

PIOTR BĘBAS

*Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Zoologii
Zakład Fizjologii Zwierząt
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
E-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl*

O ZŁOŻONOŚCI ZEGARA BIOLOGICZNEGO OWADÓW, CZYLI JAK NARZĄDY ODMIERZAJĄ CZAS

WPROWADZENIE – ZEGAR BIOLOGICZNY I GENEROWANE PRZEZ NIEGO RYTMY

Jedną z cech organizmów jest zdolność do pomiaru upływu czasu, dzięki endogennemu mechanizmowi określanemu mianem zegara biologicznego. Pozwala on realizować funkcje życiowe w najbardziej korzystnym okresie. Zdolność do pomiaru upływającego czasu wiąże się bowiem z umiejętnością do przewidywania zmian, na które organizm może przygotować się z wyprzedzeniem, odpowiednio zmieniając swój metabolizm (KUHLMAN i współaut. 2007). Zegar biologiczny odmierza czas w oparciu o rytmy geofizyczne środowiska, analizując różnice w natężeniu bodźców, spośród których najważniejszym jest światło. Szczególna wrażliwość organizmu na ten czynnik ukształtowała się przez miliony lat ewolucji. Stało się tak najprawdopodobniej dlatego, że natężenie światła zmienia się w sposób bardziej przewidywalny, niż któregośkolwiek z pozostałych czynników środowiska abiotycznego. Światło stanowiło silny czynnik w selekcji naturalnej, która doprowadziła do wykształcenia się mechanizmów odbioru informacji o zmianach jego natężenia w czasie. Długość dnia i nocy podczas każdej doby zależą bowiem od aktualnego położenia naszej planety względem Słońca, a nie od krótkoterminowych fluktuacji natężenia takich czynników jak temperatura, wilgotność, czy ciśnienie atmosferyczne. Światło jest zatem podstawowym dawcą czasu (niem. Zeitgeber) dla zegara, który

dzięki odpowiednim receptorom odbiera informacje o fotoperiodzie, przetwarza je i generuje rytmy biologiczne, które obserwujemy jako zmiany aktywności efektorów. Te trzy zdolności określają również budowę zegara. Jego pierwszym elementem są drogi, którymi informacja od receptorów dociera do oscylatora, czyli drugiego elementu, odpowiedzialnego za generowanie rytmów. Jego trzecią składową są drogi przekazywania danych o parametrach tych rytmów, docierające do odpowiednich narządów wykonawczych. Zegar biologiczny generuje rytmy o 4 cechach, odróżniających je od innych oscylacji w ustroju. Pierwsza z nich wskazuje na endogenne charakter zegara i przejawia się zachowaniem generowanego rytmu w stałych warunkach, a więc wtedy, gdy oscylator nie odbiera informacji od dawcy czasu (np. po umieszczeniu organizmu w stałej ciemności). Druga cecha dotyczy okresu rytmu, który wynosi w przybliżeniu 24 godziny, przez co określany jest jako cirkadianny czyli okołodobowy (łac. *circa* = zbliżony, *dies* = dzień). Trzecia właściwość, wyraża się jego łatwą synchronizacją do nowego fotoperiodu. Natomiast czwarta cecha wiąże się ze stałością okresu rytmu generowanego przez zegar w bardzo szerokim zakresie temperatur otoczenia, na jakie może być wystawiony organizm, a zjawisko to określane jest mianem kompensacji temperaturowej.

ZEGAR CENTRALNY I ZEGARY PERYFERYCZNE – EWOLUCJA POGŁADÓW NA TEMAT SYSTEMU WIELOZEGAROWEGO ZWIERZĄT

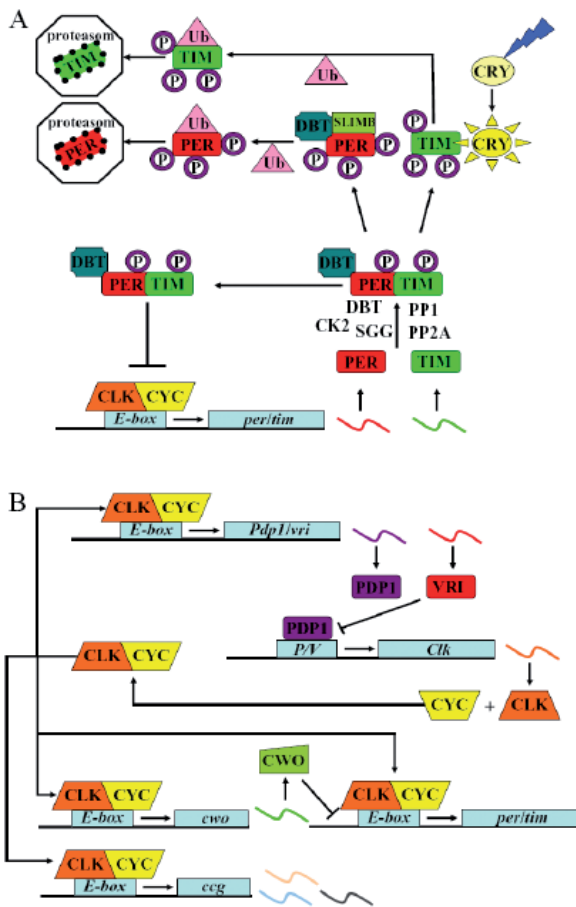
Niniejsza praca jest poświęcona zegarowi biologicznemu owadów, jednakże na wstępie warto wspomnieć, jak zbudowany jest zegar u ssaków. Jest to ważne, gdyż poznanie jego struktury miało ogromny wpływ na poglądy chronobiologów badających zegary u innych zwierząt. Ustalono, że oscylator biologiczny ssaków tworzą neurony podwzgórza, skupione w strukturze zwanej jądrami nadskrzyżowaniowymi (DIBNER i współaut. 2010). Odbierają one informację ze środowiska drogą nerwową – szlakiem siatkówkowo-podwzgorzowym, a same przez liczne projekcje nerwowe kontaktują się z wieloma ośrodkami w mózgu, które pośredniczą w koordynowaniu rytmów generowanych przez sam oscylator. Poznanie struktury tego zegara zrodziło uogólniany pogląd, zakładający jego pełną centralizację w ośrodkowym układzie nerwowym u zwierząt i wpływ na wszystkie rytmy obserwowane w organizmie. Wyniki wielu badań, prowadzonych na niższych kręgowcach oraz bezkręgowcach weryfikują jednakże tę opinię, dowodząc, że w organizmach zwierząt znajduje się wiele zegarów. Współdziałają one ze sobą na równych prawach, a hierarchiczny porządek, w którym jeden zegar generuje wszystkie oscylacje w ustroju (jak ma to miejsce u ssaków), jest raczej wyjątkiem, a nie regułą (TAMAI i współaut. 2003). Opinia na temat budowy zegara biologicznego ewoluuje nadal. Po odkryciu mechanizmu zegara molekularnego, u różnych grup organizmów, ukształtował się nowy pogląd na temat budujących go elementów. Okazuje się, że każdy z nich może znajdować się w pojedynczej komórce (ZHANG i KAY 2010). Rolę fotoreceptorów, czynników ge-

nerujących rytmy, jak i efektorów, pełnią w tym przypadku białka. U tkankowców liczba takich zegarów komórkowych może być bardzo duża. Są one skupione w centrach generujących rytmy, które obserwujemy na poziomie całego organizmu, ale są także rozproszone w tkankach, gdzie utrzymują lokalne oscylacje na terenie narządów lub całych układów. Wiele z nich wykazuje bardzo daleko posuniętą autonomię, przejawiającą się utrzymaniem rytmu przez wiele dni w narządach, tkankach, czy komórkach hodowanych *in vitro*; w tych samych warunkach zachowują one endogenną wrażliwość na informację pochodzącą od dawcy czasu. Uprawiony jest zatem pogląd tłumaczący występowanie u zwierząt systemu wielozegarowego, a nie pojedynczego zegara biologicznego. Niemniej, za sprawą powszechnej opinii o centralizacji zegara w ośrodkowym układzie nerwowym, wszystkie zegary zlokalizowane poza mózgiem nazywane są peryferycznymi. Nazwa ta nasuwa zawsze konotację z określeniami używanymi do opisu mechanizmów mniej ważnych lub zależnych. Ponownie jest ona słuszna w odniesieniu do zegarów peryferycznych ssaków, które są lokalnymi ośrodkami generowania oscylacji w wielu narządach, ale całkowicie podległymi kontroli zegara centralnego, obecnego na terenie jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza (CUNINKOVA i BROWN 2008). Natomiast u większości zwierząt nie będących ssakami, w tym owadów, niemal wszystkie zegary położone poza mózgiem są w pełni autonomiczne, a przymiotnik „peryferyczne” wskazuje właśnie na ich lokalizację, a nie pozycję funkcjonalną (VANSTEENSEL i współaut. 2008).

