

# Molekularne mechanizmy funkcjonowania zegara biologicznego

## Molecular mechanisms controlling the biological clock

Dariusz Sitkiewicz, Grażyna Sygitowicz

Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

### Streszczenie

Tegoroczni laureaci Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny Michael Rosbash, Michael W. Young i Jeffrey C. Hall zidentyfikowali geny odpowiedzialne za funkcjonowanie zegara biologicznego. Ich badania pozwoliły na sformułowanie podstawowego mechanizmu transkrypcyjno-translacyjnej pętli sprzężenia zwrotnego TTFL (ang. *Transcription-Translation Feedback Loop*). Transkrypcja genu *PERIOD* i jego partnera *TIM* jest hamowana przez kodowane przez nie białka generowane oscylacyjnie i autonomicznie.

Zegar biologiczny kontroluje wiele procesów fizjologicznych poprzez generowanie okołodobowych oscylacji w harmonii z cyklem dzień/noc. Rytm dobowy reguluje sen, spożywanie pokarmów, sekrecję hormonów, ciśnienie krwi a także temperaturę ciała.

### Summary

This year's awardees of the Nobel Prize in Physiology or Medicine – Michael Rosbash, Michael W. Young and Jeffrey C. Hall discovered genes responsible for controlling the biological clock. Their studies allowed to form the basic mechanism of the Transcription– Translation Feedback Loop, known as TTFL. The transcription of the *PERIOD* gene and its partner *TIM* is inhibited by proteins encoded by them which are generated oscillatorily and autonomously.

The biological clock controls many physiological processes by generating circadian oscillations in harmony with day and night patterns. The daily rhythm regulates sleep, eating meals, hormone release, blood pressure and body temperature.

**Słowa kluczowe:** zegar biologiczny, geny zegarowe, rytm dobowy

**Key words:** Biological clock, Clock genes, Circadian rhythm



Jeffrey C. Hall

Michael W. Young

Michael Rosbash

### NOBEL 2017

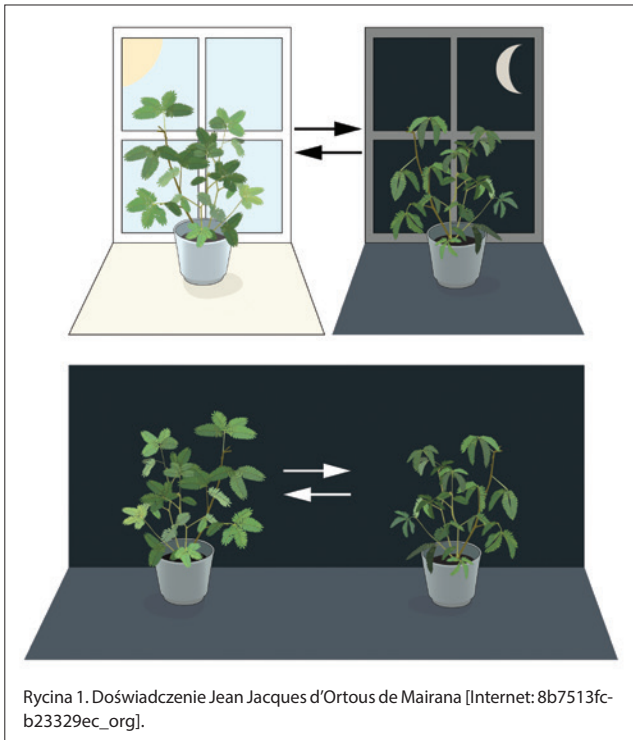
#### z fizjologii lub medycyny

Tegorocznymi laureatami Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny zostało trzech amerykańskich naukowców: **Michael Rosbash** z University of Maine, **Michael W. Young** z Rockefeller University, New York oraz **Jeffrey C. Hall** z Brandeis University, Waltham. Otrzymali ją za badania nad molekularnymi mechanizmami kontrolującymi rytm dobowy i identyfikację genów odpowiedzialnych za działanie zegara biologicznego.

