WILSBACHER L. D., TAKAHASHI J. S., 1998. *Circadian rhythms: molecular basis of the clock*. *Current Opin. Gen. Dev.* 8, 595-602.