MECHANIZM ZEGARA MOLEKULARNEGO *DROSOPHILA MELANOGASTER* I INNYCH OWADÓW

Początki badań nad zegarem molekularnym owadów sięgają wczesnych lat 70. ubiegłego wieku i związane były z analizą przyczyn, które powodowały zmiany rytmów aktywności lokomotorycznej oraz linień poczwerek do form dorosłych, u mutantów *D. melanogaster*. Odkryto, że odpowiadają za nie mutacje pojedynczego genu, a ze względu na fenotyp mutantów, wyrażający się w postaci zmian okresu obu rytmów, nazwano go period (ang. period, okres) (ROSBASH i współaut. 2007). Od tamtego czasu znacząco

wzrosła liczba znanych genów, od których prawidłowej ekspresji zależy działanie zegara molekularnego *D. melanogaster* (ALLADA i CHUNG 2010, STANEWSKY 2003). Produkty ekspresji tych genów, czyli białka zegara biologicznego, oddziałują ze sobą tworząc mechanizm oscylatora molekularnego. Jego działanie objawia się w postaci rytmicznej ekspresji wspomnianych genów i jest realizowane w trzech ząbających się szlakach, gdzie białka zegara regulują ekspresję własnych genów, a także innych genów zegarowych.



Ryc. 1. Struktura zegara molekularnego *Drosophila melanogaster*.

(A) Pętla głównego sprzężenia zwrotnego poprzez którą regulowana jest ekspresja genów *per* i *tim*. Heterodimer CLK/CYC, łącząc się sekwencją *E-box*, aktywuje transkrypcję *per* oraz *tim*. Powstające białka PER i TIM są fosforyzowane przez kinazy DBT, SGG, CK2 (reszty kwasu ortofosforowego oznaczono literą P w ciemnofioletowych kółkach) lub defosforylowane przez fosfatazy PP1 i PP2A. Białka PER i TIM tworzą heterodimer, który przemieszcza się na teren jądra komórkowego, gdzie hamuje ekspresję własnych genów, dzięki wiązaniu się z kompleksem CLK/CYC. Do odblokowania transkrypcji *per* i *tim* konieczna jest degradacja białek PER i TIM, która odbywa się na terenie proteasomów. Przed degradacją PER i TIM są hiperfosforylowane i ubikwitynowane. Ubikwitynacja PER odbywa się z udziałem ligazy SLIMB. TIM jest kierowane na szlak ubikwitynacji przez białko CRY pobudzone przez światło. (B) Dwie wspomagające pętle sprzężenia zwrotnego systemu zegara. W pierwszej z nich, ekspresja CLK regulowana jest przez dwa białka - PDP1 i VRI, które konkurują podczas wiązania się do sekwencji regulatorowej *P/V* genu *Clk*. Przewaga PDP1 stymulu-

Pierwszy, główny szlak przyjmuje formę pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego (Ryc. 1A). W ciągu dnia (faza jasna cyklu) obserwujemy wzmożoną aktywność transkrypcyjną genów *period* (*per*) i *timeless* (*tim*), którą aktywuje heterodimer zbudowany z dwóch białek, CLOCK (CLK) i CYCLE (CYC). Warunkiem inicjacji tego procesu jest przyłączenie CLK/CYC do sekwencji *E-box* w obszarach regulatorowych tych genów. Gromadzenie się transkryptów *per* i *tim* w cytoplazmie skutkuje wzrostem ilości białek PER i TIM na początku nocy (fazy ciemnej cyklu). W połowie fazy ciemnej białka PER i TIM łączą się ze sobą w heterodimer, co promuje ich translokację do jądra komórkowego, gdzie hamują ekspresję własnych genów. Dzieje się tak za sprawą łączenia się PER/TIM z heterodimerem CLK/CYC, czego konsekwencją jest zablokowanie jego zdolności do wiązania DNA. Opisany cykl ekspresji *per* i *tim* trwa około 24 godzin ze względu na modyfikacje posttranslacyjne białek zegara (głównie PER i TIM), które są czasochłonnym procesem. W konsekwencji dochodzi do opóźnienia między aktywacją ekspresji przez CLK/CYC a jej hamowaniem przez PER/TIM, czyli białka będące ostatecznymi produktami tej ekspresji. Takie rozdzielenie w czasie obu procesów skutkuje cyklicznymi zmianami poziomu transkrypcji wszystkich genów zależnych od heterodimeru CLK/CYC, nie tylko genów zegara biologicznego. Wspomniane modyfikacje posttranslacyjne obejmują przede wszystkim fosforylację PER, TIM i CLK. Białko PER jest fosforylowane przez kinazę kazeinową Iε zwaną Doubletime (DBT) oraz kinazę kazeinową 2 (CK2), co podwyższa jego aktywność, jako czynnika hamującego transkrypcję. Fosforylacja TIM zachodzi przy udziale kinazy syntazy glikogenu 3β, nazywanej SHAGGY (SGG). Należy nadmienić, że kinaza DBT w czasie fosforylacji wiąże się z PER, a po powstaniu kompleksu PER/TIM przemieszcza

je transkrypcję *Clk* i wzrost ilości białka CLK, które wiąże się z obecnym stale w komórkach białkiem CYC. W odpowiedzi heterodimer CLK/CYC aktywuje transkrypcję *Pdp1* i *vri* oraz genu *cwo*. Powstające białko CWO i kompleks CLK/CYC konkurują ze sobą przy wiązaniu się z sekwencją *E-box* *per* i *tim*, tworząc drugą wspomagającą pętlę mechanizmu zegarowego. Zmiany poziomu aktywnego heterodimeru CLK/CYC najprawdopodobniej wpływają na cykliczną ekspresję genów *cgc*. Dokładny opis działania oscylatora molekularnego znajduje się w tekście pracy. (wg ALLADY i CHUNGA 2010, zmodyfikowana).

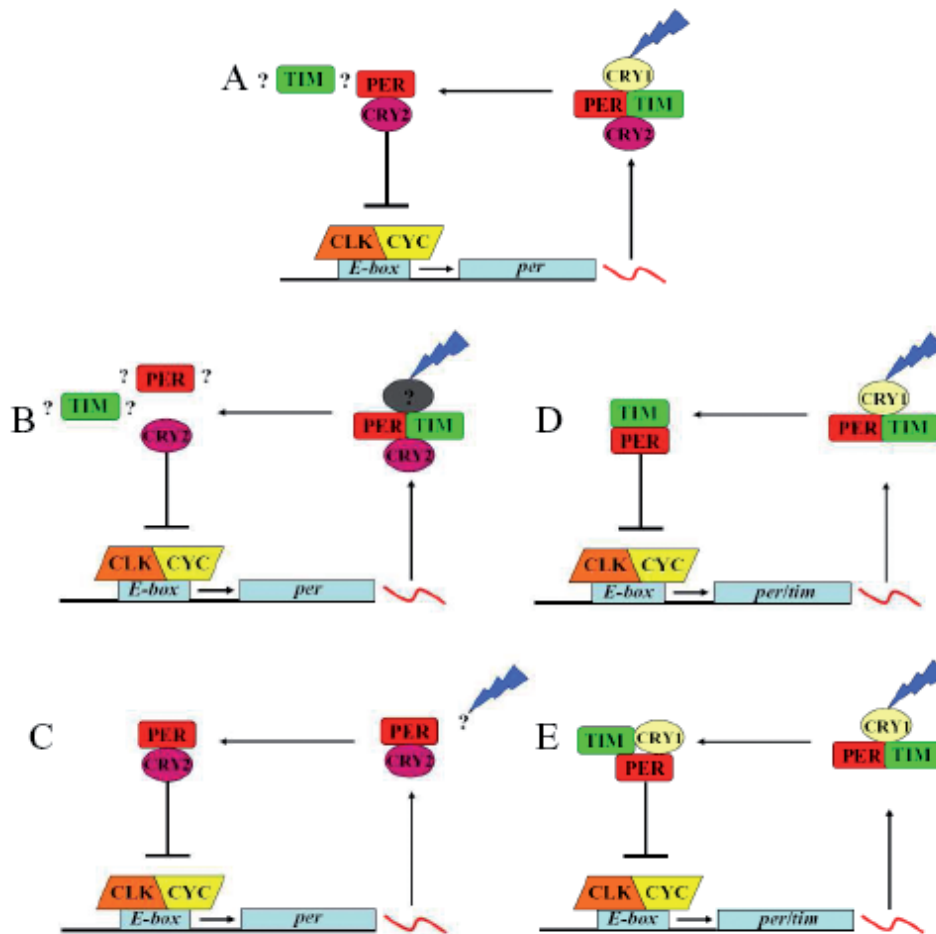
się wraz z nim do jądra komórkowego, gdzie pełni jeszcze jedną funkcję – destabilizuje CLK, powodując jego fosforylację. Degradacja CLK oraz wspomniane wiązanie kompleksów CLK/CYC przez PER/TIM hamuje ekspresję *per* oraz *tim*, a stan ten utrzymuje się do końca nocy. Rankiem TIM znika z komórek, a wkrótce po nim PER. Degradacja TIM jest zależna od fotoreceptora komórkowego, kryptochromu (CRY). Białko CRY aktywowane światłem wiąże się z TIM stymulując proces jego ubikwitynacji. To powoduje, że TIM zostaje skierowane na szlak degradacji w proteasomach. Za znikanie białka PER z komórek na początku dnia odpowiada ligaza ubikwitylowa E3 znana jako Supernumerary limbs (SLIMB). Białko SLIMB przenosi reszty ubikwityny na ufosforylowane przez DBT cząsteczki PER, co staje się sygnałem do jego degradacji na terenie proteasomów.

