

WOJCIECH DANIEL KRZEPTOWSKI

*Uniwersytet Jagielloński
Instytut Zoologii
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: wojciech.krzeptowski@uj.edu.pl*

MOLEKULARNY MECHANIZM ZEGARA OKOŁODOBOWEGO, CZYLI JAK ORGANIZMY MIERZĄ CZAS

WSTĘP

Już od starożytności pomiar czasu był istotnym elementem życia w wielu kulturach archaicznych, gdyż wiedza taka pozwalała przewidywać wiele zjawisk zachodzących w otaczającym świecie, a co za tym idzie, odpowiednio przystosować aktywność życiową i przede wszystkim gospodarczą. Początkowo miara czasu oparta była jedynie na podstawie obserwacji przyrody, w tym roślin i zwierząt, ponieważ zdolność pomiaru czasu jest cechą wrodzoną większości organizmów, wykształconą na drodze milionów lat ewolucji. Zjawisko to jest odpowiedzią na regularnie zmieniające się warunki panujące na Ziemi, co jest związane z ruchem obiegowym i obrotowym naszej planety, powodującym występowanie pór roku oraz cyklu dnia i nocy. Z czasem informacje na temat cyklicznych zmian obserwowanych w świecie istot żywych stały się fundamentem chronobiologii, dziedziny naukowej zajmującej się badaniem rytmów biologicznych. Jednymi z lepiej zbadanych rytmów są rytmy okołodobowe, których długość trwania jednego cyklu (okres) wynosi około 24 godzin, i które zostały szerzej opisane w niniejszym artykule.

Rytmy okołodobowe (cirkadiane) zostały opisane pierwszy raz już w XVIII w., kiedy to francuski badacz Jean Jacques d'Ortous de Mairan zaobserwował, iż dobowy rytm ruchów liści mimozy utrzymywał się także w warunkach stałej ciemności. Wraz z upływem lat badacze odkrywali kolejne przykłady rytmów okołodobowych: rytmiczne zmia-

ny w pigmentacji skorupiaka *Hippolyte varians* czy też rytm aktywności lokomotorycznej u szczura. Naukowcy zdawali sobie sprawę z roli cyklicznie występujących bodźców środowiskowych w inicjowaniu tego typu zmian, natomiast nie potrafili wytłumaczyć w jaki sposób są one generowane w przypadku braku czynników zewnętrznych, np. w warunkach stałej ciemności, temperatury i wilgotności. Przez długi czas dominowała hipoteza nieznanego „czynnika X”, który byłby odpowiedzialny za regulację obserwowanych zmian. Teoria ta jednak straciła swoje znaczenie w latach 60. XX w., kiedy stało się jasne, że rytmy te są wynikiem działania endogenego oscylatora (DAAN 2010).

Cechą charakterystyczną rytmów okołodobowych jest właśnie fakt, iż utrzymują się one w stałych warunkach środowiska (bez stymulacji zewnętrznej), a długość ich okresu wynosi około 24 godzin. Taki endogeny rytm nazwany został rytmem wolno bieżącym (ang. free-running rhythm), inaczej dryfującym. Wspomniane rytmy są jednak stale synchronizowane względem zmian otaczającego środowiska przez tak zwanych dawców czasu (niem. Zeitgebers), z których najważniejszym (i najczęściej badanym), w większości przypadków, jest światło. Istotnym jest fakt, iż czynniki zewnętrzne mogą wpływać na fazę cyklu (przyspieszając go bądź spowalniając), jednak długość okresu jest względnie stała w szerokim zakresie zmian temperatury. Zjawisko to zostało nazwane

kompensacją temperaturową (ang. temperature compensation) (ALLADA i CHUNG 2010). Głównym elementem zegara okołodobowego jest oscylator generujący rytmy, który dzięki obecności dróg wejściowych (ang. input pathway) może być synchronizowany względem dawców czasu, a dzięki istnieniu dróg wyjściowych (ang. output pathway) może regulować behavior oraz różne procesy metaboliczne i fizjologiczne w organizmie (YU i HARDIN 2006).

Pierwsze rytmy, będące wynikiem zmian warunków środowiskowych w ciągu doby, powstały prawdopodobnie już w prekambrze. Brak warstwy ozonowej w tym okre-

sie sprawił, iż organizmy musiały chronić się przed szkodliwym wpływem promieniowania UV i były aktywne w ciągu nocy (CYMBOROWSKI 2000). Konsekwencją tego jest fakt, iż molekularny mechanizm regulujący rytmy okołodobowe jest podobny u różnych organizmów. Opiera się on na systemie zachodzących na siebie pętli sprzężenia zwrotnego czynników hamujących i aktywujących transkrypcję genów zegara.

Prezentowany artykuł jest próbą porównania mechanizmów molekularnego zegara występującego u różnych zwierząt modelowych.

ZEGAR *Synechococcus elongatus*

Sprawne działanie mechanizmu zegara okołodobowego jest niezmiennie istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmów, o czym może świadczyć fakt, iż rytmy okołodobowe odkryto już u tak prostych organizmów, jakimi są jednokomórkowe, prokariotyczne sinice. Rytmy te wykryto w procesie przyswajania wolnego azotu z powietrza, a także w zmianach intensywności fotosyntezy oraz oddychania. Okres tych rytmów wynosi około 24 godzin, a rytm jest generowany endogennie, co wykazały eksperymenty w warunkach stałego oświetlenia. Ponadto, rytm ten także podlega kompensacji temperaturowej, a więc posiada wszystkie cechy rytmów okołodobowych. Rytmy okołodobowe u sinic są synchronizowane do warunków zewnętrznych przede wszystkim poprzez światło, ale także temperaturę, pH wody czy też stężenie jonów w środowisku. Liczne badania wykazały, iż wspomniane rytmy nie są następstwem podziałów komórki, a co więcej, to właśnie mechanizm sterujący cyklem komórkowym wydaje się być zależny od zegara okołodobowego (GOLDEN i współaut. 1997).

Badania nad molekularnym mechanizmem rytmów okołodobowych u organizmów prokariotycznych rozpoczęły się wraz z odkryciem mutantów zegara u sinicy z rodzaju *Synechococcus* (KONDO i współaut. 1994). Następnie ustalono, iż za regulację rytmów okołodobowych odpowiedzialna jest grupa trzech genów: *kaiA*, *kaiB* oraz *kaiC* („kai” od japońskiego „cykl”). Tworzą one wspólny klastrowy z dwoma sekwencjami promotorowymi: jedna sekwencja dla genu *kaiA*, druga dla genów *kaiB* i *kaiC*. Ilość transkryptów mRNA zmienia się rytmicznie w ciągu doby, także

w warunkach stałego światła, a same geny uważa się obecnie za główne geny zegara organizmu modelowego jakim jest *Synechococcus elongatus* (ISHIURA i współaut. 1998). Podobnie jak ilość mRNA, tak i ilość białka KaiB oraz KaiC, kodowanych na matrycy genów o tej samej nazwie, zmienia się w ciągu doby, natomiast ilość białka KaiA jest względnie stała (XU i współaut. 2000).

Badania z użyciem mutantów oraz osobników z nadekspresją genów *kai* wykazały, że geny te działają w pętli sprzężeń zwrotnych. Produkt genu *kaiA* działa jako aktywator genów *kaiB/C*, z kolei produkt genu *kaiC* wpływa hamująco na ekspresję *kaiB/C* (ISHIURA i współaut. 1998). Jednakże regulacja molekularnego zegara na poziomie transkrypcji genów ma mniejsze znaczenie dla generowania rytmów w komórce sinicy, natomiast główną rolę odgrywają modyfikacje potranslacyjne już zsyntetyzowanych białek zegara. W centrum całego systemu znajduje się białko KaiC, które posiada właściwości zarówno autokinazy, jak i autofosfatazy. Dzięki tym właściwościom stopień ufosforylowania wspomnianego białka może zmieniać się rytmicznie w ciągu doby, a cały proces jest sterowany przez dwa pozostałe białka grupy Kai. KaiA powoduje zwiększenie fosforylacji KaiC, a białko KaiB wywołuje efekt odwrotny (NAKAJIMA i współaut. 2005). Rankiem do białka KaiC przyłącza się białko KaiA powodując jego stopniową fosforylację w ciągu dnia. Pod koniec dnia KaiC osiąga stan hiperfosforylacji, zmienia swoją konformację i jednocześnie zwiększa się jego powinowactwo do białka KaiB, które powoduje z kolei stopniową defosforylację KaiC w ciągu nocy.