### Wstęp

Ziemia, będąc integralną częścią Wszechświata, podlega wszystkim prawom jakie warunkują jego istnienie. W odniesieniu do

naszej planety, działanie „sił kosmicznych” ujawnia się w takich zjawiskach jak: obieg Ziemi wokół Słońca, obrót Ziemi dookoła własnej osi, czy obieg Księżyca wokół Ziemi. Zjawiska te wykazują



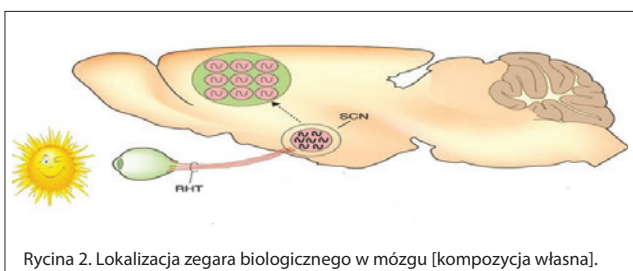
Rycina 1. Doświadczenie Jean Jacques d'Ortous de Mairana [Internet: 8b7513fc-b23329ec\_org].

czasową cykliczność i mają zasadniczy wpływ na większość organizmów żywych występujących na naszej planecie.

Już w XVIII wieku francuski astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan zaobserwował różne zachowanie liści mimozy w ciągu dnia i nocy. W ciągu dnia liście były „rozłożone” i skierowane do słońca, podczas gdy w nocy opadały (ryc.1 – część górna). Następnie, rośliny zostały przeniesione do całkowitej ciemności i wówczas zauważył, że pomimo ciemności liście zachowują się identycznie (ryc.1 – część dolna).

Doświadczenie to świadczy o obecności w świecie roślin zegara wewnętrznego biologicznego, który determinuje zachowanie liści niezależnie od światła słonecznego ale zależnego od pory dnia. Rytm dobowy jest uzależniony od wewnętrznego zegara biologicznego, który antycypuje cykl dzień/noc dla optymalizacji fizjologii i zachowań wszystkich organizmów żywych od jednokomórkowych (*cyanobacteria*, pierwotniaki) do wielokomórkowych, w tym: grzybów, roślin, owadów, gryzoni oraz ludzi. Model zegara biologicznego u ludzi składa się z trzech podstawowych elementów:

- Właściwego zegara, który jest odpowiedzialny za wytwarzanie endogennych rytmów okołodobowych;
- Szlaków aferentnych, doprowadzających sygnały środowiska do zegara;



Rycina 2. Lokalizacja zegara biologicznego w mózgu [kompozycja własna].

- Szlaków eferentnych, przy pomocy których rytmiczne sygnały powstałe w zegarze są przesyłane do odpowiednich struktur efektorowych organizmu.

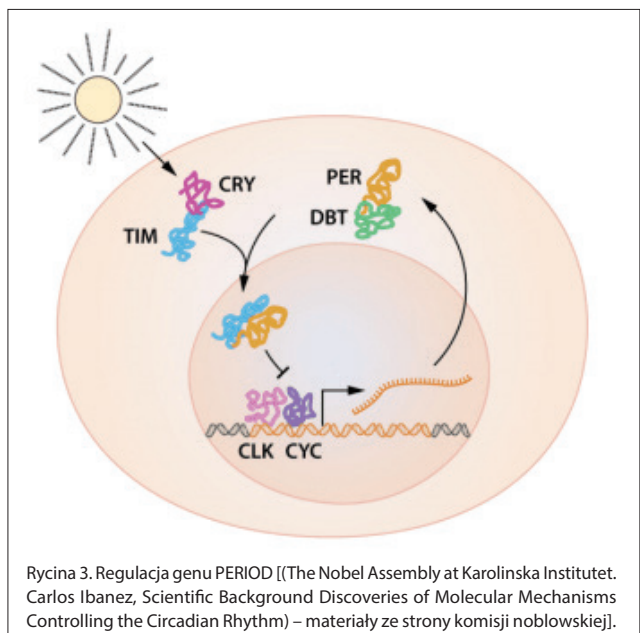
Światło słoneczne synchronizuje rytmy biologiczne. Najsilniejszym endogennym synchronizatorem rytmów biologicznych człowieka, nazwanym zegarem biologicznym, jest struktura anatomiczna – jądro nadskrzyżowaniowe (SCN; *nucleus suprachiasmaticus*) znajdujące się w przedniej części podwzgórza, nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. Kluczową rolę w przekazywaniu informacji świetlnych do nadrzędnego zegara biologicznego odgrywa szlak siatkówkowo-podwzgórzowy (RHT; *retino hypothalamic tract*), którego głównym przekaźnikiem jest glutaminian (ryc. 2).

W przekazywaniu tego sygnału uczestniczą także: szlak kolankowo-podwzgórzowy, wykorzystujący jako przekaźnik neuropeptyd Y (NPY) oraz szlak łączący twór siatkowaty z SCN, którego przekaźnikiem jest serotonina.