Dwa dodatkowe (wspomagające) szlaki ekspresji genów zegara molekularnego, także przyjmują formę pętli sprzężeń zwrotnych (Ryc. 1B). Funkcję regulatorów pierwszej z nich pełnią białka VRILLE (VRI) i Par domain protein 1 (PDP1). Ekspresja kodujących je genów, *vri* i *Pdp1*, jest aktywowana przez heterodimer CLK/CYC. Powstające w odpowiedzi białko VRI hamuje ekspresję *Clk*, a PDP1 ją aktywuje. Dyskutowany jest także analogiczny wpływ obu białek na ekspresję genu *cry*. VRI gromadzi się w komórkach szybciej niż PDP1, co przy jego hamującym wpływie na ekspresję *Clk* i prawdopodobnie *cry*, powoduje około 12 godzinne opóźnienie fazy rytmu akumulacji ich transkryptów w porównaniu z fazą ekspresji *per* i *tim*. Ostatnią z odkrytych pętli sprzężeń zwrotnych oscylatora tworzy białko CLOCKWORK ORANGE (CWO) i heterodimer CLK/CYC. CWO jest czynnikiem transkrypcyjnym, który podobnie do białek CLK i CYC posiada domenę bHLH, która umożliwia wiązanie DNA. Dzięki niej CWO konkuruje z kompleksem CLK/CYC podczas przyłączania się do sekwencji E-box. CWO działa jako represor, hamując ekspresję genów *per* i *tim* wpływając tym samym na główną pętlę mechanizmu oscylatora. Uważa się, że opisane powyżej, dodatkowe szlaki regulacji ekspresji genów zegara, mają zasadniczy wpływ na fazę oraz amplitudę rytmu oscylatora molekularnego.

Opisany mechanizm oscylatora molekularnego *D. melanogaster* powstał głównie w oparciu o badania efektów, jakie wywołują mutacje poszczególnych genów zegara. Obejmowały one analizę fenotypu mutantów, a

przede wszystkich zmiany w ich zachowaniu, które były konsekwencją zaburzeń działania zegara zlokalizowanego w ośrodkowym układzie nerwowym. Z tego powodu bardzo mało wiadomo o strukturze molekularnej oscylatorów peryferycznych *D. melanogaster*. Wyniki nielicznych badań przeprowadzonych w tym zakresie wskazują, że mogą one mieć przynajmniej częściowo inną budowę niż oscylator obecny w mózgu. Do takich wniosków można dojść analizując mechanizm zegara w czułkach i cewkach Malpighiego (ALLADA i CHUNG 2010).

Struktura oscylatora molekularnego u innych niż *D. melanogaster* gatunków owadów, jest bardzo słabo poznana, a modele tłumaczące sposób ich funkcjonowania są wyjątkowo ubogie. Za najstarszy, z ewolucyjnego punktu widzenia, uważa się oscylator obecny u Lepidoptera (REPPERT 2007, YUAN i współaut. 2007). Cechą szczególną jego mechanizmu są dwa białka CRY: CRY1 i CRY2. Białko CRY1 pełni rolę fotoreceptora komórkowego i wpływa na stabilność TIM, podczas gdy CRY2, wraz z PER, odpowiada za hamowanie transkrypcji głównych genów zegara (Ryc. 2A). Błonkówki i chrząszcze utraciły gen *cry1*, zachowując *cry2*, który koduje główny represor transkrypcji w mechanizmie ich oscylatora (Ryc. 2A i 2B). Z kolei muchówki z rodziny Drosophilidae utraciły *cry2*, a zachowały gen *cry1*, który koduje białko pełniące funkcję fotoreceptora w oscylatorze na terenie mózgu, ale także fotoreceptora i integralnego elementu pętli regulacyjnej, w oscylatorach peryferycznych (Ryc. 2D i 2E). U innych muchówek, np. komarów, *cry2* jest obecny w genomie i koduje białko, które najprawdopodobniej pełni rolę represora transkrypcji w mechanizmie zegara molekularnego, analogicznie jak ma to miejsce u luskoskrzydłych, błonkówek i chrząszczy. Brak *cry1* w genomach niektórych owadów rozszerza badania zegarów o poszukiwanie alternatywnych fotoreceptorów oscylatora molekularnego. Ze względu na ekspresję białka TIM u chrząszczy, przypuszcza się, że może ono brać udział w odpowiedzi zegara na światło, analogicznie, jak u *D. melanogaster*, ale sam szlak fototransdukcji sygnału do oscylatora nie jest znany. Z zupełnie innym mechanizmem mamy do czynienia w przypadku błonkówek. Pszczoła miodna nie posiada w swym genomie ortologa *tim*. Trudno zatem stawiać hipotezy, na który z elementów oscylatora molekularnego u tego gatunku bezpośrednio lub pośrednio



Ryc. 2. Modele zegarów molekularnych różnych gatunków owadów.

(A) U Lepidoptera białko CRY1 pełni funkcję fotoreceptora oddziałującego na mechanizm poprzez białko TIM, a CRY2 wraz z PER są negatywnymi regulatorami transkrypcji. (B) Białko CRY2 pełni najprawdopodobniej analogiczną rolę w oscylatorze u chrząszczy, jednak u zwierząt tych nieznanym jest szlak fototransdukcji sygnału i udział białek PER oraz TIM w generowaniu rytmu. (C) Błonkówki nie posiadają genów CRY1 i TIM, a w mechanizmie ich oscylatora PER i CRY2 pełnią rolę negatywnych regulatorów transkrypcji; nieznanym jest mechanizm wrażliwości tego oscylatora na światło. (D) Najlepiej zbadany oscylator molekularny w ośrodkowym układzie nerwowym i (E) słabo poznany mechanizm oscylatorów peryferycznych u *Drosophila melanogaster*. W pierwszym z nich białko CRY działa jako fotoreceptor, w drugim jako fotoreceptor i być może regulator o nieznanym funkcji – szczegóły w tekście pracy. (wg ALLADAY i CHUNGA 2010 oraz BLOCHA 2010).

może działać światło. Od niedawna pojawiają się sugestie o pteropsynach i białku kodowanym przez ortologa ssaczego genu *tim2*, jako czynnikach, na które należy zwrócić uwagę poszukując drogi, którą informacja o fotoperiodzie dociera do zegara u pszczoły (BLOCH 2010).

Ilość informacji o strukturze zegara molekularnego jest bardzo duża, w porównaniu z tym, co wiemy o sposobie jego oddziaływania na kontrolowane procesy. Wykonując analizę porównawczą transkryp-

tomów narządów badanych o różnych porach doby, łatwo zauważyć, że ekspresja setek (a czasem tysięcy) genów ma rytmiczny charakter. Jednak dotychczas niewiele z nich opisano jako geny kontrolowane przez zegar (ang. clock controlled genes, *cgc*), czyli takie, których ekspresja zależy bezpośrednio od elementów oscylatora molekularnego (białek, będących regulatorami transkrypcji) – problem ten jest bardzo dobrze przedyskutowany w pracy ALLADA i CHUNG 2010.

ZEGAR W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM OWADÓW

Ekspresję genów i obecność białek zegara biologicznego opisano w bardzo wielu obszarach mózgu *D. melanogaster*, na terenie neuronów i komórek glejowych oraz w powiązanych z nim strukturach np. fotoreceptorach. Nie wszystkie jednak tworzą funkcjonalny zegar, który odpowiada za generowanie rytmu aktywności ruchowej. Rolę taką u *D. melanogaster* pełnią komórki centralnej części mózgu, zarówno glejowe, jak i nerwowe. Ostatnie z wymienionych, są skupione w trzech podgrupach neuronów lateralnych (bocznych) i trzech podgrupach neuronów dorsalnych (brzuszných). Odpowiadają one za różne parametry rytmów okołodobowych *D. melanogaster*, tworząc skomplikowaną sieć powiązań funkcjonalnych, o których można dowiedzieć się z obszernych opracowań, opublikowanych w ciągu ostatnich kilku lat (NITABACH i TAGHERT 2008 i cytowane tu prace). Relatywnie dużo badań z zakresu neuroanatomii funkcjonalnej zegara wykonano na *Musca domestica* oraz kilku innych gatunkach muchówek, dostarczając szeregu dowodów wskazujących na to, że ich oscylatory molekularne w ośrodkowym układzie nerwowym mogą działać inaczej niż opisany u *D. melanogaster*. Różnice te dotyczą profilu ekspresji genów zegara w warunkach stałej ciemności i podczas ciągłej ekspozycji owadów na światło, ale obejmują także dobowe zmiany poziomu i lokalizacji kodowanych przez nie białek, na terenie neuronów zegarowych (SANDRELLI i współaut. 2008).