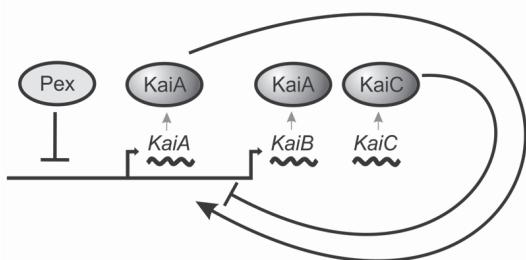
Wraz z nastaniem świtu cały cykl rozpoczyna się na nowo (GOLDEN i współaut. 2007).

Opisany mechanizm cyklicznej fosforylacji białka KaiC działa także w warunkach *in vitro*, jednakże w komórce cały system jest synchronizowany z zewnętrznymi warunkami środowiska. Jednym z głównych „dawców czasu” w przypadku sinic, podobnie jak u większości organizmów, jest światło. Działa ono jednak pośrednio poprzez zmiany potencjału redoks w komórce, co jest wynikiem zmian w intensywności fotosyntezy w ciągu doby. Zmiany w intensywności fotosyntezy powodują zmiany ilości plastochinonu w komórce, a te są rozpoznawane przez białko circadian input kinase A (CikA) oraz białko light dependent period A (LdpA). CikA powoduje zmiany w fosforylacji biał-

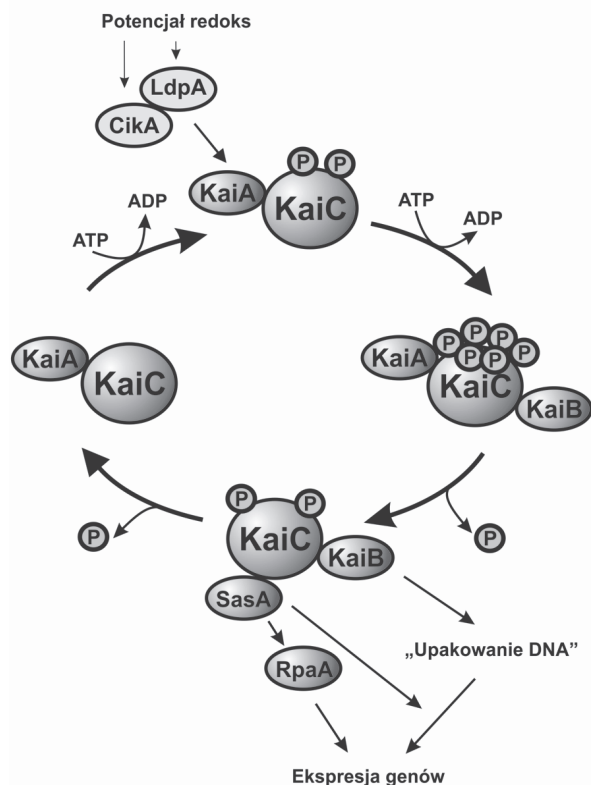
ka KaiC (IVLEVA i współaut. 2005, 2006). Za synchronizację oscylatora do warunków środowiskowych odpowiada także białko period extender (Pex), które dzięki obecności domeny wiążącej DNA, jest odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genu *kaiA* (KUROSAWA i współaut. 2009).

Ciekawy jest szlak wyjściowy okołodobowego systemu zegarowego, ponieważ jego białka wpływają na ekspresję większości genów u *Synechococcus elongatus*, w tym na ekspresję samych genów zegara, powodując występowanie pętli sprzężenia zwrotnego. Ekspresja genów jest regulowana nie tylko bezpośrednio poprzez białka oscylatora oraz czynniki transkrypcyjne takie jak SasA, RpaA, ale u organizmów tych zmienia się też sposób kondensacji materiału genetycznego w nukleoidzie. Różnice w „upakowaniu DNA” mają wpływ na sposób działania wspomnianych czynników transkrypcyjnych, a co za tym idzie stanowią dodatkowy element regulujący szlak wyprowadzający sygnał zegara okołodobowego. Wyniki badań dotyczące molekularnego zegara u sinic pozwoliły na

A.



B.



Ryc. 1. Schemat działania molekularnego zegara *Synechococcus elongatus*.

1A. Schemat regulacji transkrypcji genów z grupy *kai*.

Białko Kai A pełni rolę aktywatora genów *kaiA/C*. Białko KaiC hamuje zwrotnie ekspresję genów *kaiB/C*. Ekspresja genu *kaiA* znajduje się pod kontrolą białka Pex, które stanowi element ścieżki wejściowej oscylatora synchronizującej zegar z zewnętrznymi warunkami środowiska.

1B. Schemat molekularnego mechanizmu zegara *Synechococcus elongatus*.

Dobowe zmiany w aktywności białka KaiC (głównego białka oscylatora) zależą od stopnia jego ufosforylowania (reszty kwasu ortofosforowego oznaczono literą P), co jest z kolei regulowane poprzez białko KaiA oraz KaiB. Przedstawiony mechanizm modyfikacji potranslacyjnych wiąże się z regulacją ekspresji genów *kai* na poziomie transkrypcji (patrz rycina 1A) a ich współdziałanie warunkuje prawidłowe działanie molekularnego mechanizmu zegara. Oscylator jest synchronizowany z zewnętrznymi warunkami środowiskowymi za pomocą białek LdpA i CikA, rozpoznających zmiany potencjału redoks w komórce. Zegar reguluje szereg ścieżek metabolicznych w komórce, poprzez modyfikacje struktury DNA oraz poprzez białka o charakterze czynników transkrypcyjnych takich jak SasA i RpaA.

opracowanie modelu tzw. oscylloиду, zakładającego, iż globalna regulacja ekspresji genów jest zależna od kondensacji DNA nukleoidu, co z kolei jest kontrolowane przez oscylator

KaiABC (SMITH i WILLIAMS 2006, WOELFLE i współaut. 2007).

Schemat działania molekularnego mechanizmu zegara *Synechococcus elongatus* został przedstawiony na Ryc. 1.

ZEGAR *Arabidopsis thaliana*

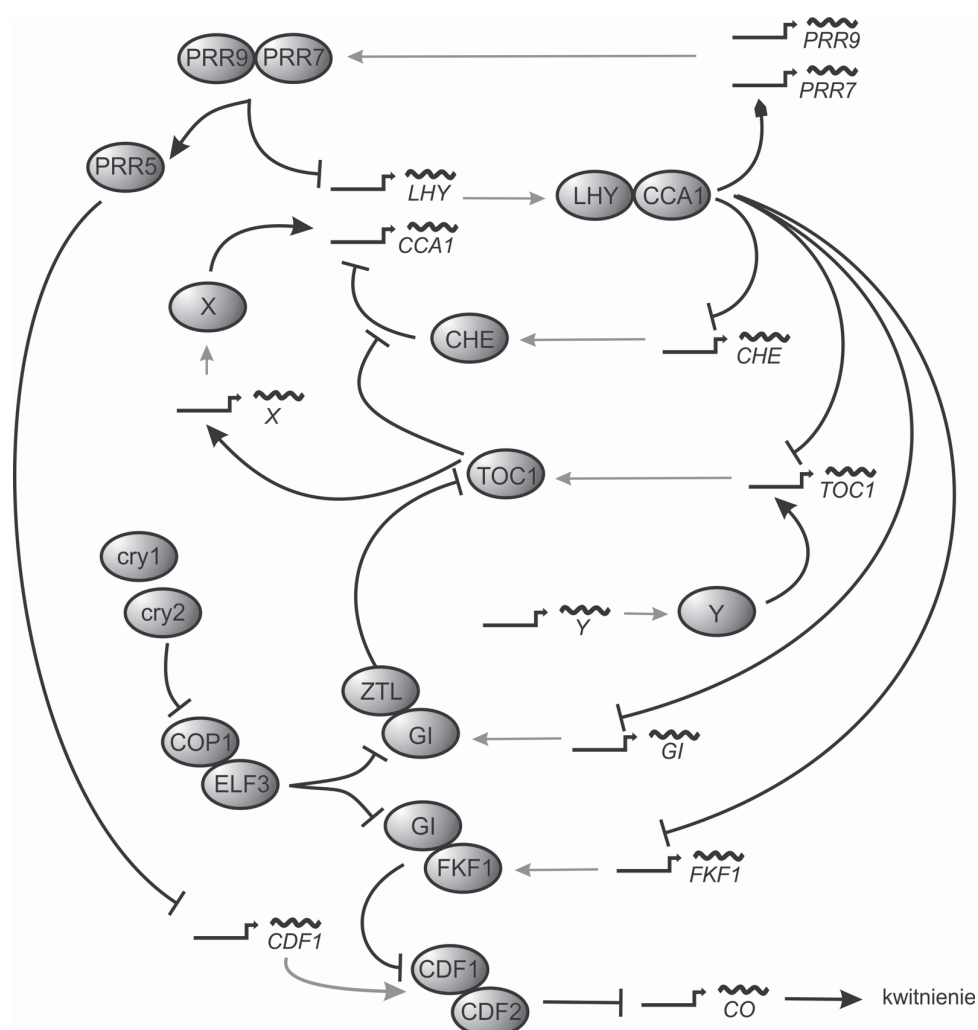
Do czasu odkrycia rytmów okołodobowych u sinic uważano, że rytmy te są charakterystyczne tylko dla organizmów eukariotycznych, u których cały system zegara jest bardziej skomplikowany niż u Prokaryota, jednakże badania organizmów modelowych takich jak rzodkiewnik *Arabidopsis thaliana*, grzyb pleśniowy z rodzaju *Neurospora*, *Drosophila melanogaster* czy też mysz, znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat molekularnego mechanizmu zegara okołodobowego, przyczyniając się do lepszego zrozumienia mechanizmów sterującymi różnymi procesami u ludzi.

Jak już wspomniano, rytmy okołodobowe zostały po raz pierwszy opisane u roślin wyższych około trzysta lat temu. Liczne badania pozwoliły stwierdzić, iż zegar okołodobowy reguluje takie procesy jak fotosynteza, ruchy liści czy też czas kwitnienia (LOCKE i współaut. 2005). Zegar ten pozwala roślinom koordynować rozwój oraz różne procesy metaboliczne względem warunków środowiskowych. Jest to szczególnie ważne w przypadku organizmów samożywnych, których procesy życiowe są tak ściśle związane z cyklem dnia i nocy. U *Arabidopsis thaliana* wykazano, że zaburzenia w funkcjonowaniu molekularnego mechanizmu zegara powodują obniżenie żywotności osobników, szczególnie w warunkach dnia krótkiego (GREEN i współaut. 2002).

Dokładne analizy oparte zarówno na badaniach biochemicznych i genetycznych oraz modelach matematycznych wykazały, iż molekularny mechanizm zegara u roślin składa się szeregu białek, które tworzą trzy pętle działające w układzie dodatniego i ujemnego sprzężenia zwrotnego. W skład pierwszej pętli, jednocześnie łączącej dwie pozostałe, wchodzi białko o charakterze czynników transkrypcyjnych takie jak circadian clock-associated 1 (CCA1) i late elongated hypocotyl (LHY) oraz białko timing cab expression 1 (TOC1). Wraz z nastaniem świtu białko TOC1 aktywuje transkrypcję genów *CCA1* i *LHY*, których produkty białkowe są następnie transportowane do jądra i tu wiążąc się

do sekwencji promotorowej genu *TOC1*, hamują jego ekspresję. Postępujące zmniejszanie się ilości mRNA oraz białka TOC1 w komórce powoduje stopniowe zahamowanie ekspresji białek CCA1 oraz LHY. Promotor genu *TOC1* przestaje być blokowany i cały cykl rozpoczyna się na nowo (ALABADI i współaut. 2001). Okazuje się, że pętla ta jest bardziej skomplikowana, gdyż białko TOC1 działa pośrednio poprzez aktywację tzw. komponentu X, który to powoduje nasilenie transkrypcji genów *CCA1* i *LHY*. Do tej pory jednakże nie zidentyfikowano białek wchodzących w skład wspomnianego komponentu X (LOCKE i współaut. 2005). Dodatkowo białko TOC1 wchodzi w interakcję z białkiem CCA1 hiking expedition (CHE), który jest czynnikiem transkrypcyjnym hamującym ekspresję genu *CCA1*. Zahamowanie aktywności białka CHE dzięki działaniu białka TOC1, powoduje tym samym aktywację ekspresji *CCA1*. Z kolei sam gen *CHE* jest hamowany zwrotnie poprzez białko CCA1 (PRUNEDA-PAZ i współaut. 2009). Drugą pętlę zegara budują białka CCA1 i LHY, pełniące w tej pętli rolę czynników aktywujących ekspresję genów *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 i 9* (*PRP7* i *PRP9*), których maksimum ekspresji przypada na godziny poranne. Z kolei kompleks białek PRP7-PRP9 zwrotnie hamuje ekspresję genów *CCA1* i *LHY* zamykając tym samym cykl (FARRÉ i współaut. 2005). Trzecia pętla opiera się na działaniu dwóch elementów. Jednym z nich jest białko TOC1, którego ekspresja jest aktywowana poprzez nieznaną do tej pory komponent Y, który z kolei jest hamowany zwrotnie poprzez białko TOC1. Przypuszcza się, że jednym z białek, które mogą pełnić rolę czynnika Y jest białko gigantea (GI), którego ekspresja jest cykliczna (LOCKE i współaut. 2005).

Ponieważ fotosynteza jest ściśle zależna od światła oczywistym jest fakt, iż to właśnie światło jest głównym czynnikiem kontrolującym różne ścieżki metaboliczne u roślin, w tym również molekularny mechanizm zegara. To dzięki obecności odpowiednich białek pełniących rolę fotoreceptorów komór-



Ryc. 2. Schemat działania molekularnego zegara *Arabidopsis thaliana*.

Białka oscylatora tworzą trzy pętle działające w systemie dodatniego i ujemnego sprzężenia zwrotnego, regulując ekspresję genów na matrycy których są kodowane. Dzięki obecności białek fotoreceptorowych oscylator jest synchronizowany względem rytmu światła i ciemności. Schemat przedstawia także udział molekularnego mechanizmu zegara w regulacji kwitnienia, który jest jednym z lepiej poznanych procesów znajdujących się pod kontrolą białek zegara. Dokładny opis schematu w tekście.

ka roślinna może być synchronizowana, za pomocą sygnałów świetlnych, do zewnętrznych warunków środowiska. U *Arabidopsis thaliana* wyróżnia się dwa podstawowe typy białek fotoreceptorowych. Pierwszą stanowią fitochromy PHYA, PHYB, PHYC, PHYD, PHYE, które są wrażliwe na światło czerwone. Zmiany poziomu transkryptów mRNA stwierdzono dla większości fitochromów. Sugeruje to ich rolę w synchronizacji zegara do zewnętrznych warunków środowiska, jednakże mechanizm ten jest jeszcze słabo poznany. Prawdopodobnie w skład ścieżki przekazu sygnału z fitochromów można zaliczyć czynnik transkrypcyjny PIF3, możliwe są także interakcje fitochromów z innym typem białek

fotoreceptorowych, kryptochromami CRY1 i CRY2 (MARTÍNEZ-GARCÍA i współaut. 2000, TÓTH i współaut. 2001). Zaliczane są one do drugiej grupy fotoreceptorów wrażliwych na światło niebieskie. W nocy, gdy kryptochrom jest nieaktywny, białko constitutive photomorphogenic 1 (COP1), będące ligazą ubiquitynową, oraz białko early flowering 3 (ELF3) ulegają akumulacji w jądrze komórkowym, gdzie wiążą się do białka GI. Białko COP1 znakuje białko GI, przyczyniając się do jego degradacji, natomiast białko ELF3 wydaje się pełnić rolę czynnika pomocniczego. Ponieważ pod wpływem działania światła CRY blokuje aktywność COP1, wobec tego białko GI nie jest degradowane. Białko GI

pełni z kolei istotną funkcję w synchronizacji molekularnego mechanizmu zegara, gdyż wraz z białkiem zeitlupe (ZTL) powoduje zależną od światła degradację białka TOC1 (YU i współaut. 2008).

Jak już wspomniano, zegar okołodobowy reguluje wiele procesów u roślin, szczególnie dobrze poznana jest jego rola w regulacji kwitnienia u *Arabidopsis*. Głównym białkiem zegara regulującym ten proces jest białko constans (CO). Ekspresja białka CO jest regulowana za pomocą czynników transkrypcyjnych cycling dof factor 1 oraz cycling dof factor 2 (CDF1 oraz CDF2), które działają pod kontrolą białek zegara i pełnią rolę inhibitorów ekspresji genu *CO*.

W ciągu dnia ekspresja białka CDF1 jest hamowana poprzez białka PRR7 i PRR9 (tworzące jedną z pętli sprzężenia zwrotnego molekularnego mechanizmu zegara) oraz pseudo response regulator 5 (PRR5), wobec czego jest produkowane białko CO. Ponadto światło indukuje powstawanie kompleksów białka GI oraz białka flavin-binding, kelch repeat, F-box 1 (FKF1), które są odpowiedzialne za degradację białek CDF1 i CDF2 (NAKAMICHI i współaut. 2007, SAWA i współaut. 2007).

Schemat działania molekularnego mechanizmu zegara *Arabidopsis thaliana* został przedstawiony na Ryc. 2.

MOLEKULARNY MECHANIZM ZEGARA *Neurospora crassa*

Jedne z pierwszych badań dotyczących molekularnej regulacji rytmów okołodobowych przeprowadzono na workowcu z gatunku *Neurospora crassa*. W 1971 r. wyizolowano trzy mutanty genu *frequency* (*frq*), u których zmieniał się okres okołodobowego rytmu wytwarzania konidiów, odkrytego około 10 lat wcześniej (FELDMAN i HOYLE 1973).

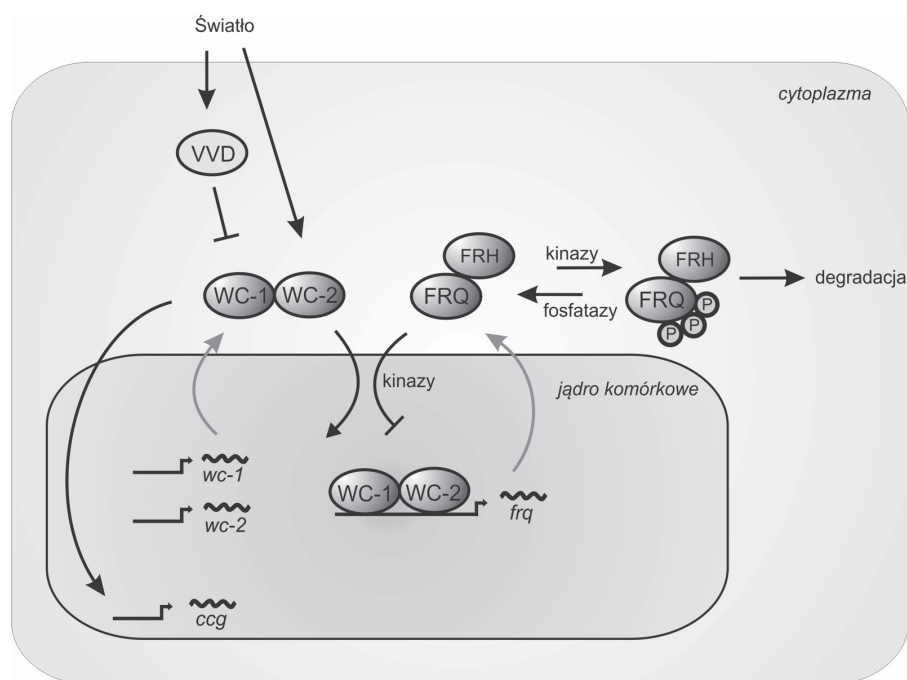
Obecnie u *Neurospora* wyróżnia się cztery główne białka będące rdzeniem molekularnego oscylatora w komórce: white collar 1 (WC-1) i white collar 2 (WC-2), frequency (FRQ) oraz *frq*-interacting RNA helikase (FRH). Białka WC-1 i WC-2 są czynnikami transkrypcyjnymi, które tworzą kompleks WCC pełniący rolę aktywatora w pętli sprzężenia zwrotnego. W warunkach stałej ciemności kompleks ten wiąże się rytmicznie do sekwencji promotorowej *frq* powodując aktywację transkrypcji tego genu. Z kolei białko FRQ pełni rolę czynnika hamującego swoją własną ekspresję (ARONSON i współaut. 1994, FROELICH i współaut. 2003). Białko to tworzy homodimer FRQ-FRQ, który dodatkowo łącząc się z białkiem FRH tworzy kompleks FFC. Kompleks ten jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje z kompleksem WWC powodując jego fosforylację, a co za tym idzie inaktywację. Zablockowanie działania kompleksu WWC jednocześnie hamuje transkrypcję genu *frq* i pętla sprzężenia zwrotnego się zamyka (CHENG i współaut. 2005, BAKER i współaut. 2009).

Obecnie postuluje się istnienie dodatkowego oscylatora, który działa bez udziału białka FRQ, jest to tzw. oscylator FLO (ang. FRQ-less oscillator). W przypadku zaburzeń

pracy oscylatora FRQ, cały mechanizm zegara okołodobowego nie działa poprawnie. Sugeruje to, iż dodatkowy oscylator nie reguluje wszystkich rytmów okołodobowych w komórce i może być on zależny od funkcjonowania głównego oscylatora. Słabo jest jednak poznana ścieżka łącząca oscylator FLO z oscylatorem FRQ/WWC (LI i LAKIN-THOMAS 2010).

Regulacja molekularnego mechanizmu zegara u *Neurospora crassa* na poziomie transkrypcji nie ogranicza się tylko do działania czynników transkrypcyjnych na sekwencje promotorowe poszczególnych genów. Najnowsze badania ujawniły, iż ekspresja genu *frq* może być modyfikowana bezpośrednio poprzez białko FRH, występujące w kompleksie FFC. Kompleks wpływa więc nie tylko na ekspresję *frq* poprzez blokowanie białek WC, ale także reguluje bezpośrednio ilość mRNA *frq* poprzez egzozom, kompleks białkowy zaangażowany w degradację RNA (GUO i współaut. 2009).

Ogromną rolę w regulacji oscylatora, podobnie jak u sinic, odgrywa fosforylacja i defosforylacja białek zegara. Kompleks WWC jest zlokalizowany przede wszystkim w jądrze komórkowym, a jego aktywność zależy od stopnia ufosforylowania białek tego kompleksu. Aktywną jest forma nisko ufosforylowana, natomiast forma wysoko fosforylowana traci zdolność wiązania się do nici DNA (SCHAFMEIER i współaut. 2008). Za fosforylację białek WWC odpowiada kilka kinaz między innymi CK-1a, CKII, PKA, PKC (FRANCHI i współaut. 2005, HE i współaut. 2006, HUANG i współaut. 2007). Podobnie samo



Ryc. 3. Schemat działania molekularnego zegara *Neurospora crassa*.

Białka WC-1 i WC-2 pełnią rolę czynników aktywujących ekspresję genu *frq*, białko FRQ z kolei dezaktywuje kompleks WC1/WC-1 tym samym hamując własną ekspresję. W regulację całego systemu zaangażowane są odpowiednie kinazy i fosfatazy, biorące udział w fosforylacji i defosforylacji białek zegara (reszty kwasu ortofosforowego oznaczono literą P). Kompleks WC-1-WC-2 pełni rolę czynnika transkrypcyjnego także dla innych genów będących pod kontrolą zegara. Cały mechanizm zegara jest synchronizowany względem zewnętrznych warunków oświetlenia poprzez białka VVD i WC-2. Dokładny opis w tekście.

nowo zsyntetyzowane białko FRQ ulega fosforylacji za pośrednictwem takich kinaz jak CK-1a, CKII, CAMK-1, PKA, PRD-4/chk-2. Antagonistami powodującymi defosforylację są fosfatazy PP1, PP2A oraz PP4. Fosforylacja białka FRQ jest niezwykle ważna, gdyż steruje ona procesem proteasomowej degradacji tego białka. Jednakże fosforylacja za pomocą różnych kinaz wywołuje różny efekt. Na przykład fosforylacja za pomocą CK-1a, CKII skutkuje degradacją białka FRQ, natomiast fosforylacja za pomocą PKA powoduje jego stabilizację (YANG i współaut. 2001, 2004; HE i współaut. 2003, 2006; PREGUEIRO i współaut. 2006; HUANG i współaut. 2007; CHA i współaut. 2008). Dodatkowo, fosforylacja kompleksu WWC oraz białka FRQ wpływa na ich transport do jądra komórkowego. Transport ten jest niezbędny w przypadku kompleksu WWC, ponieważ tylko wtedy może on oddziaływać z rejonami promotorowymi *frq*. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku białka FRQ, którego obecność w jądrze komórkowym jest niezbędna w prawidłowym generowaniu rytmicznej ekspresji

poszczególnych elementów molekularnego zegara (DIERNFELLNER i współaut. 2009).

U opisywanego gatunku zegar okołodobowy jest synchronizowany do warunków zewnętrznych głównie poprzez światło oraz temperaturę. Dotychczasowe badania wykazały, iż *Neurospora* jest organizmem wrażliwym na światło niebieskie i światło o długości fali bliskiej nadfioletowi. Jednym z głównych białek odbierających sygnały świetlne jest kompleks WWC, ten sam który jest częścią pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego molekularnego zegara. Możliwe jest to dzięki obecności flawiny, chromoforu dołączonego do domeny LOV (ang. light, oxygen, or voltage) białka WC-1. Innym białkiem posiadającym domenę LOV jest białko VIVID (VVD), które funkcjonuje w całym systemie zegara jako represor odpowiedzi stymulowanej przez światło. Badania genomu *Neurospora crassa* pozwoliły także na zidentyfikowanie genów fitochromów *phy-1* i *phy-2* kodujących białkowe fotoreceptory światła czerwonego, jednakże do tej pory nie odkryto procesów regulowanych przez światło o tej

długości fali. Inne białko *Neurospora* NOP-1 (opsyna), która jest receptorem światła zielonego, również nie wpływa na dobową ekspresję genów. U opisywanego gatunku odkryto także ortolog genu *cry*, którego białkowy produkt pełni główną rolę jako fotoreceptor zegara biologicznego u *Drosophila melanogaster*. CRY u *Neurospora* wydaje się jednak nie odgrywać znaczącej roli w synchronizacji zegara okołodobowego (CHEN i współaut. 2010, DUNLAP i LOROS 2006).