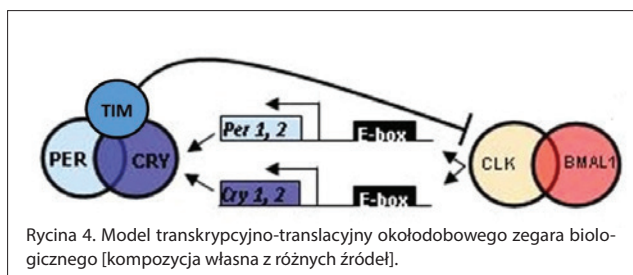
### Molekularne mechanizmy działania zegara biologicznego

Historia badań nad molekularnymi mechanizmami funkcjonowania zegara biologicznego rozpoczęła się na początku lat 70-tych ubiegłego wieku. W 1971 r. Seymour Benzer i jego student Ronald Konopka pracując w California Institute of Technology zidentyfikowali mutanta muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), który wykazywał odmiennieści swojej aktywności lokomocyjnych w normalnym 24-ro godzinnym cyklu [1]. Doświadczenia wskazywały, że mutacja dotyczyła genu, który następnie nazwano *PERIOD*. Dekadę później Jeffrey C. Hall i Michael Rosbash współpracując na Brandeis University oraz Michael W. Young na Rockefeller University wyizolowali i scharakteryzowali gen *PERIOD* [2-5]. Jednakże, struktura i sekwencja tego genu nie od razu wyjaśniała molekularny mechanizm działania zegara biologicznego.

Hall i Rosbash wyizolowali białko kodowane przez gen *PERIOD*, które nazwali PER [6]. Stężenie tego białka ulegało istotnym zmianom podczas 24-ro godzinnego cyklu i stanowiło istotny element odpowiedzialny za działanie zegara biologicznego u *Drosophila*. Hall wykazał, że zablokowanie ekspresji genu



Rycina 3. Reguluacja genu PERIOD [(The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Carlos Ibanez, Scientific Background Discoveries of Molecular Mechanisms Controlling the Circadian Rhythm) – materiały ze strony komisji noblowskiej].



*PERIOD* prowadzi do „zatrzymania” zegara biologicznego [8]. W 1997 roku Young uczynił następny krok wykazując, że białko PER syntetyzowane w nocy znajduje się w cytoplazmie komórki. Odkrył on nowy gen nazwany *timeless*, który koduje białko TIM. [9-10]. Gen ten jest aktywny w nocy a białko TIM obecne w cytoplazmie „zezwała” na syntezę białka PER. Gdy nastaje ranek oba te białka łączą się ze sobą, co umożliwia transport tego nowego kompleksu z cytoplazmy do jądra komórkowego i hamowanie ekspresji genu *PERIOD*.

Badania te, umożliwiły sformułowanie podstawowego mechanizmu transkrypcyjno-translacyjnej pętli sprzężenia zwrotnego (TTFL; *Transcription-Translation Feedback Loop*). Transkrypcja genu *PERIOD* i jego partnera *TIM* jest hamowana przez kodowane przez nie białka, generowane oscylacyjnie i autonomicznie.

Do oscylacyjnego działania genu *PERIOD* niezbędne są dodatkowe białka: TIM i DBT. Białko TIM kodowane jest przez gen *timeless* a białko DBT przez gen *doubletimes* [11]. Interakcja białka TIM z białkiem PER jest kluczowym mechanizmem umożliwiającym akumulację białka PER w jądrze i represji genu *PERIOD*. Białko DBT jest kinazą białkową, która fosforyluje PER prowadząc do jego degradacji a zatem i opóźnienia interakcji pomiędzy *PERIOD* mRNA a akumulacją białka PER. Czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym gen *PERIOD* są CLK i CYC (ryc. 3).