Cytoarchitektura zegara w ośrodkowym układzie nerwowym Lepidoptera była badana głównie u trzech gatunków: *Antheraea pernyi*, *Bombyx mori* i *Danaus plexippus*. Pierwsze z analiz, które wykonano w tym zakresie polegały na uszkodzaniu różnych obszarów mózgu i przeszczepianiu go do jamy ciała, a następnie obserwacjach wpływu tych manipulacji na zachowanie się oraz rozwój owadów. Dzięki nim dowiedziono, że zegar zlokalizowany jest w brzuszno-bocznej części *protocerebrum* (przodomózgowia). Dokładniejsze analizy wykazały, że u wszystkich trzech wymienionych gatunków, ekspresja genów zegara odbywa się w grupie komórek neurosekrecyjnych (la_1) obszaru *protocerebrum*, określanego jako *Pars Lateralis* (PL). Porównując dobowe profile ekspresji genów zegara w neuronach Lepidoptera i *D. melanogaster*, stwierdzono kilka różnic. U żadnego z badanych gatunków nie zaob-

serwowano przesunięcia fazy rytmu ekspresji genów zegarowych w stosunku do akumulacji kodowanych przez nie białek, co jest typowym zjawiskiem w neuronach lateralnych mózgu *D. melanogaster*. Kolejna, fundamentalna różnica, dotyczy zachowania się białek zegarowych, które gromadzą się w cytoplazmie oraz aksonach neuronów i nigdy nie przemieszczają się do jąder tych komórek. Wyjątek stanowi CRY2 u *D. plexippus* które wykrywane jest okresowo w cytoplazmie i jądrach neuronów PL. Odstępstwem od tej reguły jest też cykliczne gromadzenie się białka PER w jądrach neuronów la_1 u *Manduca sexta* (WISE i współaut. 2002). Badając *A. pernyi* opisano nieznane dotychczas u innych owadów zjawisko produkcji antysensownego RNA *per* w neuronach zawierających oscylator. Rola tego RNA nie jest znana. U Lepidoptera obserwowano także niewielkie (ale najprawdopodobniej istotne dla działania oscylatora), międzygatunkowe różnice profili ekspresji genów i białek zegara w mózgu (szczegółowy przegląd danych na ten temat znajduje się w pracy (SANDRELLI i współaut. 2008)).

Zegar w mózgu Lepidoptera odpowiada za generowanie i regulację szeregu rytmów behawioralnych oraz rozwojowych (wykluwania się z jaj, linień do kolejnych stadiów rozwojowych, czy zachowań przygotowawczych przed metamorfozą). Wpływ zegara na procesy, które reguluje, ma wyraz w strukturze sieci połączeń między neuronami PL, a kilkoma obszarami mózgu. U dwóch gatunków, *A. pernyi* i *B. mori*, neurony PL najprawdopodobniej kontaktują się z komórkami neurosekrecyjnymi, produkującymi hormon protorakotropowy, który jest jednym z peptydów regulujących aktywność wewnątrzwydzielniczą u owadów. Projekcje nerwowe z PL u *B. mori* docierają do ciał sercowatych (*corpora cardiaca*) i ciał przyległych (*corpora allata*), a więc głównych narządów neurohemalnych i dokrewnych, zaangażowanych w gromadzenie oraz produkcję hormonów kontrolujących rozwój postembrionalny i metabolizm. U tego samego gatunku obecność białek zegara opisano w neuronach *Pars Intercerebralis* (PI) oraz dużych neuronach zwoju frontalnego, co może wskazywać na koordynację funkcji układu stomatogastrycznego przez zegar biologiczny (nerwowy układ stomatogastryczny odpowiada za koordynację funkcji przedniego odcinka

przewodu pokarmowego owadów). Jednak najwięcej badań w zakresie anatomii funkcjonalnej zegara w ośrodkowym układzie nerwowym przeprowadzono na *D. plexippus*, określając jego wpływ na diapauzę rozrodczą oraz migracje sezonowe. Zidentyfikowano szereg powiązań neuronalnych między PL i ośrodkami koordynującymi produkcję kluczowego dla stanu diapauzy hormonu juvenilnego; przedstawiono dowody na istnienie połączeń między PL i receptorami wrażliwymi na spolaryzowane światło ultrafioletowe, które jest głównym dawcą informacji o położeniu owada względem jego źródła, czyli Słońca, podczas migracji; określono przebieg projekcji nerwowych docierających z PL do kompleksu centralnego, a więc ośrodka asocjacyjnego w mózgu, który uważany jest za miejsce lokalizacji kompasu koordynującego długodystansowe migracje owadów (REPPERT 2007).

Zegar koordynujący rytmy behawioralne może być zlokalizowany poza centralną częścią mózgu. Z sytuacją taką mamy do czynienia u karaczanów i prostoskrzydłych (TOMIOKA i ABDELSALAM 2004). Podobnie jak w przypadku Lepidoptera, wczesne badania prowadzone celem poszukiwania zegarów u tych zwierząt polegały na usuwaniu części mózgu lub ich transplantacjach między osobnikami hodowanymi w warunkach, gdzie dobowy cykl dnia i nocy miał różną fazę. Dzięki tego typu manipulacjom można określić, czy endogenny rytm generowany przez neurony dawcy zostanie narzucony biorcy, któremu wcześniej usunięto jego własny zegar. Eksperymenty takie przeprowadzono na *Leucophaea maderae* wykazując, że zegar u tego karaczana zlokalizowany jest w płatach wzrokowych, na terenie niewielkiej struktury zwanej Accessory Medula (AME) (HOMBERG i współaut. 2003). Przywrócenie rytmu aktywności u *L. maderae* po przeszczepie wymagało dodatkowo regeneracji połączeń

nerwowych między AME i centralną częścią mózgu. Odtwarzane projekcje nerwowe obejmowały komórki, na terenie których produkowany jest Pigment Dispersing Hormon (PDH), peptyd charakterystyczny dla neuronów wchodzących w skład sieci neuronalnej zegara biologicznego. Analizując literaturę dotyczącą położenia zegara biologicznego w mózgu u różnych gatunków świerszczy, trudno jest wyciągnąć uogólnione wnioski. Dyskutowano o jego lokalizacji w *lamina* (płytkce zwojowej) na terenie płatów wzrokowych u *Gryllus bimaculatus*, w *Pars Intercerebralis* u *Acheta domestica*, na terenie AME, w centralnej części mózgu u *Teleogryllus commodus* i *Teleogryllus oceanicus*, oraz najprawdopodobniej w płatach wzrokowych u *Dianemobius nigrofasciatus*, i co nietypowe, w zwoju podprzelykowym u *Allenomobius allardi* (SANDRELLI i współaut. 2008). Trzeba jednak zaznaczyć, że poszukiwanie zegara w mózgu, u większości z wymienionych gatunków, polegało na immunohistochemicznej lokalizacji białek oscylatora molekularnego i kwestią sporną pozostaje, czy jest to wystarczające kryterium do wyciągania wniosków o takim, a nie innym jego położeniu.

Jedne z najnowszych doniesień na temat zegara w mózgu owadów pochodzą z badań pluskwiaka *Rhodnius prolixus* (VAFOPOULOU i współaut. 2010). Analizując metodami immunohistochemicznymi obecność PER, TIM oraz PDF (ang. Pigment Dispersing Factor, kodowany przez ortologa genu *pdh*) stwierdzono, że neurony zawierające oscylator molekularny u tego gatunku skupiają się w dwóch grupach. Jedną położoną jest tuż przy AME (neurony lateralne, LNs), a druga w tylnej części brzuszno-protopocerebrum (neurony dorsalne, DNs). Charakterystyka projekcji nerwowych stworzonych przez te komórki potwierdziła wcześniejsze dane o kontakcie sieci neuronalnej zegara z komórkami produkującymi neurohormony kontrolujące rozwój u tego owada.

ZEGAR W NARZĄDACH WYDZIELANIA WEWNĘTRZNEGO

Badania różnych gatunków owadów wykazały, że przebieg wielu zdarzeń towarzyszących ich rozwojowi ma charakter rytmiczny, na przykład: linienia do kolejnych stadiów larwalnych, przygotowanie do metamorfozy (opróżnianie jelita przez larwę) oraz opuszczenie kutikuli poczwarkowej przez formę dojrzałą. Wpływ zegara w ośrodkowym ukła-

dzie nerwowym na te procesy odbywa się pośrednio, przez kontrolę aktywności wydzielniczej układu nerwowego oraz narządów endokrynych. W literaturze opisano co najmniej kilka przykładów, które wskazują, że regulacja ta może mieć bardziej złożony charakter i odbywać się z udziałem zegarów peryferycznych, zlokalizowanych

w gruczolach wydzielania wewnętrznego (GIEBULTOWICZ 1999). Do wyciągnięcia takiego wniosku skłaniają badania gruczolów protorakalnych (PG), będących głównym źródłem ekdysteroidów, czyli hormonów regulujących przebieg niemal każdego procesu rozwojowego owadów. Stwierdzono, że PG rytmicznie uwalniają ekdysteroidy *in vivo*, jak również *in vitro*, gdy są hodowane przez kilka dni w odpowiedniej pożywce. Jedne z pierwszych badań, które dowodziły obecności zegara w PG przeprowadzono na *Samia cynthia ricini*. W złożonym eksperymencie, polegającym na przeszczepianiu gruczolów do jamy ciała odwłoka, hodowli owadów w stałej ciemności, a następnie naświetlania różnych obszarów ich ciała, wykazano jednoznacznie, że PG muszą zawierać endogenne, wrażliwe na światło zegary, który wpływa na czas opróżniania jelita przez larwy. Badania *Manduca sexta* potwierdziły to w pewnym sensie, bo dowiodły, że behavior przygotowawczy do metamorfozy, związany ze zmianami stężenia ekdysteroidów w hemolimfie, kontrolowany jest przez zegar położony poza ośrodkowym układem nerwowym. Zdolność PG ćmy *Galleria mellonella* do rytmicznego uwalniania ekdysteroidów wykazano podczas hodowli organotypowej tych narządów *in vitro*. Jednak najwięcej dowodów na obecność zegara w gruczolach protorakalnych dostarczyły badania pluskwiaka, *Rhodnius prolixus*. Wykazano bowiem, że PG tego gatunku zawierają wrażliwe na światło zegary, który kontroluje rytm syntezy i uwalniania ekdysteroidów. Zegar ten ma jednak ograni-

czoną autonomię. Generowane przez niego rytmy synchronizuje zegar zlokalizowany w ośrodkowym układzie nerwowym, za pośrednictwem cyklicznego uwalniania hormonu protorakotropowego (PTTH). Obecność oscylatora molekularnego w komórkach PG opisano również u poczwarek *D. melanogaster*, wskazując na dobowe zmiany poziomu białka PER w budujących je komórkach. Stwierdzono, że oscylacje te utrzymują się podczas hodowli *in vitro* gruczolów protorakalnych i mózgow (przy zachowaniu istniejących między nimi połączeń nerwowych) także w obecności tetrodotoksyny, a więc związku blokującego przewodnictwo nerwowe. W tych samych warunkach zegar obecny na terenie PG ulega łatwej synchronizacji po zmianie fotoperiodu, co świadczy o jego pełnej autonomii. Nie wiadomo jednak, czy zegar ten uczestniczy w regulacji syntezy i uwalniania ekdysteroidów. Szczegółowy przegląd informacji na temat badań zegarów biologicznych w narządach wydzielania wewnętrznego można znaleźć w trzech pracach przeglądowych (GIEBULTOWICZ 1999, 2001; GIEBULTOWICZ i BEBAS 2005).

U motyla *Danaus plexippus* komórki ciała sercowatych i ciała przyległych są miejscem, gdzie identyfikowano białka zegara. Nie wiadomo jednak, jaką pełnią rolę w tych narządach. Biorąc pod uwagę projekcje nerwowe docierające do tych narządów z komórek PL mózgu jest mało prawdopodobne, aby zawierały w pełni autonomiczny zegar (SANDRELLI i współaut. 2008).

ZEGAR W NARZĄDZIE ZMYŚLU POWONNIENIA

W historii badań oscylatorów peryferycznych szczególną pozycję zajmują narządy węchowe. Stało się to za sprawą spektakularnych wyników, które uzyskano w kilku eksperymentach przeprowadzonych na *D. melanogaster* (KRISHNAN i współaut. 2005). W przypadku żadnego z badanych narządów nie dostarczono bowiem tak dużej liczby danych, które świadczyłyby o pełnej autonomii obecnych na ich terenie oscylatorów komórkowych. Analizy elektroantennogramów (EAG, graficznego zapisu aktywności elektrofizjologicznej neuronów w antenulach, czyli czułkach) wykazały, że wrażliwość na różne substancje zapachowe np. kojarzone z pokarmem, zmienia się u *D. melanogaster* rytmicznie. Rytm ten jest zachowany u zwierząt trzy-

many w stałej ciemności, co z kolei wskazuje na jego endogenne charakter. W oparciu o wyniki analiz ekspresji genów i obecności białek zegara, oscylator generujący tę cykliczną wrażliwość zidentyfikowano w neuronach na terenie czułków. Wykonując liczne eksperymenty, z użyciem kilku linii owadów transgenicznych udowodniono, że opisany zegar działa całkowicie niezależnie od mózgu. Najbardziej spektakularne z nich objęły wytworzenie owadów bez funkcjonalnego zegara w neuronach lateralnych, którym następnie przywrócono sprawnie działający zegar tylko w czułkach. Na zapisie EAG takich owadów, można stwierdzić rytmiczne zmiany wrażliwości węchowej, co udowadnia, że oscylator molekularny w neuronach antenul

jest wystarczający do generowania tego rytmu. Przeprowadzono również analizy, które wykazały bezpośrednią wrażliwość zegara w czułkach na światło. Jest ona zależna od obecności w komórkach funkcjonalnego białka CRY, które poza udziałem w fototransdukcji sygnału do samego oscylatora, najprawdopodobniej jest integralną częścią jego mechanizmu. Wynik ten był pierwszym dowodem, który świadczył o różnicach struktury oscylatorów położonych w ośrodkowym układzie nerwowym i narządach peryferycznych.

Obecność białek zegara i ekspresję kodujących je genów opisano także w czułkach *M. sexta*. Szczegółowa analiza immunohistochemiczna tych narządów wykazała, że białko PER występuje we wszystkich neuronach wrażliwych na feromony, ale także innych komórkach: glejowych, nabłonkowych i podporowych (SCHUCKEL i współaut. 2007). U *Mamestra brassicae*, kolejnego przedstawi-

ciela Lepidoptera, obecność transkryptów *per* i *cry* odnotowano jedynie w neuronach węchowych. Bardziej szczegółowe badania zegara peryferycznego w czułkach wykonano u ćmy *Spodoptera littoralis*. Poza charakterystyką profilu ekspresji genów *per*, *cry1* i *cry2* w tych narządach, opisano także związane z nimi zmiany we wrażliwości owada na feromony płciowe (praca, w której opublikowano powyższe informacje, zawiera również przegląd literatury na temat zegara biologicznego w narządzie zmysłu powonienia owadów (MERLIN i współaut. 2007)). Wrażliwość na bodźce zapachowe ma ogromne znaczenie dla owadów. Dzięki niej odnajdują pokarm, komunikują się ze sobą i unikają drapieżników. Przypuszcza się, że dobowe zmiany zdolności do odbioru informacji przez narząd węchu determinują optymalne dla gatunku wzorce zachowań.

HISTORIA ODKRYCIA ZEGARA BIOLOGICZNEGO W UKŁADZIE WYDALNICZYM

Po raz pierwszy ekspresję *per* w głównych narządach wydalniczych owadów, czyli cewkach Malpighiego, opisano pod koniec lat 80. ubiegłego wieku u *D. melanogaster*. Z kolei pierwsze dane o rytmicznym charakterze tego procesu pojawiły się prawie 10 lat później, w krótkim doniesieniu opublikowanego na łamach „Nature” (GIEBULTOWICZ i HEGE 1997). Autorzy tej pracy wykazali, że w komórkach cewek u owadów pozbawionych zegara centralnego (dekapitowanych), trzymany w warunkach LD (dzień-noc) oraz w stałej ciemności, obserwuje się pełny dobowy cykl syntezy i translokacji do jądra komórkowego białek PER i TIM. Stwierdzili również, że rytm ten ulega szybkiej i pełnej synchronizacji do nowych warunków, gdy owady zostaną umieszczone w odwróconym fotoperiodzie. Autonomię działania oscylatora molekularnego w cewkach Malpighiego potwierdzono wkrótce w eksperymentach z wykorzystaniem owadów transgenicznych, u których ekspresja genów reporterowych (β -galaktozydazy i lucyferazy) była zależna od promotorów genów zegara biologicznego (*per-lacZ*, *per-luc* i *tim-luc*) (HEGE i współaut. 1997, GIEBULTOWICZ i współaut. 2000). Badania te objęły między innymi analizę ekspresji *per-luc* i *tim-luc* w hodowli organotypowej cewek, podczas której monitorowano dobową aktywność lucyferazy. Tygodniowe utrzymywanie się w takich warunkach ekspresji

genu reporterowego, która zależała od *per* i *tim*, świadczyło o autonomii oscylatora w badanych narządach. Niemniej nadal dyskutowano możliwość istnienia pamięci tego oscylatora, którą należało rozumieć jako zdolność do długotrwałego utrzymania rytmu ekspresji badanych genów, przy zachowaniu jego parametrów o wartościach identycznych lub zbliżonych do obserwowanych w organizmie owada, a więc przed rozpoczęciem hodowli narządów *in vitro*. Zgodnie z taką koncepcją, wpływ na rytm oscylatora cewek Malpighiego mogły mieć czynniki natury humoralnej, które zdeterminowały jego fazę, utrzymującą się poza organizmem przez kilka kolejnych dni, co stawiałoby pod znakiem zapytania jego pełną autonomię. Wątpliwości tego typu rozwiąły ostatecznie trudne metodycznie badania, podczas których przeszczepiano cewki Malpighiego między owadami dwóch grup dzikiego szczepu *D. melanogaster*, hodowanych w odwróconych fotoperiodach (GIEBULTOWICZ i współaut. 2000). Owady pierwszej grupy stanowiły „dawców” narządów, które wszczepiano do jamy ciała owadów drugiej grupy, czyli „biorców”. Grupa owadów „biorców” była następnie hodowana przez kilka dni w stałej ciemności, a ich własne oraz transplantowane cewki Malpighiego co kilka godzin analizowano metodami immunohistochemicznymi pod względem zawartości i lokalizacji komórkowej białek PER oraz TIM.

Eksperyment ten jednoznacznie wykazał, że fazy rytmów akumulacji i translokacji do jądra komórkowego obu białek są przesunięte o ok. 12 godzin w cewkach owadów „biorców” w stosunku do „dawców”. Należy zatem przyjąć, że profil rytmu oscylatora molekularnego w badanych narządach utrzymuje się niezależnie od środowiska, w którym one przebywają, wykluczając wpływ czynników natury humoralnej na cykl ekspresji poszczególnych genów zegarowych. Charakteryzując oscylator peryferyczny w cewkach Malpighiego, badacze zwrócili uwagę na jeszcze jeden fakt. Zauważyli duże podobieństwo dobowych profili ekspresji genów zegara w tych narządach oraz w neuronach tworzących centralny oscylator na terenie mózgu owada. Obserwacje te stały się podstawą hipotezy o podobieństwie, czy wręcz identycznej strukturze mechanizmu obu oscylatorów u *D. melanogaster*. Wkrótce okazało się, że koncepcja ta jest słuszna tylko w pewnym stopniu. Badania porównawcze obu oscylatorów wykazały bowiem ich wrażliwość na światło za sprawą białka CRY (IVANCHENKO i współaut. 2001). Stwierdzono, że zależna od CRY degradacja TIM jest tak samo upośledzona w cewkach Malpighiego, jak w neuronach lateralnych mózgu mutantów *cry^b*, u których białko CRY jest niefunkcjonalne. Bardziej szczegółowa analiza obydwu oscylatorów molekularnych odsłoniła jednak zasadnicze różnice ich budowy. W cewkach Malpighiego białko CRY pełni rolę czynnika niezbędnego do utrzymania rytmu zmian poziomu PER i TIM w warunkach stałej ciemności, czego nie stwierdzono w przypadku neuronów lateralnych. Dlatego też postuluje się, że CRY jest integralnym elementem mechanizmu ze-

gara molekularnego w cewkach, analogicznie jak w czułkach. Druga różnica dotyczy mechanizmu odbioru informacji o świetle przez oscylator w mózgu i w cewkach. Wykazano, że białko CRY najprawdopodobniej nie jest jedynym fotowrażliwym elementem oscylatora peryferycznego cewek, na co wskazuje wyraźny rytm zmian poziomu PER i TIM w tych narządach u mutantów *cry^b*, ale tylko, gdy są hodowane w warunkach LD. Do dziś nie wiadomo co pełni rolę tego dodatkowego fotoreceptora. Na pewno, inaczej niż w przypadku neuronów lateralnych mózgu, jego wrażliwość na światło nie jest zależna od aktywności fosfolipazy C (PLC), kodowanej przez gen *no receptor potential (norpA)*. Ustalono to na podstawie wyników badań porównawczych, wykonanych na podwójnych mutantach *norpA^{P41};cry^b* hodowanych w warunkach LD, u których poziom PER i TIM zmieniał się rytmicznie w cewkach, ale nie w neuronach lateralnych.

Przedstawione powyżej informacje na temat oscylatora peryferycznego w narządach wydalniczych *D. melanogaster* nie wystarczają do pełnego zrozumienia mechanizmu jego działania. Trudno je także uogólnić, bo dotychczas u żadnego innego gatunku owada oscylator ten nie był badany. Brak jest również jakichkolwiek informacji na temat jego roli fizjologicznej. Można się jednak spodziewać, że zagadnienie to wkrótce doczeka się szerszego opracowania, ze względu na coraz większe zainteresowanie problemem udziału zegara biologicznego w metabolizmie i detoksyfikacji ksenobiotyków, a w tym insektycydów u owadów. Cewki Malpighiego są bowiem obok ciała tłuszczowego głównym narządem, zaangażowanych w te procesy.

ZEGAR W PRZEWODZIE POKARMOWYM

Dotychczas bardzo niewiele uwagi poświęcono zegarowi biologicznemu w przewodzie pokarmowym owadów. Pierwsze wzmianki na ten temat pochodzą z zakrojonych na szeroką skalę badań, których celem była identyfikacja narządów z ekspresją *per* u dorosłych *D. melanogaster*, do której wykorzystano hybrydyzację *in situ* oraz owady transgeniczne z genem reporteryjnym β -galaktozydazy o ekspresji zależnej od *per* (LIU i współaut. 1988). Na tej podstawie ustalono, że wspomniany gen zegara jest aktywny transkrypcyjnie w komórkach

nabłonka przelyku, jelita środkowego oraz najbardziej dystalnego odcinka jelita tylnego, czyli *rectum*. W tym samym czasie inny zespół, za pomocą metody immunohistochemicznej, wykazał obecność białka PER w przewodzie pokarmowym *D. melanogaster* (SIWICKI i współaut. 1988). Ekspresję genów zegara opisano także w jelicie środkowym *Gryllus bimaculatus* (*per*, *tim*) i *Dianemobius nigrofasciatus* (*cyc*) oraz *B. mori* (*cyc*) (MARKOVA i współaut. 2003, SHAO i współaut. 2008, URYU i TOMIOKA 2010). Oczywiście samo stwierdzenie ekspresji genu, czy

obecności kodowanego przez niego białka nie jest niewystarczającym dowodem, uprawniającym do wyciągnięcia wniosku o aktywności oscylatora biologicznego w komórkach budujących narządy. Dlatego znacznym osiągnięciem było wykazanie, że co najmniej w *rectum* u *D. melanogaster* ekspresja *per* oraz *tim* jest rytmiczna i utrzymuje się podczas kilkudniowej hodowli organotypowej tego narządu (GIEBULTOWICZ i współaut. 2000). Analogicznie, jak ma to miejsce w przypadku cewek Malpighiego, w *rectum* aktywność transkrypcyjna obu genów jest zachowana *in vitro*, zarówno w warunkach LD, jak i w stałej ciemności, co świadczy o jego znacznej autonomii. Skrajnie innych dowodów na ten temat dostarczyły badania *A. pernyi* (SAUMAN i REPERT 1998). U młodych larw tego gatunku zaobserwowano wyraźny rytm akumula-

cji białka PER w jądrach komórek nabłonka wyściełającego jelito środkowe, który zanika po przerwaniu połączeń nerwowych między mózgiem a resztą ciała. Przykłady *D. melanogaster* i *A. pernyi* wskazują, że autonomia zegara peryferycznego w przewodzie pokarmowym owadów może być bardzo różna. Niemniej liczba danych na ten temat jest na tyle mała, że nie uprawniają one do wyciągnięcia bardziej uogólnionych wniosków, szczególnie że w każdym przypadku zastosowano zupełnie inne procedury badawcze, analizom poddano funkcjonalnie różne odcinki przewodu pokarmowego i co najistotniejsze, badano różne stadia rozwojowe owadów. Na wyjaśnienie oczekuje także rola fizjologiczna zegara obecnego w układzie pokarmowym tych zwierząt.

ZEGAR W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Po raz pierwszy zegar biologiczny w męskim układzie rozrodczym opisano u *Anagasta kuehniella*, a następnie potwierdzono jego obecność u innych przedstawicieli Lepidoptera (GIEBULTOWICZ 1999, 2001; GIEBULTOWICZ i BEBAS 2005). Badania, które doprowadziły do jego odkrycia miały zupełnie inny charakter niż w przypadku omówionych powyżej oscylatorów, bo opierały się o analizę zjawisk fizjologicznych, a nie procesów molekularnych. Dlatego zegar ten był charakteryzowany głównie z perspektywy pełnionej funkcji. Pierwszą i zarazem kluczową obserwacją było stwierdzenie, że u Lepidoptera plemniki są uwalniane z jąder do nasieniowodów w sposób rytmiczny. U wszystkich przebadanych pod tym względem gatunków, proces ten podzielony jest na dwa etapy. W godzinach wieczornych plemniki zaczynają opuszczać jądro (u Lepidoptera jest to pojedynczy narząd) i gromadzą się w pierwszym odcinku nasieniowodu (określanym mianem górnego nasieniowodu). Uwalnianie trwa przez pierwszą połowę nocy. Po zakończeniu tego etapu, plemniki pozostają w górnym nasieniowodzie aż do rana, kiedy rozpoczyna się drugi etap procesu, czyli ich transport do pęcherzyków nasiennych. Badając różne gatunki stwierdzono, że rytm uwalniania plemników ma endogenne podłoże, bo zachowany jest przez długi czas u samców hodowanych w stałej ciemności. Stwierdzono również, że jest on niemal natychmiast zaburzany, gdy owady zostaną umieszczone

w stałym świetle. Już pierwsze badania *A. kuehniella* dowiodły, że oscylator generujący omawiany rytm jest zlokalizowany poza ośrodkowym układem nerwowym, gdyż cykliczne uwalnianie plemników utrzymuje się w izolowanych odwłokach poczwarek. Zakrojone na znacznie większą skalę badania tego problemu przeprowadzono kilka lat później, używając jako gatunku modelowego *Lymantria dispar*. Hodując *in vitro* przez kilka dni części męskiego układu rozrodczego, zaangażowane w uwalnianie plemników (jądra wraz z górnymi nasieniowodami i pęcherzykami nasiennymi), dostarczono niezbitych dowodów na obecność oscylatora biologicznego właśnie w budujących je tkankach (GIEBULTOWICZ i współaut. 1989). Generował on rytm uwalniania plemników poza organizmem zarówno w warunkach LD, jak i stałej ciemności oraz reagował na zmianę fotoperiodu przesuując fazę tego rytmu. Obserwacje te dowiodły, że badany oscylator jest w pełni autonomiczny i niezależny od ośrodkowego układu nerwowego oraz czynników humoralnych. Z kolei badania prowadzone na hodowlach organotypowych męskich układów rozrodczych innego gatunku ćmy, *Spodoptera littoralis*, wykazały jego dużą wrażliwość na stałe światło, która objawia się zanikiem rytmu oraz silnym hamowaniem samego transferu plemników z jąder do nasieniowodów (BEBAS i współaut. 2001). Dalsza charakterystyka tego oscylatora objęła: (i) poszukiwania w układzie rozrodczym komórek,

na terenie których zachodzi ekspresja genów zegara biologicznego, (ii) analizę rytmicznych zmiany struktury komórkowej układu rozrodczego, od których zależy uwalnianie plemników oraz (iii) badanie skutków wynikających z zaburzenia funkcji tego oscylatora u owadów hodowanych w stałym świetle. Rytmiczną ekspresję genu *per* stwierdzono w jądrach oraz górnych nasieniowodach *Cydia pomonella* i *S. littoralis* (GVAKHARIA i współaut. 2000, KOTWICA i współaut. 2009). U drugiego z wymienionych gatunków obserwowano rytmiczne zmiany poziomu białka PER w somatycznych komórkach otaczających plemniki na terenie jądra (tzw. komórkach cyst plemnikowych), w nabłonkowej barierze, która oddziela światło gonady i nasieniowodów oraz w cylindrycznych komórkach jednowarstwowego nabłonka wyściełającego górny odcinek nasieniowodu (KOTWICA, dane niepublikowane). Wyciszając ekspresję *per* przy pomocy RNAi ustalono, że działanie oscylatora molekularnego w komórkach gonady jest warunkiem koniecznym do uwalniania plemników oraz rytmicznej produkcji co najmniej jednego z białek płynu nasiennego przez somatyczne komórki cyst plemnikowych (KOTWICA i współaut. 2010). Charakteryzowany oscylator ma również kluczowe znaczenie w reorganizacji cytoskieletu aktynowego różnych typów komórek w jądrze, co jest niezbędne dla samej inicjacji uwalniania plemników podczas każdego cyklu. Opisanie endogennego rytmu ekspresji *per* w nabłonku wyściełającym górny nasieniowód rozszerzyło spektrum badań, które miały na celu określenie wpływu zidentyfikowanego oscylatora peryferycznego na płodność samców. Jak się okazało, odpowia-

da on za cykliczną aktywność wydzielniczą tej tkanki, kształtując tym samym skład oraz właściwości chemiczne tworzącego się w górnym nasieniowodzie płynu nasiennego (GIEBULTOWICZ i BEBAS 2005). Obserwacje te stały się podstawą hipotezy tłumaczącej niską płodność samców hodowanych w stałym świetle. Zgodnie z nią, wystawienie owadów na ciągłe oświetlenie zaburza działanie oscylatora obecnego w ich układach rozrodczych, co ma destrukcyjny wpływ na dojrzewanie plemników. Dzieje się tak za sprawą braku skoordynowania dwóch procesów, gromadzenia plemników w nocy na terenie górnego nasieniowodu i wzrastającej w tym czasie aktywności sekrecyjnej nabłonka, który produkuje białka wiążące się z plemnikami.

Oscylator peryferyczny w męskim układzie rozrodczym opisano także u *D. melanogaster*. W oparciu o analizę ekspresji genów reporterowych zależnych od promotora *per* i *tim* oraz na podstawie występowania transkryptów *Clk*, zidentyfikowano go u podstawy jąder i na terenie pęcherzyków nasiennych (BEAVER i współaut. 2002). Autonomię tego oscylatora oraz jego wrażliwość na światło wykazano badając męski układ rozrodczy tego owada w hodowłach *in vitro*. Przedstawiono także dowody, które wskazują, że mutacje genów zegara biologicznego, wyrażające się zaburzeniem rytmu aktywności ruchowej owadów, mogą wpływać także na oscylator w ich układzie rozrodczym. Konsekwencją takiego stanu jest zmniejszona płodność mutantów, w porównaniu z dzikim szczeniem oraz z owadami, którym przywrócono funkcjonalny oscylator metodami genetycznymi.

OSCYLATORY U OWADÓW, O KTÓRYCH WIEMY NAJMNIJ

Zjawisko rytmicznego odkładania warstw nowotworzonej kutikuli opisano u karaczanów. Cykl ten zachowany jest w stałej ciemności w hodowli *in vitro* fragmentów nabłonka (epidermy) wydzielającego jej składniki, co wskazywało na kontrolę procesu przez endogenne zegar peryferyczny. Wykorzystując do badań *D. melanogaster* jako gatunek modelowy, ustalono, że oscylator generujący ten rytm znajduje się w komórkach epidermy i budują go te same elementy, co oscylator w ośrodkowym układzie nerwowym (ITO i współaut. 2008). Informacje, które uzyskano analizując rolę kryptochromu

we wrażliwości omawianego zegara na światło dowodzą, że pełni on faktycznie rolę fotoreceptora, ale nie jest składnikiem mechanizmu zegara molekularnego, jak ma to miejsce w cewkach Malpighiego i czułkach.

Niedawno opisany zegar w ciele tłuszczowym *D. melanogaster* okazał się pełnić zasadniczą rolę w regulacji metabolizmu tego narządu, jak również wpływać na rytm pobierania pokarmu, ilość zjedanego pożywienia oraz wrażliwość owadów na głódzenie (XU i współaut. 2008). Badania dotyczące mechanizmu samego oscylatora molekularnego w komórkach ciała tłuszczowego wskazują na jego

podobieństwo do oscylatora obecnego w mózgu. Ciekawe są dowody wskazujące na prawdopodobną współpracę obu oscylatorów w utrzymaniu homeostazy metabolicznej organizmu. W sytuacji, gdy zaburzenie funkcji zegara w ciele tłuszczowym objawia się spadkiem produkcji glikogenu w budujących go komórkach oraz zwiększa wrażliwość na głodzenie, owady z niefunkcyjnym zegarem w mózgu wykazują przeciwstawny fenotyp. Nadal nieznanne pozostają jednak mechanizmy leżące u podstaw komunikowania się obu zegarów.

Samice *D. melanogaster* składają jaja w ściśle określonej porze dnia, o zmierzchu, a proces ten jest kontrolowany przez endogenne zegary biologiczne (HOWLADER i SHARMA 2006). Nie wiadomo jednak, w którym narządzie zegar ten jest zlokalizowany. Podczas jego poszukiwań duże nadzieje pokładano w badaniach samych jajników. Było to uzasadnione licznymi doniesieniami wskazującymi na wysoki poziom ekspresji genów oraz obecność białek zegara w komórkach foliularnych otaczających dojrzewający oocyt i połączone z nim komórki siostrzane. Jednak w odróżnieniu od innych narządów, na terenie których identyfikowano zegary peryferyczne, jajniki wykazują cechę szczególną – dotychczas nie wykazano, aby ekspresja któregośkolwiek z genów zegara i synteza kodowanych przez nie białek miała charakter rytmiczny. W komórkach foliularnych białka PER i TIM obserwowano permanentnie w cytoplazmie i o żadnej porze doby nie stwierdzano ich translokacji do jąder komórkowych. Obserwacje te wraz z danymi o braku ekspresji *cry* w jajnikach wskazują, że białka zegara nie pełnią roli elementów oscylatora molekularnego w tych narządach, a określenie ich znaczenia wymaga dalszych badań.

Podsumowując rozważania nad zegarami biologicznymi u owadów można jednoznacz-

nie stwierdzić, że nasza wiedza na ich temat jest bardzo fragmentaryczna. Są one badane pod kątem zrozumienia mechanizmów molekularnych tylko jednego z budujących je elementów, czyli oscylatora, a relatywnie mało uwagi poświęca się analizie roli, jaką pełnią w organizmie. Niewiele też wiadomo o ich wzajemnych powiązaniach w regulacji procesów warunkujących utrzymanie homeostazy. Z kolei, zapoznając się z literaturą dotyczącą zegarów peryferycznych, można odnieść wrażenie, że badania są ukierunkowane przede wszystkim na określenie poziomu autonomii tych zegarów. Powodem takiego stanu wiedzy jest w dużym stopniu dobór obiektów badawczych. *Drosophila melanogaster*, jako organizm modelowy, idealny do analizy procesów molekularnych, jest bardzo niewdzięczny do badań zjawisk fizjologicznych (ze względu na swe rozmiary oraz relatywnie dużą specyficzność gatunkową wielu procesów). Pewne nadzieje budzą prowadzone (lub ukończone) prace, których celem jest poznanie genomów innych gatunków owadów. Zdobyta dzięki nim wiedza niewątpliwie przyspieszy realizację projektów zmierzających do rozszyfrowywania mechanizmów zegarów tych gatunków. Pozwoli także ukierunkować badania na drogę, która doprowadzi do zrozumienia sensu biologicznego systemu wielozegarowego u owadów, jako sieci wzajemnie współpracujących ze sobą elementów.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję mgr. Marcinowi Chrzanowskiemu i dr Joannie Kotwicy za uwagi, które ułatwiły mi przygotowanie manuskryptu niniejszej pracy. Przygotowanie pracy zostało sfinansowane ze środków MNiSzW przyznanych na realizację projektu Nr N N303 342235.

BIOLOGICAL CLOCKWORK MECHANISMS IN INSECTS – HOW MANY CLOCKS TICK IN THEIR BODIES?

Summary

Insects display a rich variety of circadian behavioral rhythms. Many cellular and molecular processes also vary as a function of time of day. All these rhythms appear to be controlled by a common clock mechanism, which consists of molecular feedback loops that involve several clock genes and their proteins. The roles of many clock genes have been well established in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*; and their orthologs have been found in other insects. Clock genes are expressed in the central nerv-

ous system and clock-positive neurons regulate behavioral rhythms in insects. In addition, clock genes are widely expressed in peripheral tissues implying that they perform important physiological functions. In this paper, the recent progress in the understanding of the biological clock mechanism and its functions in insect life are reviewed. How our knowledge about circadian systems of insects has developed during the past decade is also discussed.

LITERATURA

- ALLADA R., CHUNG B. Y., 2010. *Circadian organization of behavior and physiology in Drosophila*. Annu. Rev. Physiol. 72, 605-24.
- BEAVER L. M., GVAKHARIA B. O., VOLLINTINE T. S., HEGE D. M., STANEWSKY R., GIEBULTOWICZ J. M., 2002. *Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2134-2139.
- BEBAS P., CYMBOROWSKI B., GIEBULTOWICZ J. M., 2001. *Circadian rhythm of sperm release in males of the cotton leafworm Spodoptera littoralis: in vivo and vitro studies*. J. Insect Physiol. 47, 859-866.
- BLOCH G., 2010. *The social clock of the honeybee*. J. Biol. Rhythms 25, 307-317.
- CUNINKOVA L., BROWN S. A., 2008. *Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools*. Ann. NY Acad. Sci. 1129, 358-370.
- DIBNER C., SCHIBLER U., ALBRECHT U., 2010. *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. Annu. Rev. Physiol. 72, 517-549.
- GIEBULTOWICZ J. M., 1999. *Insect circadian rhythms: Is it all in their heads?* J. Insect Physiol. 45, 791-800.
- GIEBULTOWICZ J. M., 2001. *Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 356, 1791-1799.
- GIEBULTOWICZ J. M., BEBAS P., 2005. *Functions of biological clocks in insect physiology and reproduction: Practical aspects*. Pesticidy/Pesticides 4, 77-90.
- GIEBULTOWICZ J. M., HEGE D. M., 1997. *Circadian clock in Malpighian tubules*. Nature 386, 664.
- GIEBULTOWICZ J. M., RIEMANN J. G., RAINA A. K., RIDGWAY R. L., 1989. *Circadian system controlling release of sperm in the insect testes*. Science 245, 1098-1100.
- GIEBULTOWICZ J. M., STANEWSKY R., HALL J. C., HEGE D. M., 2000. *Transplanted Drosophila excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host*. Curr. Biol. 10, 107-110.
- GVAKHARIA B. O., KILGORE J. A., BEBAS P., GIEBULTOWICZ J. M., 2000. *Temporal and spatial expression of the period gene in the reproductive system of the codling moth*. J. Biol. Rhythms 15, 27-35.
- HEGE D. M., STANEWSKY R., HALL J. C., GIEBULTOWICZ J. M., 1997. *Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated Drosophila: evidence for a brain-independent circadian clock*. J. Biol. Rhythms 12, 300-308.
- HOMBERG U., REISCHIG T., STENGL M., 2003. *Neural organization of the circadian system of the cockroach Leucophaea maderae*. Chronobiol. Int. 20, 577-591.
- HOWLADER G., SHARMA V. K., 2006. *Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 52, 779-785.
- ITO C., GOTO S. G., SHIGA S., TOMIOKA K., NUMATA H., 2008. *Peripheral circadian clock for the cuticle deposition rhythm in Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8446-8451.
- IVANCHENKO M., STANEWSKY R., GIEBULTOWICZ J. M., 2001. *Circadian photoreception in Drosophila: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks*. J. Biol. Rhythms 16, 205-215.
- KOTWICA J., BEBAS P., GVAKHARIA B. O., GIEBULTOWICZ J. M., 2009. *RNA interference of the period gene affects the rhythm of sperm release in moths*. J. Biol. Rhythms 24, 25-34.
- KOTWICA J., JOACHIMIAK E., POLANSKA M. A., GIEBULTOWICZ J. M., BEBAS P., 2010. *Diurnal rhythm in expression and release of yolk protein in the testis of Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae)*. Insect Biochem. Mol. Biol., w druku.
- KRISHNAN P., DRYER S. E., HARDIN P. E., 2005. *Measuring circadian rhythms in olfaction using electroantennograms*. Methods Enzymol. 393, 495-508.
- KUHLMAN S. J., MACKAY S. R., DUFFY J. F., 2007. *Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 1-6.
- LIU X., LORENZ L., YU Q., HALL J. C., ROSBASH M., 1988. *Spatial and temporal expression of the period gene in Drosophila melanogaster*. Genes Dev. 2, 228-238.
- MARKOVA E. P., UEDA H., SAKAMOTO K., OISHI K., SHIMADA T., TAKEDA M., 2003. *Cloning of Cyc (Bmal1) homolog in Bombyx mori: structural analysis and tissue specific distributions*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 134, 535-542.
- MERLIN C., LUCAS P., ROCHAT D., FRANCOIS M. C., MAIBECHE-COISNE M., JACQUIN-JOLY E., 2007. *An antennal circadian clock and circadian rhythms in peripheral pheromone reception in the moth Spodoptera littoralis*. J. Biol. Rhythms 22, 502-514.
- NITABACH M. N., TAGHERT P. H., 2008. *Organization of the Drosophila circadian control circuit*. Curr. Biol. 18, R84-93.
- REPPERT S. M., 2007. *The ancestral circadian clock of monarch butterflies: role in time-compensated sun compass orientation*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 113-118.
- ROSBASH M., BRADLEY S., KADENER S., LI Y., LUO W., MENET J. S., NAGOSHI E., PALM K., SCHOER R., SHANG Y., TANG C. H., 2007. *Transcriptional feedback and definition of the circadian pacemaker in Drosophila and animals*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 75-83.
- SANDRELLI F., COSTA R., KYRIACOU C. P., ROSATO E., 2008. *Comparative analysis of circadian clock genes in insects*. Insect Mol. Biol. 17, 447-463.
- SAUMAN I., REPPERT S. M., 1998. *Brain control of embryonic circadian rhythms in the silkworm Antheraea pernyi*. Neuron 20, 741-748.
- SCHUCKEL J., SIWICKI K. K., STENGL M., 2007. *Putative circadian pacemaker cells in the antenna of the hawkmoth Manduca sexta*. Cell Tissue Res. 330, 271-278.
- SHAO Q. M., BEMBENEK J., TRANG LE T. D., HIRAGAKI S., TAKEDA M., 2008. *Molecular structure, expression patterns, and localization of the circadian transcription modulator CYCLE in the cricket, Dianemobius nigrofasciatus*. J. Insect Physiol. 54, 403-413.
- SIWICKI K. K., EASTMAN C., PETERSEN G., ROSBASH M., HALL J. C., 1988. *Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system*. Neuron 1, 141-150.
- STANEWSKY R., 2003. *Genetic analysis of the circadian system in Drosophila melanogaster and mammals*. J. Neurobiol. 54, 111-147.
- TAMAI T. K., VARDHANABHUTI V., ARTHUR S., FOULKES N. S., WHITMORE D., 2003. *Flies and fish: birds of a feather*. J. Neuroendocrinol. 15, 344-349.
- TOMIOKA K., ABDELSALAM S., 2004. *Circadian organization in hemimetabolous insects*. Zool. Sci. 21, 1153-1162.

- URYU O., TOMIOKA K., 2010. *Circadian oscillations outside the optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus**. J. Insect Physiol. 56, 1284-1290.
- VAFOPOULOU X., TERRY K. L., STEEL C. G., 2010. *The circadian timing system in the brain of the fifth larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera)*. J. Comp. Neurol. 518, 1264-1282.
- VANSTEENSEL M. J., MICHEL S., MEIJER J. H., 2008. *Organization of cell and tissue circadian pacemakers: a comparison among species*. Brain. Res. Rev. 58, 18-47.
- WISE S., DAVIS N. T., TYNDALE E., NOVERAL J., FOLWELL M. G., BEDIAN V., EMERY I. F., SIWICKI K. K., 2002. *Neuroanatomical studies of period gene expression in the hawkmoth, *Manduca sexta**. J. Comp. Neurol. 447, 366-380.
- XU K., ZHENG X., SEHGAL A., 2008. *Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila**. Cell Metab. 8, 289-300.
- YUAN Q., METTERVILLE D., BRISCOE A. D., REPERT S. M., 2007. *Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks*. Mol. Biol. Evol. 24, 948-955.
- ZHANG E. E., KAY S. A., 2010. *Clocks not winding down: unravelling circadian networks*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 764-776.