Uważa się, że zegar okołodobowy *Neurospora* kontroluje ekspresję około 180 genów, związanych głównie z metabolizmem, rozwojem, syntezą białek, ale także zaangażo-

wanych w odpowiedź na stres spowodowany działaniem światła. Maksimum ekspresji wspomnianych genów przypada pod koniec nocy. Regulacja ekspresji tych genów odbywa się prawdopodobnie za pomocą kompleksu WWC, który łączy się z sekwencjami promotorowymi poszczególnych genów. Nie wyklucza się także regulacji ekspresji genów kontrolowanych przez zegar (ang. *clock controlled genes*, *cgc*) poprzez działanie kompleksu FFC (VITALINI i współaut. 2006).

Schemat działania molekularnego mechanizmu zegara *Neurospora crassa* został przedstawiony na Ryc. 3.

ZEGAR *Drosophila melanogaster*

Badania nad elementami molekularnego mechanizmu zegara u zwierząt rozpoczęły się wraz z zidentyfikowaniem genu *period*, jako głównego genu zegara u *Drosophila melanogaster* (KONOPKA i BENZER 1971). To właśnie eksperymenty rozpoczęte na tym niepozornym owadzie udowodniły, że cały mechanizm jest podobny u wszystkich zwierząt i opiera się na działaniu kilku czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów zegara (DUNLAP 1999).

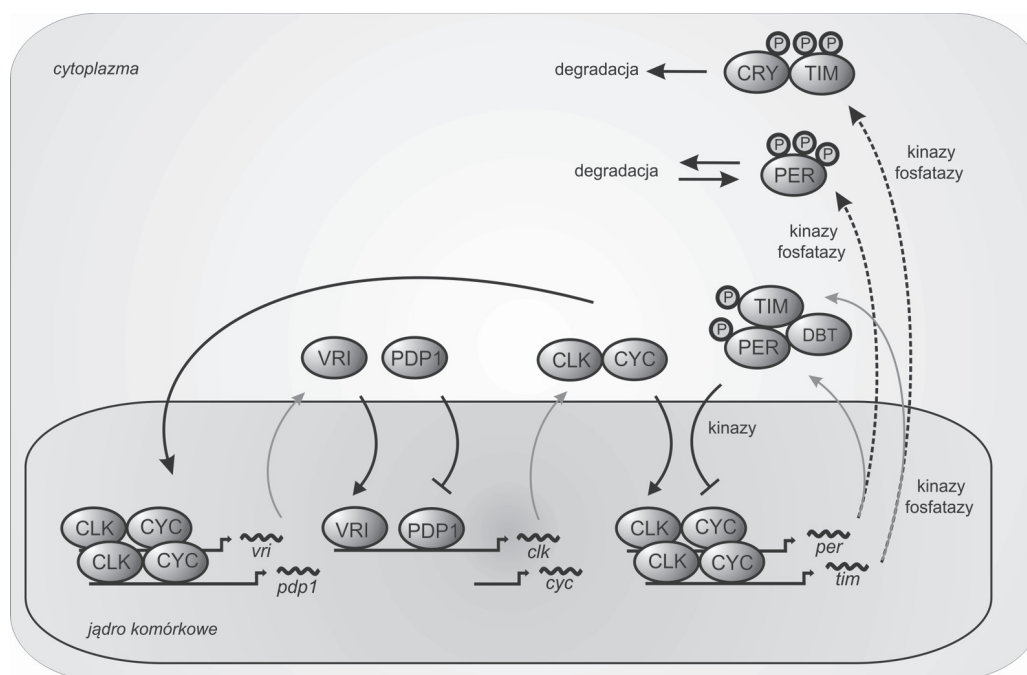
Centrum systemu zegara u *Drosophila melanogaster* stanowią dwa czynniki transkrypcyjne *clock* (CLK) i *cycle* (CYC), które tworzą heterodimer. Posiadają one domenę, która ma zdolność rozpoznawania odpowiedniej sekwencji DNA w rejonie promotorów określonych genów (TAYLOR i HARDIN 2008). Przyłączenie dimeru CLK-CYC do promotorów dwóch głównych genów zegara *period* (*per*) oraz *timeless* (*tim*), powoduje ich aktywację, co prowadzi do stopniowej akumulacji mRNA, a następnie produktów białkowych *period* (PER) i *timeless* (TIM) w cytoplazmie (HAO i współaut. 1997, RUTILLA i współaut. 1998, BAE i współaut. 2000, WANG i współaut. 2001). Z kolei białka PER i TIM wraz z kinazą *doubletime* (DBT) tworzą kompleks, który jest transportowany do jądra komórkowego, a następnie wiąże się z dimerem CLK-CYC inaktywując go (KIM i EDERY 2006).

Nowo zsyntetyzowane białko PER ulega degradacji w cytoplazmie i dopiero odpowiednia ilość białka TIM warunkuje powstanie heterodimerów PER-TIM, co chroni PER przed degradacją. Utworzenie kompleksu PER-TIM jest także niezbędne do transportu

tych białek do jądra komórkowego (SAEZ i YOUNG 1996). Najprawdopodobniej to właśnie czas niezbędny do zdeponowania odpowiedniej ilości TIM, jak i czas potrzebny do translokacji kompleksu PER-TIM do jądra komórkowego, jest odpowiedzialny za generowanie rytmów wolno biegnących o okresie okołodobowym (STANEWSKY 2002).

Za wspomniany proces aktywacji i dezaktywacji opisywanych białek odpowiada cykliczna fosforylacja i defosforylacja za pośrednictwem odpowiednich kinaz i fosfataz białkowych. Białko PER jest fosforylowane poprzez kinazę DBT (inaczej kinaza kazeinowa 1) (PRICE i współaut. 1998) oraz kinazę kazeinową 2 (CK2). Białko TIM jest fosforylowane poprzez kinazę *shaggy* [SGG, kinaza syntazy glikogenu 3β (GSK3β)] oraz poprzez CK2 (HARMS i współaut. 2003). Ufosforylowane PER i TIM są odpowiednio substratami dla fosfatazy białkowej 2A (PP2A) oraz fosfatazy białkowej 1 (PP1). Wymienione enzymy są niezbędne w regulacji rytmu, gdyż fosforylacja PER w stanie monomerycznym powoduje jego degradację, z kolei kinaza SGG powoduje fosforylację TIM, co jest sygnałem do translokacji kompleksu do jądra komórkowego (YU i HARDIN 2006). Oba procesy, jak już wspomniano, warunkują długość okresu rytmu w warunkach stałej ciemności.

Heterodimer CLK/CYC reguluje także drugą pętlę sprzężenia zwrotnego molekularnego mechanizmu zegara wpływając na ekspresję genów *Par domain protein 1* (*Pdp1*) oraz *vrille* (*vri*). Ich produkty białkowe powodują odpowiednio aktywację lub represję genu *Clk*. Funkcja opisanej pętli nie jest do końca jasna aczkolwiek mutanty genu *Pdp1*



Ryc. 4. Schemat działania molekularnego zegara *Drosophila melanogaster*.

Pętla głównego sprzężenia zwrotnego oscylatora regulowana jest poprzez ekspresję genów *per* i *tim*. Heterodimer CLK/CYC, łączy się sekwencją promotorową *per* oraz *tim* aktywując ich transkrypcję. Powstające białka PER i TIM są fosoryzowane przez odpowiednie kinazy (reszty kwasu ortofosforowego oznaczono literą P) lub defosorylowane przez fosfatazy. Białka PER i TIM tworzą heterodimer, który transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie hamuje ekspresję własnych genów, dzięki fosorylacji kompleksu CLK/CYC. Do odblokowania transkrypcji *per* i *tim* konieczna jest degradacja białek PER i TIM. Sygnałem do degradacji białek PER i TIM jest ich odpowiednia fosorylacja. Degradacja białka TIM jest zależna od aktywności białka CRY aktywowanego przez światło. Dodatkowa pętla sprzężenia zwrotnego molekularnego mechanizmu zegara związana jest z regulacją ekspresji białka CLK przez dwa białka – PDP1 i VRI. Są to białka o charakterze czynników transkrypcyjnych, które wiążą się do sekwencji regulatorowej genu *Clk*. PDP1 stymuluje transkrypcję *Clk* powodując wzrost ilości białka CLK, które wiąże się z obecnym w cytoplazmie białkiem CYC. W odpowiedzi heterodimer CLK/CYC aktywuje transkrypcję *Pdp1* i *vri*. Zmiany poziomu aktywnego heterodimeru CLK/CYC najprawdopodobniej wpływają także na cykliczną ekspresję genów *cgc*. Dokładny opis działania molekularnego oscylatora znajduje się w tekście.

wykazują obniżoną ekspresję genu *Clk*, co wpływa na brak okołodobowej rytmiczności w aktywności lokomotorycznej *Drosophila melanogaster* (BLAU i współaut. 1999, CYRAN i współaut. 2003).

Za synchronizację zegara molekularnego *Drosophila melanogaster* do zewnętrznych warunków oświetlenia odpowiada fotoreceptor światła niebieskiego kryptochrom (CRY). Wraz z nastaniem świtu, pod wpływem światła kryptochrom zmienia swoją konformację. Tak aktywowane białko CRY łączy się z białkiem TIM, a następnie kompleks ten ulega bardzo szybkiej degradacji proteosomowej (SURI i współaut. 1998, DUBRUILLE i współaut. 2009). W takiej sytuacji białko PER nie może utworzyć stabilnego kompleksu z TIM, i jak już wspomniano, jest ono fosorylowane

przez kinazę DBT, co jest sygnałem do degradacji PER. Opisane działanie światła powoduje, iż w ciągu dnia zachodzi transkrypcja i akumulacja mRNA *per* i *tim* oraz następuje produkcja tych białek. Jednakże produkty białkowe ulegają degradacji i nie są deponowane w cytoplazmie. W nocy CRY nie łączy się z TIM, a TIM tworzy kompleksy PER-TIM inaktywujące w jądrze komórkowym dimer CLK-CYC. Wraz z nastaniem świtu, w wyniku degradacji TIM pod wpływem światła, cały cykl zaczyna się od początku (YU i współaut. 2006).

Heterodimer CLK/CYC jest czynnikiem transkrypcyjnym także dla genów odpowiedzialnych za metabolizm i behavior. Są to *cgc*, geny kontrolowane przez zegar (DUNLAP 1999). Podejrzewa się, że kompleks CLK-CYC

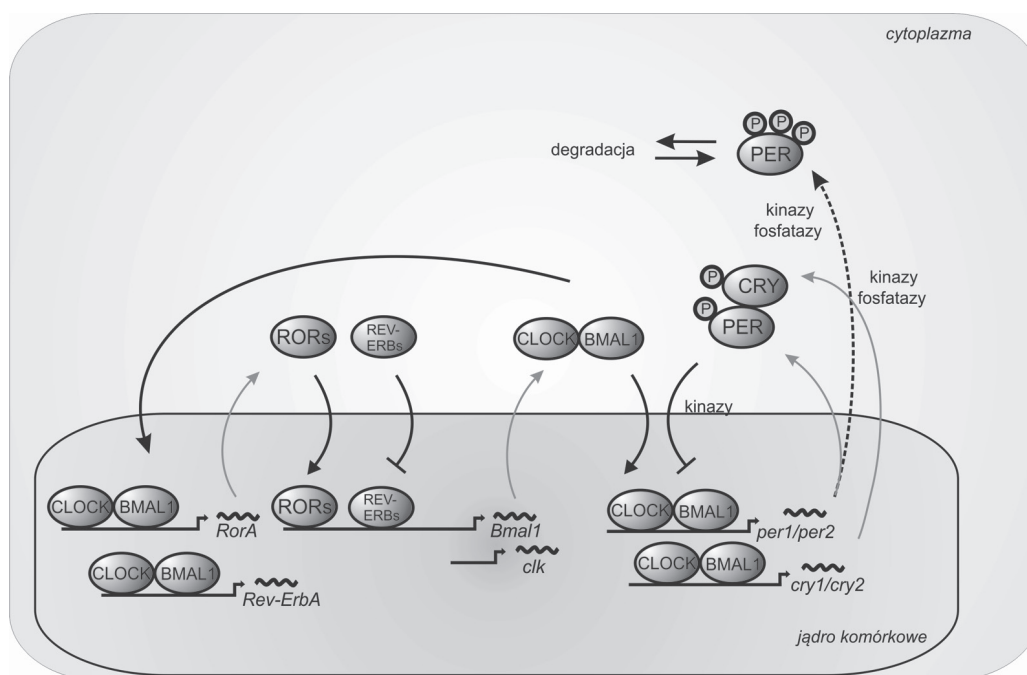
powoduje także modyfikacje chromatyny poprzez modyfikacje histonów, co wpływa na poziom transkrypcji poprzez kontrolowanie wiązania i aktywności polimerazy RNA II (Pol II) (TAYLOR i HARDIN 2008).

Schemat działania molekularnego mechanizmu zegara *Drosophila melanogaster* został przedstawiony na Ryc. 4.

ZEGAR SSAKÓW

Doświadczenia na ssakach takich jak myszy, szczury i chomiki wykazały, iż molekularny mechanizm zegara u ssaków jest bardzo podobny do mechanizmu opisanego u *Drosophila melanogaster*. Kompleksami aktywującymi w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego są heterodimery tworzone przez białka clock, brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like (BMAL), neuronal PAS domain-containing

protein (NPAS). Białka te budują kompleksy CLOCK-BMAL1, CLOCK-BMAL2, NPAS2-BMAL1, NPAS2-BMAL2, które w jądrze komórkowym aktywują ekspresję genów *Period 1* (*Per1*), *Period 2* (*Per2*), *Period 3* (*Per3*) oraz *Cryptochrome 1* (*Cry1*) i *Cryptochrome 2* (*Cry2*). Prowadzi to do stopniowej akumulacji białkowych produktów tych genów w ciągu doby, które łącząc się w odpowiednie kompleksy białkowe, przemieszczają się do



Ryc. 5. Schemat działania molekularnego zegara myszy.

W celu zachowania przejrzystości na schemacie zostały zamieszczone tylko najlepiej poznane białka. Pętla głównego sprzężenia zwrotnego oscylatora regulowana jest poprzez ekspresję genów *per* i *cry*. Heterodimer CLOCK/BMAL1, łącząc się sekwencją promotorową genów *per* oraz genów *tim* aktywując ich transkrypcję. Powstające białka PER i CRY są fosorylowane przez odpowiednie kinazy (reszty kwasu ortofosforowego oznaczono literą P) lub defoszorylowane przez fosfatazy. Białka PER i CRY tworzą heterodimer, który transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie hamuje ekspresję własnych genów. Do odblokowania transkrypcji *per* i *CRY* konieczna jest degradacja białka PER. Sygnałem do degradacji białek PER jest ich odpowiednia fosorylacja. Dodatkowa pętla sprzężenia zwrotnego molekularnego mechanizmu zegara związana jest z regulacją ekspresji białka BMAL1 przez dwa białka grupy ROR i REV-ERB. Białka ROR stymulują transkrypcję *Bmal1* powodując wzrost ilości białka BMAL1, które wiąże się z białkiem CLOCK. W odpowiedzi heterodimer CLOCK/BMAL1 aktywuje transkrypcję *RorA* i *Rev-ErbA*. Zmiany poziomu aktywnego heterodimeru CLK/CYC najprawdopodobniej wpływają także na cykliczną ekspresję genów *cgc*. Dokładny opis działania molekularnego oscylatora znajduje się w tekście.

jądra komórkowego i poprzez interakcję z CLOCK-BMAL lub NPAS2-BMAL hamują własną ekspresję (YAMADA i FORGER 2010).

Podobnie jak w przypadku wcześniej opisywanych organizmów, znaczącą rolę w regulacji mechanizmu molekularnego zegara odgrywa fosforylacja i defosforylacja białek zegara. Głównymi kinazami regulującymi ilość heterodimeru PER-CRY są kinaza kazeinowa 1 ϵ (CK1 ϵ) oraz kinaza kazeinowa 1 δ (CK1 δ), które fosforylując białka PER i CRY powodują ich degradację proteosomalną, podobnie jak w przypadku innych zwierząt, napędzając cały cykl (VIRSHUP i współaut. 2007).

Kompleks CLOCK-BMAL, podobnie jak u *D. melanogaster*, wchodzi w skład dodatkowej pętli sprzężenia zwrotnego aktywując ekspresję genów *Rev-erba* oraz *Rora*. Białkowe produkty tych genów przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie przyłączając się do sekwencji promotorowej genu *Bmal1* wpływają na jego transkrypcję. Białko REV-ERB α powoduje zahamowanie transkrypcji *Bmal1* natomiast ROR α wykazuje działa-

nie przeciwne (AKASHI i TAKUMI 2005, YIN i współaut. 2010).

Pomimo wielu podobieństw, występują także istotne różnice pomiędzy molekularnym mechanizmem zegara u *Drosophila melanogaster* i ssaków. Jak już wspomniano, rolę inhibitora w ujemnej pętli sprzężenia zwrotnego pełnią inne niż PER-TIM heterodimery. Ponadto, białka pętli REV-ERB α i ROR α , która jest porównywana do pętli VRI-PDP, wydają się mieć charakter receptorów jądrowych, a nie czynników transkrypcyjnych (SATO i współaut. 2004). Widoczne są także różnice w odbiorze informacji świetlnej synchronizującej zegar do zewnętrznych warunków środowiska. U muszki owocowej odbywa się to poprzez degradację białka TIM, natomiast u ssaków związane jest z aktywacją transkrypcji genu *Per1*.

Schemat działania molekularnego mechanizmu zegara myszy został przedstawiony na Ryc. 5.

PODSUMOWANIE

U wszystkich opisanych organizmów modelowych, reprezentujących tak odległe ewolucyjnie organizmy, zegar okołodobowy pełni bardzo ważną rolę w regulacji wielu ścieżek metabolicznych. Najbardziej pierwotny wydaje się być molekularny model zegara reprezentowany przez *Synechococcus elongatus*. Białka zarówno oscylatora, jak i ścieżki wejściowej i wyjściowej, tworzą duży kompleks zwany periodosomem, co jest niespotykane u innych gatunków (IVLEVA i współaut. 2006).

Jednakże molekularny mechanizm zegara, począwszy od grzybów, poprzez owady, aż po ssaki, posiada jedną wspólną cechę. System ten złożony jest z białek działających w pętli sprzężeń zwrotnych. Białka takie jak WC 1 i WC2; dCLK i CYC; CLOCK i BMAL1, które w formie dimerów funkcjonują jako aktywatory transkrypcji genów kodujących białka FRQ; PER i TIM; CRY1, CRY2 i mPER1, mPER2, mPER3, pełniących rolę represorów transkrypcji własnych genów. Represory z kolei

hamują ekspresję aktywatorów i cały cykl się zamyka. Białka te regulują także bezpośrednio i pośrednio ekspresję wielu innych genów przyczyniając się do regulacji szeregu procesów metabolicznych w komórce/organizmie.

Geny kontrolowane przez zegar wpływają u człowieka na wiele procesów zachodzących w organizmie, takich jak cykl snu i czuwania, zmian ciśnienia krwi, temperatury ciała czy procesów metabolicznych. Dlatego też zaburzenia działania zegara, czy to samego oscylatora czy też dróg wejściowych i wyjściowych, powodują wiele schorzeń, jak na przykład choroby metaboliczne, nowotwory czy też choroby psychiczne. U ssaków molekularny mechanizm zegara okołodobowego jest skomplikowanym systemem, stąd tak istotne są badania na zwierzętach modelowych takich jak *Drosophila melanogaster* czy *Neurospora crassa*, u których system ten złożony jest z mniejszej liczby elementów.

MOLEKULARNY MECHANIZM ZEGARA, CZYLI JAK ORGANIZMY MIERZĄ CZAS

Streszczenie

Rytmy okołodobowe są powszechne w przyrodzie, a ich występowanie stwierdzono niemal u

wszystkich organizmów. Wspomniane rytmy przejawiają się zarówno w zachowaniu jak również

metabolizmie oraz wielu ścieżkach fizjologicznych organizmu. Rytm okołodobowy są kontrolowane przez specjalny mechanizm molekularnego zegara, opartego na działaniu pętli sprzężeń zwrotnych regulowanych poprzez białka o charakterze czynników transkrypcyjnych. Przez ostatnie lata mechanizm ten był intensywnie badany u bakterii, grzybów i roślin, oraz przede wszystkim u zwierząt bezkręgowych (*Drosophila melanogaster*) i ssaków. Molekularny mechanizm endogennego oscylatora różni się u Eukariota i Prokaryota, co sugeruje jego niezależne powstanie u tych grup organizmów. Pomimo znaczących różnic w regulacji mechanizmu zegara okołodobowego, wspólną cechą jest fakt, iż czynniki o charakterze aktywatorów inicjują transkrypcję czynników o charakterze inhibitorów, które zwrótnie hamują ekspresję wspomnianych aktywatorów. Kolejny cykl rozpoczyna się w momencie, gdy poziom

czynników hamujących jest na tyle niski, iż możliwa jest ponowna transkrypcja czynników aktywujących. Taki samonapędzający się oscylator jest synchronizowany do zewnętrznych warunków środowiska dzięki istnieniu dróg wejściowych, które mogą odbierać informacje o warunkach świetlnych, temperaturze itp. Ponadto, białka wchodzące w skład molekularnego oscylatora odpowiedzialne są nie tylko za regulację poziomu białek zegara, ale wpływają na ekspresję innych genów, tak zwanych genów kontrolowanych przez zegar. Produkty białkowe tych genów stanowią element dróg wyjściowych zegara, które kontrolują wiele procesów fizjologicznych jak i behavior. W prezentowanej pracy został omówiony molekularny mechanizm zegara okołodobowego zwierząt modelowych, takich jak *Synechococcus elongatus*, *Neurospora crassa*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* oraz *Mus musculus*.

MOLECULAR MECHANISM OF THE CIRCADIAN CLOCK – HOW ORGANISMS COUNT TIME

Summary

Almost all organisms exhibit circadian rhythms in behavior, metabolism and physiology. All these rhythms are controlled by a clock mechanism, which is composed of transcriptional feedback loops. Molecular composition and regulation of endogenous oscillators responsible for circadian rhythms, from cyanobacteria to humans, have been extensively investigated over past years. The molecular mechanism of the circadian clock is different between eukaryotes and prokaryotes, suggesting its independent origin. However, a common feature of the clock is that positive factors in the feedback loops activate the transcription of negative factors, which feedback to inhibit expression of positive factors. When the

level of negative factors is low, the positive factors can start the next cycle of transcription. The core clock is synchronized to the environment by means of input pathways which can detect external cues such as light, temperature and other. Clock proteins are not only self-regulated molecules but can also influence expression of other genes (clock-controlled genes). These genes are part of an output pathway which controls many behavioral and physiological pathways. In this paper, the circadian clock mechanisms in different model organism (*Synechococcus elongatus*, *Neurospora crassa*, *Arabidopsis thaliana*, fruit fly and mouse) are reviewed.

LITERATURA:

- AKASHI M., TAKUMI T., 2005. *The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1*. Nat. Struct. Mol. Biol. 12, 441–448.
- ALABADÍ D., OYAMA T., YANOVSKY M. J., HARMON F. G., MÁS P., KAY S., 2001. *Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock*. Science 293, 880–883.
- ALLADA R., CHUNG B.Y., 2010. *Circadian organization of behavior and physiology in Drosophila*. Ann. Rev. Physiol. 72, 605–624.
- ARONSON B. D., JOHNSON K., LOROS J. J., DUNLAP J. C., 1994. *Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency*. Science 263, 1578–1584.
- BAE K., LEE C., HARDIN P. E., EDERY I., 2000. *dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex*. J. Neurosci. 20, 1746–1753.
- BAKER C. L., KETTENBACH A. N., LOROS J. J., GERBER S., DUNLAP J. C., 2009. *Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the Neurospora circadian clock*. Mol. Cell 34, 354–363.
- BLAU J., YOUNG M. W., 1999. *Cycling vrille expression is required for a functional Drosophila clock*. Cell 99, 661–671.
- CHA J., CHANG S., HUANG G., CHENG P., LIU Y., 2008. *Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process*. EMBO J. 27, 3246–35.
- CHEN C.-H., DUNLAP J. C., LOROS J. J., 2010. *Neurospora illuminates fungal photoreception*. Fungal Genet. Biol. 47, 922–929.
- CHENG P., HE Q., HE Q., WANG L., LIU Y., 2005. *Regulation of the Neurospora circadian clock by an RNA helicase*. Genes Develop. 19, 234–241.
- CYMBOROWSKI B., 2000. *Zegar biologiczny końca milenium: od zegara kwiatowego do zegara molekularnego*. Kosmos 49, 439–446.
- CYRAN S. A., BUCHSBAUM A. M., REDDY K. L., LIN M. C., GLOSSOP N. R. J., HARDIN P. E., YOUNG M. W., STORTI R. V., BLAU J., 2003. *vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the Drosophila circadian clock*. Cell 112, 329–341.
- DAAN S., 2010. *A history of chronobiological concepts*. [W:] *Protein reviews. Circadian Clock First Edit.* ALBRECHT U. (red.). Springer New York, 1–35.
- DIERNFELLNER A. C. R., QUERFURTH C., SALAZAR C., HÖFER T., BRUNNER M., 2009. *Phosphorylation modulates rapid nucleocytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of Neurospora clock protein FRQ on a circadian time scale*. Genes Develop. 23, 2192–2200.

- DUBRUILLE R., MURAD A., ROSBASH M., EMERY P., 2009. A constant light-genetic screen identifies KIS-MET as a regulator of circadian photoresponses. *PLoS Genet.* 5, p.e1000787.
- DUNLAP J., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- DUNLAP J. C., LOROS J. J., 2006. How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 579-587.
- FARRÉ E. M., HARMER S. L., HARMON F. G., YANOVSKY M. J., KAY S. A., 2005. Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.* 15, 47-54.
- FELDMAN J. F., HOYLE M. N., 1973. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* 75, 605-613.
- FRANCHI L., FULCI V., MACINO G., 2005. Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol. Microbiol.* 56, 334-345.
- FROELICH A. C., LOROS J. J., DUNLAP J. C., 2003. Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5914-5919.
- GOLDEN S. S., ISHIURA M., JOHNSON C. H., 1997. Cyanobacterial Circadian Rhythms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 327-354.
- GOLDEN S. S., CASSONE V. M., LI W. A., 2007. Shifting nanoscopic clock gears. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 362-363.
- GREEN R., TINGAY S., WANG Z., 2002. Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 129, 576-584.
- GUO J., CHENG P., YUAN H., LIU Y., 2009. The exosome regulates circadian gene expression in a posttranscriptional negative feedback loop. *Cell* 138, 1236-1246.
- HAO H., ALLE D. L., HARDIN P. E., 1997. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 17, 3687-3693.
- HARMS E., YOUNG M. W. I., SAEZ L., 2003. CK1 and GSK3 in the *Drosophila* and mammalian circadian clock. *Novartis Found. Symp.* 253, 267-277; discussion 102-109, 277-284.
- HE Q., CHENG P., YANG Y., HE Q., YU H., LIU Y., 2003. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.* 22, 4421-4430.
- HE Q., CHA J., HE Q., LEE H.-C., YANG Y., LIU Y., 2006. CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes Develop.* 20, 2552-2565.
- HUANG G., CHEN S., LI S., CHA J., LONG C., LI L., HE Q., LIU Y., 2007. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Develop.* 21, 3283-3295.
- ISHIURA M., KUTSUNA S., AOKI S., IWASAKI H., ANDERSON C. R., TANABE A., GOLDEN S. S., JOHNSON C. H., KONDO T., 1998. Expression of a gene cluster *kaiabc* as a circadian feedback process in *Cyanobacteria*. *Science*, 281, 1519-1523.
- IVLEVA N. B., BRAMLETT M. R., LINDAHL P., GOLDEN S. S., 2005. LdpA: a component of the circadian clock senses redox state of the cell. *EMBO J.* 24, 1202-1210.
- IVLEVA N. B., GAO T., LI WANG A. C., GOLDEN S. S., 2006. Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17468-17473.
- KIM E.Y., EDERY I., 2006. Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6178-6183.
- KONDO T., TSINOREMAS N. F., GOLDEN S. S., JOHNSON C. H., KUTSUNA S., ISHIURA M., 1994. Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266, 1233-1236.
- KONOPKA R.J., BENZER S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2112-2116.
- KUROSAWA S., MURAKAMI R., ONAI K., MORISHITA M., HASEGAWA D., IWASE R., UZUMAKI T., HAYASHI F., KITAJIMA-IHARA T., SAKATA S., MURAKAMI M., KOUYAMA T., ISHIURA M., 2009. Functionally important structural elements of the cyanobacterial clock-related protein Pex. *Genes Cells* 14, 1-16.
- LI S., LAKIN-THOMAS P., 2010. Effects of *prd* circadian clock mutations on *FRQ*-less rhythms in *Neurospora*. *J. Biol. Rhythms* 25, 71-80.
- LOCKE J. C. W., SOUTHERN M. M., KOZMA-BOGNÁR L., HIBBERD V., BROWN P. E., TURNER M. S., MILLAR A. J., 2005. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol. Syst. Biol.* 1, 1-9.
- MARTÍNEZ-GARCÍA J. F., HUQ E., QUAIL P. H., 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- NAKAJIMA M., IMAI K., ITO H., NISHIWAKI T., MURAYAMA Y., IWASAKI H., OYAMA T., 2005. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-415.
- NAKAMICHI N., KITA M., NIINUMA K., ITO S., YAMASHINO T., MIZOGUCHI T., MIZUNO T., 2007. *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol.* 48, 822-832.
- PREGUEIRO A. M., LIU Q., BAKER C. L., DUNLAP J. C., LOROS J. J., 2006. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science* 313, 644.
- PRICE J. L., BLAU J., ROTHENFLUH A., ABODEELY M., KLOSS B., YOUNG M. W., 1998. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-95.
- PRUNEDA-PAZ J. L., BRETON G., PARA A., KAY S.A., 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 323, 1481-1485.
- RUTILA J. E., SURI V., LE M., SO W. V., ROSBASH M., HALL J. C., 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- SAEZ L., YOUNG M. W., 1996. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* 17, 911-920.
- SATO T. K., PANDA S., MIRAGLIA L. J., REYES T. M., RUDIC R. D., MCNAMARA P., NAIK K. A., FITZGERALD G. A., KAY S. A., HOGENESCH J. B., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527-537.
- SAWA M., NUSINOW D., KAY S., IMAIZUMI T., 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318, 261-265.
- SCHAFMEIER T., DIERNFELLNER A., SCHÄFER A., DINTSIS O., NEISS A., BRUNNER M., 2008. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with

- rapid nucleo-cytoplasmic shuttling*. Genes Develop. 22, 3397–402.
- SMITH R. M., WILLIAMS S. B., 2006. *Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium Synechococcus elongatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 8564–8569.
- STANEWSKY R., 2002. *Clock mechanisms in Drosophila*. Cell Tissue Res. 309, 11–26.
- SURI V., QIAN Z., HALL J. C., ROSBASH M., 1998. *Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in Drosophila melanogaster*. Neuron 21, 225–234.
- TAYLOR P., HARDIN P. E., 2008. *Rhythmic E-box binding by CLK-CYC controls daily cycles in per and tim transcription and chromatin modifications*. Mol. Cell. Biol. 28, 4642–4652.
- TÓTH R., KEVEI E., HALL A., MILLAR A.J., NAGY F., KOZMA-BOGNÁR L., 2001. *Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis*. Plant Physiol. 127, 1607.
- VIRSHUP D. M., EIDE E. J., FORGER D. B., GALLEGO M., VIELHABER HARNISH E., 2007. *Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 413–420.
- VITALINI M. W., DE PAULA R. M., PARK W. D., BELL-PEDERSEN D., 2006. *The rhythms of life: circadian output pathways in Neurospora*. J. Biol. Rhyth. 21, 432–444.
- WANG G. K., OUSLEY A., DARLINGTON T. K., CHE, D., CHEN Y., FU W., HICKMAN L. J., KAY S., SEHGAL A., 2001. *Regulation of the cycling of timeless (tim) RNA*. J. Neurobiol. 47, 161–175.
- WOELFLE M. A., XU Y., QIN X., JOHNSON C.H., 2007. *Circadian rhythms of superhelical status of DNA in cyanobacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 18819.
- XU Y., MORI T., JOHNSON C. H., 2000. *Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting*. EMBO J. 19, 3349–3357.
- YAMADA Y., FORGER D., 2010. *Multiscale complexity in the mammalian circadian clock*. Curr. Opin. Genet. Develop. 20, 626–633.
- YANG Y., CHENG P., ZHI G., LIU Y. 2001. *Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the Neurospora circadian clock protein FREQUENCY*. J. Biol. Chem. 276, 41064–4172.
- YANG Y., HE Q., CHENG P., WRAGE P., YARDEN O., LIU, Y., 2004. *Distinct roles for PP1 and PP2A in the Neurospora circadian clock*. Genes Develop. 18, 255–260.
- YIN L., WU N., LAZAR M., 2010. *Nuclear receptor Rev-erb α : a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism*. Nucl. Receptor Signaling 8, 1–6.
- YU J. W., RUBIO V., LEE N. Y., BAI S., LEE S. Y., KIM S. S., LIU L., ZHANG Y., IRIGOYEN M. L., SULLIVAN J.A., 2008. *COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability*. Mol. cell, 32, 617–630.
- YU W., HARDIN P. E., 2006. *Circadian oscillators of Drosophila and mammals*. J. Cell Sci. 119, 4793–4795.
- YU W., ZHENG H., HOUL J. H., DAUWALDER B., HARDIN P. E., 2006. *PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription*. Genes Develop. 20, 723–733.