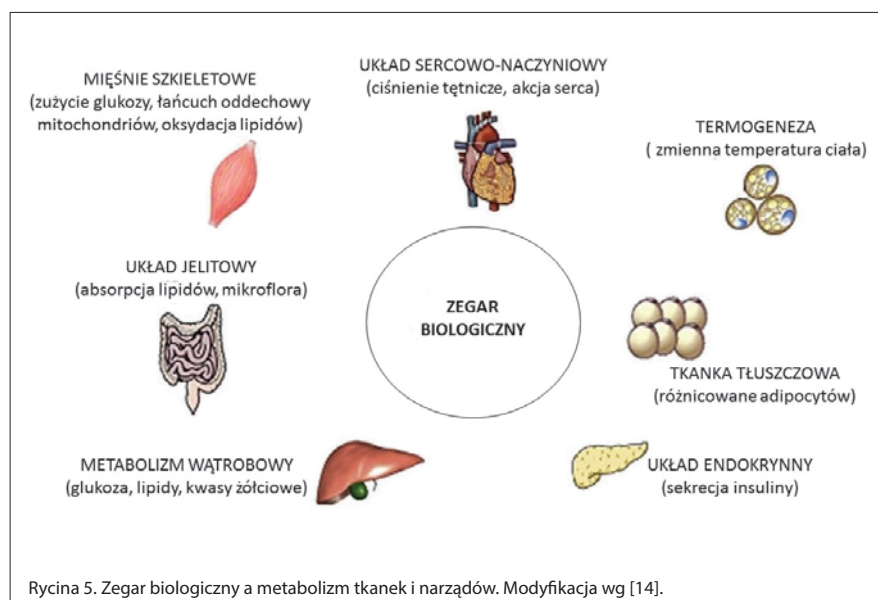
W modelu transkrypcyjno-translacyjnym okołodobowego zegara biologicznego heterodimery białek Clock-Bmal przyłączają się do promotora genów *PER1*, *PER2* i indukują ich transkrypcję. Po osiągnięciu przez nagromadzające się w cytoplazmie białka *PERIOD1* i *PERIOD2* odpowiednio wysokiego poziomu, dochodzi do powstawania ujemnych kompleksów transkrypcyjnych, w skład których, obok białek PER, wchodzi kryptochromy i tzw. białko *Timeless* będące produktem genu *TIM*. Kompleksy te wiążą się z heterodimerami Clock-Bmal, zaś uniemożliwiają im aktywację transkrypcji genów *PER*, zamykają pętlę transkrypcyjno-translacyjną (ryc. 4).

Zegar biologiczny kontroluje wiele procesów fizjologicznych poprzez generowanie okołodobowych oscylacji na drodze regulacji procesów transkrypcji i translacji w harmonii z cyklem dzień/noc. Rytm dobowy reguluje sen, spożywanie pokarmów, sekrecję hormonów, ciśnienie krwi a także temperaturę ciała (ryc. 5).

Warto również podkreślić, że zegar biologiczny odgrywa istotną rolę lokalną w wielu tkankach. Eliminacja genów zegara w modelach zwierzęcych prowadzi do zmian wydzielania hormonów, takich jak: kortykosteron czy insulina [12]. Prawidłowa aktywność genów zegarowych wpływa na metabolizm, kontrolując proces glukoneogenezy, wrażliwość na insulinę a zatem również i na zmiany stężenia glukozy [13]. Zaburzenie równowagi pomiędzy naszymi zachowaniami a rytmem wyznaczanym przez wewnętrzny zegar biologiczny jest związane ze wzrostem ryzyka wielu chorób, tak bardzo rozpowszechnionych w XXI wieku, takich jak: choroba nowotworowa, choroby neurodegeneracyjne, zaburzenia metaboliczne a także stan zapalny [14].

## Piśmiennictwo

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 1971, 68: 2112-2116.
2. Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 2142-2146.
3. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. Nature 1984, 312: 752-754.
4. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature 1990, 343: 536-540.
5. Liu X, Zwiebel LJ, Benzer S, et al. The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. J Neurosci 1992, 12: 2735-2744.
6. Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. Cell 1984, 38: 701-710.
7. Siwicki KK, Eastman C, Petersen G, et al. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. Neuron 1988, 1: 141-150.
8. Sehgal A, Price JL, Le M, et al. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. Science 1994, 263: 1603-1606.
9. Price JL, Blau J, Rothenfluh A, et al. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates *PERIOD* protein accumulation. Cell 1998, 94: 83-95.
10. Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. Science 1995, 270: 808-810.
11. Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, et al. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene *timeless*. Science 1995, 270: 805-808.
12. Son GH, Chung S, Choe HK, et al. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythms of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105: 20970-20975.



13. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science* 2011, 354: 1008-1015.
14. Mayeuf-Louchart A, Zecchin M, Steels B, et al. Circadian control of metabolism and pathological consequences of clock perturbations. *Biochimie* 2017, 143: 42-50. doi. org/10.1016/j.biochi.2017.07.017.

**Autor do korespondencji:**

prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz  
Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1  
e-mail: [dariusz.sitkiewicz@wum.edu.pl](mailto:dariusz.sitkiewicz@wum.edu.pl)

Otrzymano: 04.12.2017

Akceptacja do druku: 31.12.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono