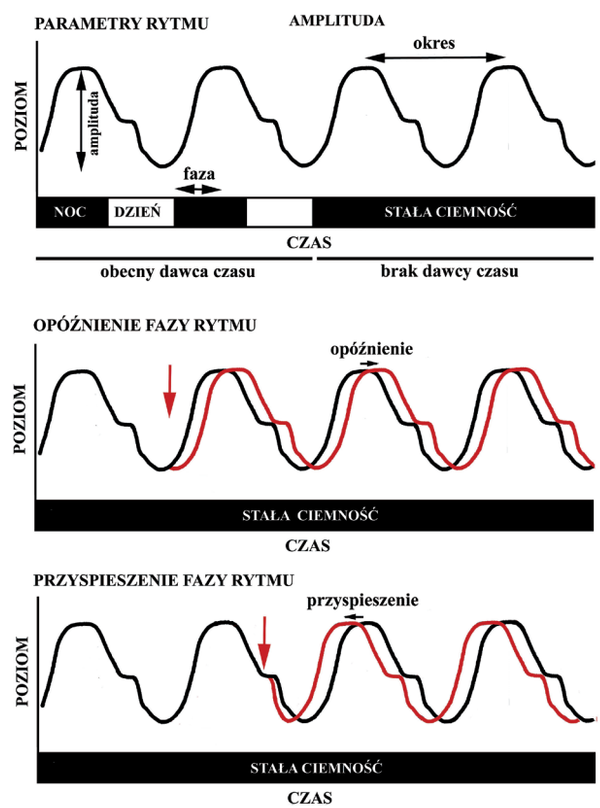
JAK „TYKA” ZEGAR BIOLOGICZNY

Jolanta Górska-Andrzejak (Kraków)

Środowisko naturalne na Ziemi charakteryzuje się dużą zmiennością o charakterze cyklicznym. Obieg Ziemi wokół Słońca wywołuje zmiany pór roku, a obrót Ziemi wokół własnej osi następstwo dnia i nocy. Sezonowe i dobowe oscylacje temperatury, natężenia światła oraz innych parametrów fizyko-chemicznych środowiska istotnie wpływają na procesy życiowe organizmów. Nic dziwnego, że wytworzyły one odpowiednie adaptacje. Przejawem ewolucyjnego przystosowania się organizmów żywych do rytmiki zdarzeń zachodzących w ich naturalnym środowisku są rytmy biologiczne, czyli oscylacje natężenia procesów biologicznych w czasie.

W chronobiologii, nauce o rytmach biologicznych, najczęściej badanymi rytmami są rytmy okołodobowe (ang. *circadian*, z łac. *circa* – około, *dies* – dzień), czyli oscylacje o 24-godzinnym okresie rytmu (Ryc. 1). Zostały one wykazane u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Występują w procesach biochemicznych, fizjologicznych i behawioralnych, a więc na różnych poziomach złożoności; od zachowania zwierzęcia do cyklicznych zmian ekspresji w jego tkankach odpowiednich genów. Rytmy okołodobowe powstają w wyniku działania wewnętrznego (endogennego) mechanizmu, który organizmy żywe wykształciły w toku ewolucji – tak zwanego zegara biologicznego.

Zegar, także biologiczny, byłby bezużyteczny gdyby nie można go było „nastawić”. Tempo pracy mechanizmu zegarowego generującego rytmikę organizmu jest więc synchronizowane z 24-godzinnym rytmem zmian zewnętrznych czynników środowiska zwanych dawcami czasu (niem. *Zeitgebers*, ang. *Time Givers*). Czynnikami takimi są oświetlenie, temperatura, dostępność pokarmu lub interakcje społeczne. Synchronizacja zegara z rytmem dawcy czasu umożliwia organizmom dopasowanie ich własnych rytmów biologicznych do rytmiki zamieszkiwanego przez nie środowiska. Gdy brak jest synchronizującego działania dawcy czasu, a więc gdy organizm przebywa w środowisku, które nie wykazuje zmian cyklicznych, ujawnia się endogenny charakter rytmu (Ryc. 1). Zegar biologiczny nadal „chodzi”, ale w nieco innym, charakterystycznym dla siebie tempie. W takich warunkach generowany jest tzw. rytm spontaniczny, swobodnie biegnący (ang. *free-running rhythm*), którego okres może być dłuższy lub krótszy od 24 godzin. Na przykład okres rytmu snu i czuwania człowieka zamkniętego w bunkrze, a więc pozbawionego jakichkolwiek wskaźników czasu wynosi 25 godzin. Wynika z tego, że właśnie tyle czasu trwa pełny obrót „wskazówek” zegara biologicznego człowieka, gdy nie jest on „nastawiany” przez środowisko.



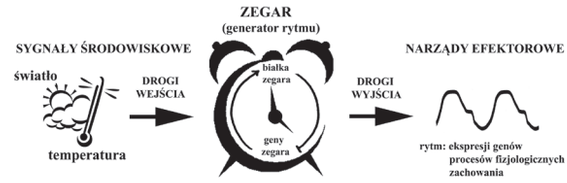
Ryc. 1. Krzywa przedstawiająca dobową rytmikę procesu biologicznego. Rytm ten opisuje szereg parametrów (panel górny). Okres rytmu, czyli okres czasu między kolejnymi wartościami maksymalnymi jego przebiegu jest równy 24 godzinom, a zatem jest to rytm dobowy. Charakteryzuje się on także określoną amplitudą, która opisuje maksymalne natężenie danego procesu. Każdy z punktów krzywej stanowi charakterystyczną fazę rytmu. Na rysunku zaznaczono strzałkami początek fazy ciemnej, czyli początek nocy. To, czy dany rytm jest rytmem endogennym można sprawdzić w stałych warunkach laboratoryjnych np. w stałej ciemności (DD, ang. constant darkness). Jeśli obserwowane oscylacje utrzymują się w DD oznacza to, że rytm ten jest generowany wewnątrz organizmu przez zegar biologiczny. Sygnały środowiskowe mogą przestawiać „wskazówki” zegara biologicznego (panel drugi i trzeci). Zastosowanie w DD krótkiego pulsu światła powoduje przestawienie zegara biologicznego. W zależności od tego, w której fazie rytmu ma miejsce ekspozycja zwierzęcia na bodziec świetlny (czerwona strzałka), dochodzi do opóźnienia lub przyspieszenia fazy rytmu (zmienione za Vitaterna i wsp., 2001).

Jak jest zbudowany i gdzie się znajduje zegar biologiczny?

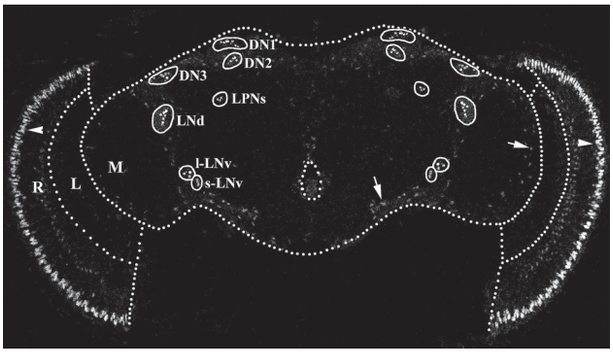
Główny mechanizm generujący rytmikę może być zlokalizowany w różnych strukturach organizmu. U ssaków znajduje się w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza mózgu (SCN, ang. *suprachiasmatic nuclei*), u ptaków, gadów i ryb jest w szyszynce, u mięczaków w oku, natomiast u owadów w płatach wzrokowych (świerszcze i karaczany) lub środkowej części mózgu (muchówki i motyle). Jednak zegar biologiczny organizmu to nie tylko główny generator rytmu (ang. *pacemaker*), czyli zegar nadrzędny. U zwierząt i człowieka w skład systemu zegarowego wchodzą także zegary peryferyczne zlokalizowane w komórkach narządów, które wykazują endogenną rytmikę procesów fizjologicznych. Oprócz tego integralnymi częściami zegara są tzw. drogi wejściowe do zegara, czyli szlaki aferentne i drogi wyjściowe, czyli szlaki eferentne (Ryc. 2). Te pierwsze doprowadzają do zegara sygnały środowiskowe i umożliwiają synchronizację jego pracy z rytmem zmian jakie zachodzą w środowisku zewnętrznym, natomiast drugie służą do przekazywania informacji z zegara do komórek narządów wykonawczych (efektorowych), w których dzięki tym informacjom powstają oscylacje natężenia określonych procesów biologicznych. Przepływ informacji pomiędzy poszczególnymi elementami systemu zegarowego umożliwiają substancje zwane neuroprzekaźnikami. Jedynym, dobrze poznanym neuroprzekaźnikiem zegara biologicznego jest czynnik rozpraszający pigment (PDF, ang. *pigment dispersing factor*), który przekazuje sygnały z głównego oscylatora do komórek docelowych.

W jaki sposób zegar biologiczny generuje oscylacje natężenia procesów biologicznych?

Mechanizm działania zegara biologicznego został poznany dzięki badaniom na mutantach zegara, najpierw muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) a potem gryzoni. Badania te rozpoczęły się wraz z odkryciem w 1971 roku u *D. melanogaster* genu *period* (*per*), czyli jednego z genów (obok genów takich jak *timeless*, *Clock* i *cycle*) sprawujących bezpośrednią kontrolę nad rytmiką okołodobową. Eksperymenty na mutantach *per* wykazały wpływ mutacji tego genu na długość okresu rytmu wychodzenia z poczwarek owada dojrzałego (formy imago) i rytmu aktywności lokomotorycznej muszek, natomiast badania nad jego ekspresją w tkankach – okołodobowe zmiany w poziomie tej ekspresji. Właśnie dobowe oscylacje poziomu ekspresji genów zegara stanowią podstawę działania molekularnego oscylatora, który generuje rytmikę zarówno u owadów jak i u ssaków.



Ryc. 2. Budowa i zasada działania zegara biologicznego. Środkową pozycję zajmuje generator rytmu. Podstawę działania jego mechanizmu stanowią dobowe zmiany w ekspresji tzw. genów zegara w komórkach jego struktur. Transkrypcja tych genów jest regulowana na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez białka, które geny te kodują. Zegar synchronizuje swoje działanie z rytmem zmian środowiskowych dzięki sygnałom, które docierają do niego drogami wejścia, sam zaś wysyła drogami wyjścia informacje do narządów efektorowych, generujących na bazie tych informacji odpowiednie oscylacje procesów biologicznych.



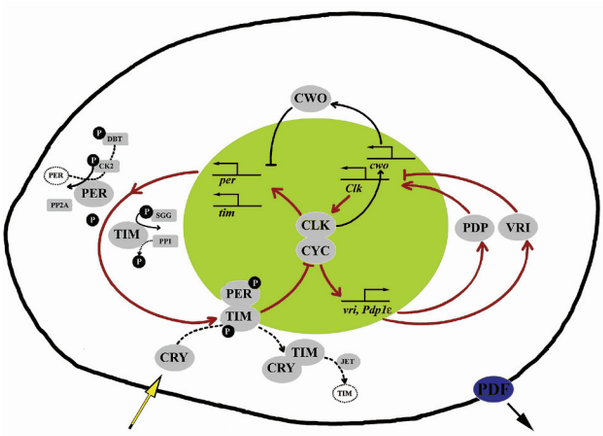
Ryc. 3. Schemat przedstawiający lokalizację neuronów zegara w mózgu *D. melanogaster*. Każdą z grup tych neuronów obrysowano. W ich jądrach komórkowych występuje białko PER, na co wskazuje PER-specyficzny sygnał fluorescencyjny, wynik reakcji immunohistochemicznej ukierunkowanej na PER. Sygnał ten występuje także w jądrach komórkowych fotoreceptorów oka złożonego (groty strzałek) i jądrach komórek glejowych mózgu (strzałki). DN1, DN2, DN3 - jądra komórkowe trzech grup neuronów grzbietowych, LPNs- boczne neurony tylne, LNd – grzbietowe neurony boczne, l-LNv- duże brzuszne neurony boczne, s-LNv- małe brzuszne neurony boczne, R- siatkówka, L- pierwszy neuropil wzrokowy, czyli płytka lamina, M- drugi neuropil wzrokowy, czyli płytka medula.

Drosophila melanogaster

U muszki owocowej główny oscylator okołodobowy znajduje się w mózgu. Stanowi go 100–150 neuronów. Ich ciała komórkowe skupione są w grupach, przy czym po każdej stronie mózgu występuje siedem takich grup (Ryc. 3). Ze względu na położenie neurony te dzieli się na neurony grzbietowe i neurony boczne. Wśród neuronów grzbietowych wyróżniono trzy grupy, które oznacza się skrótami DN1, DN2 i DN3 (ang. *dorsal neurons*). Z kolei wśród neuronów bocznych opisano tzw. boczne neurony tylne (LPNs, ang. *lateral posterior neurons*) oraz neurony boczne (LNs, ang. *lateral neurons*), przy czym w przypadku tych drugich jedna grupa znajduje się w grzbietowej części mózgu, są to tzw. grzbietowe neurony boczne (LN_d, ang. *dorsal lateral neurons*), natomiast

dwie inne położone są w brzusznej części mózgu i nazwane zostały brzusznymi neuronami bocznymi (LN_v, ang. *ventral lateral neurons*). Brzuszne neurony boczne dodatkowo dzieli się ze względu na zróżnicowaną wielkość ich ciał komórkowych na neurony małe (małe brzuszne neurony boczne, s – LN_v, ang. s*mall ventral lateral neurons*) i neurony duże (duże brzuszne neurony boczne, l – LN_v, ang. *large ventral lateral neurons*).

We wszystkich wyżej wspomnianych typach neuronów (Ryc. 3) molekularny mechanizm zegara biologicznego – „tykanie" zegara, opiera się na dobowych oscylacjach poziomu ekspresji genu *per* oraz kilku innych genów, przy czym oscylacje te powstają w wyniku działania zachodzących na siebie, transkrypcyjno-translacyjnych, wewnątrzkomórkowych pętli sprzężeń zwrotnych (dwóch pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego i pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego), a także potranslacyjnej modyfikacji białek (Ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat przedstawiający dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz jedną pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego w molekularnym mechanizmie zegara biologicznego *Drosophila melanogaster*. **Pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego**: podczas dnia, w neuronach zegara heterodimery CLK-CYC aktywują transkrypcję genów *per* i *tim*. W ciągu nocy powstają białka PER i TIM, które tworząc heterodimery PER-TIM przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie hamują aktywowaną przez CLK-CYC transkrypcję własnych genów. Dopiero rankiem następnego dnia, gdy poziom białek PER i TIM spada na skutek degradacji czułego na światło TIM (żółta strzałka oznacza bodziec świetlny), rozpoczyna się nowy cykl aktywacji transkrypcji genów *per* i *tim*. Akumulacja białek PER i TIM w cytoplazmie, ich translokacja do jądra komórkowego oraz późniejsza degradacja w proteasomach (PER, TIM otoczone przerywaną linią) są regulowane przez kinazy (DBT, SGG, CK2) i fosfatazy (PP1, PP2A). W procesie indukowanej przez światło degradacji TIM bierze udział białko JET. Niektóre inne białka zegara tworzą dodatkowe pętle sprzężeń zwrotnych, np. niedawno opisane białko zegara CWO. Transkrypcja genu *cwo* jest aktywowana przez CLK. Powstałe białko CWO pełni rolę represora transkrypcji genów aktywowanych przez CLK (np. *per* i *tim*). **Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego**: CLK-CYC aktywują także transkrypcję genów *vri* i *Pdp1ε*. Pierwszy koduje represor, a drugi aktywator transkrypcji CLK. System jest wrażliwy na światło dzięki obecności fotoreceptora CRY. W niektórych neuronach zegara ekspresji ulega neuropeptyd PDF, sygnał dróg wyjścia. Zakończenia w kształcie strzałek oznaczają aktywację danych procesów komórkowych, zaś w kształcie litery „T" ich represję (zmienione za *Koštál*, 2010).

Pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego – hamowanie transkrypcji genów *per* i *tim*

Pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego zazwyczaj służą utrzymaniu stałego poziomu ekspresji genów. W przypadku zegara biologicznego indukują one duże zmiany w poziomie ekspresji genów w ciągu doby. W komórkach zegara *D. melanogaster* dzięki temu sprzężeniu (Ryc. 4) powstają dynamiczne, dobowe oscylacje w poziomie transkryptu genu *per* oraz w poziomie transkryptu innego, kluczowego genu zegara – genu *timeless* (*tim*, Ryc. 5).

Centralną rolę w tym mechanizmie odgrywają białka CLOCK (CLK) i CYCLE (CYC), które zawiadują rytmiczną transkrypcją kluczowych genów zegara biologicznego. Są one czynnikami transkrypcyjnymi wyposażonymi w domenę bHLH /PAS (ang. *basic-helix-loop-helix*; *Per-Arnt-Sim*). W cytoplazmie komórek zegara białka CLK i CYC tworzą ze sobą heterodimery i w tej postaci przechodzą do jądra komórkowego. Wiążą się tam z sekwencją E-box w obrębie promotorów genów *per* i *tim*, a także kontrolowanych przez zegar genów *ccg* (*clock-controlled gene*), co aktywuje ich transkrypcję. Maksymalne natężenie tego procesu ma miejsce wieczorem. Powstały w jego wyniku mRNA transportowany jest do cytoplazmy, gdzie służy jako matryca do syntezy białek PER i TIM. Ich ilość w cytoplazmie stopniowo wzrasta w ciągu nocy (Ryc. 5). PER i TIM łączą się ze sobą w heterodimery (PER-TIM) za pośrednictwem domeny PAS białka PER. Wiązanie z TIM stabilizuje PER, a obydwu tym białkom umożliwia wejście do jądra komórkowego (prawdopodobnie wraz z kinazą DOUBLETIME; DBT). Około północy, po wejściu do jądra PER-TIM rozpoczynają represję transkrypcji własnych genów oraz innych genów aktywowanych przez CLK-CYC. Pętla się zamyka. Wznowienie transkrypcji następuje dopiero, gdy degradacja białek PER i TIM w ciągu dnia znosi wywieraną przez nie represję. Poziom białka PER w cytoplazmie oraz przemieszczanie się heterodimerów PER-TIM z cytoplazmy do jądra komórkowego jest kontrolowane przez szereg procesów potranslacyjnych, między innymi proces fosforylacji (Ryc. 4).

Niedawne odkrycia ujawniły występowanie dodatkowej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego (Ryc. 4), czyli dodatkowego modułu mechanizmu hamowania transkrypcji genów *per* i *tim*. Jej elementem jest gen *cwo* (*clockwork orange*) i kodowane przez niego białko (CWO). Białko to jest represorem transkrypcji typu bHLH-O (zawiera domenę ORANGE). Hamuje transkrypcję genów aktywowanych przez CLK, w tym również genów *per* i *tim*. Ponieważ transkrypcja

genu *cwo* jest aktywowana przez CLK-CYC, a hamowana przez PER, poziom mRNA tego genu wykazuje oscylacje o podobnej fazie i amplitudzie, co inne geny aktywowane przez CLK-CYC (*per*, *tim*).

Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego – zwiększenie poziomu transkrypcji genu *Clk*

Heterodimery CLK- CYC są także głównym elementem pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego (Ryc.4), jednak w tym przypadku aktywują transkrypcję genów *vrille* (*vri*) i *PAR domain protein 1*ε (ang. *Proline and Acidic Rich domain*, *Pdp1*ε*)*. Są to geny kodujące czynniki transkrypcyjne genu *Clk,* przy czym VRI jest represorem, a PDP1 aktywatorem transkrypcji *Clk*. Czynniki transkrypcyjne VRI i PDP1 działają o innej porze doby. W przypadku *vri,* wkrótce po transkrypcji następuje translacja. Białko VRI szybko akumuluje się w cytoplazmie (osiągając najwyższy poziom o zmierzchu), po czym wchodzi do jądra komórkowego, gdzie hamuje transkrypcję *Clk* po przyłączeniu się do sekwencji V/P-box (VRI/PDP1ε box) jego promotora. Z kolei w przypadku *Pdp1*, w cytoplazmie gromadzi się mRNA. Białko PDP1 jest transportowane do jądra komórkowego dopiero późną nocą. Gdy tam dotrze aktywuje transkrypcję *Clk.*

Badania na hodowlach komórkowych *in vitro* wykazały, że VRI antagonizuje proces aktywacji promotora *Clk* przez PDP1, gdyż wiąże się do tego samego miejsca na jego promotorze. Współzawodnictwo między VRI a PDP1 o miejsce wiązania na promotorze *Clk* może więc determinować tempo transkrypcji *Clk*. U muszek, które utraciły jedną kopię genu *vri* wzrasta ekspresja *Clk*, natomiast u muszek z nadekspresją tego genu ekspresja *Clk* się obniża.

Synchronizacja zegara biologicznego do warunków dnia i nocy

Jak wcześniej wspomniano, zegar biologiczny synchronizuje rytm endogenny z rytmem zmian warunków środowiska dzięki temu, że otrzymuje informacje o zmianie czynników zewnętrznych. Rolę synchronizatorów odgrywają temperatura, pokarm lub interakcje społeczne, jednak najsilniejszym synchronizatorem zegara biologicznego są bodźce świetlne, które odbierane są przez różnego typu fotoreceptory. U muszki owocowej oprócz komórek wzrokowych w oku złożonym występują też komórki, w których fotoreceptorem, aktywowanym pod wpływem niebieskiego światła, jest należące do flawoprotein białko kryptochromu (CRY, ang. *CRYPTOCHROME*). Tego typu komórkami są także niektóre neurony zegara. CRY gromadzi się w nich w ciemności, natomiast jego ilość zmniejsza się pod wpływem światła. Okazało się, że fotoreceptor CRY odgrywa główną rolę w reakcjach fotycznych związanych z rytmami biologicznymi, gdyż bierze udział w zależnej od światła degradacji TIM. Rytmika molekularna PER jest więc synchronizowana z czasem lokalnym poprzez TIM, które jest degradowane po aktywacji fotoreceptora CRY przez światło.

Jak to się dzieje? Otóż, pod wpływem zaabsorbowanego fotonu niebieskiego światła domena karboksylowa CRY zmienia swoją konformację odsłaniając miejsca wiązania dla TIM. CRY i TIM tworzą heterodimery, zarówno wolne białko TIM, jaki i TIM występujące w kompleksach. Wiążąc się z TIM (Ryc. 4), CRY przyczynia się do jego fosforylacji przy udziale kinazy tyrozynowej, a następnie ufosforylowane białko TIM jest ubikwitynizowane przez E3 ligazę JETLAG (JET) i poddane szybkiej degradacji w proteasomach (gdy światło działa odpowiednio długo, JET indukuje także degradację w proteasomach CRY). Wynikiem dimeryzacji TIM i CRY jest więc spadek ilości TIM, a w konsekwencji także spadek ilości PER, które w postaci monomeru jest niestabilne i również ulega szybkiej degradacji w proteasomach. Transkrypcja genów *per* i *tim* jest wtedy odblokowana. Następuje zapoczątkowanie nowego cyklu.

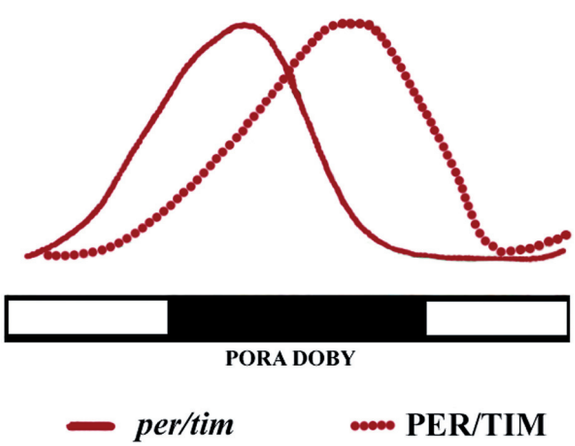
Ssaki

U ssaków, nadrzędny (główny) zegar biologiczny jest umiejscowiony w jądrach nadskrzyżowaniowych (SCN, ang. *suprachiasmatic nuclei*), które położone są w przedniej części podwzgórza nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych, po obu stronach trzeciej komory mózgu. Jest to stosunkowo mała struktura, u człowieka zbudowana z około 20 tysięcy neuronów. Podobnie jak u *D. melanogaster* rytmy okołodobowe generowane są w neuronach SCN. Obecność okołodobowych oscylacji w neuronie ujawnia komórkowo-autonomiczny mechanizm generowania rytmiki, przy czym poszczególne komórki SCN komunikują się ze sobą, przez co rytmika całej sieci neuronów zegara jest o wiele silniejsza i wyraźniejsza niż rytm pojedynczej komórki. Zlokalizowany w SCN zegar kieruje pracą lokalnych zegarów znajdujących się w komórkach różnych tkanek i narządów, na przykład wątroby, serca, układu pokarmowego czy siatkówki oka. SCN wchodzi także w interakcje z układem hormonalnym. Rytmika organizmu jest nieustannie regulowana przez cykliczne uwalnianie wielu hormonów.

Molekularny mechanizm zegara myszy, tak jak mechanizm zegara muszki owocowej, opiera się na

rytmicznej (24-godzinnej) ekspresji genów zegara. Kodowane przez geny zegara białka hamują ich transkrypcję o określonej porze doby wchodząc w interakcje z aktywatorami tej transkrypcji. Zasada działania mechanizmu zegarowego (transkrypcyjno-translacyjna pętla sprzężenia zwrotnego) jest wiec jednakowa. Nie oznacza to jednak, że nie różni się on w szczegółach.

U ssaków, centralnymi elementami mechanizmu zegarowego są dwie rodziny genów: *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) i *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*). Ich transkrypcja jest aktywowana na początku dnia przez kompleksy białek CLOCK i BMAL1 (homolog CYCLE u *Drosophila*), gdy łączą się domeną bHLH do sekwencji E-box na promotorach tych genów. Powstający mRNA ulega akumulacji w SCN w ciągu dnia, natomiast białka PER i CRY akumulują się z kilkugodzinnym opóźnieniem w stosunku do mRNA. Gdy poziom białek w neuronach SCN osiąga maksimum, poziom mRNA zaczyna się obniżać. Dzieje się tak dlatego, że wiązanie się PER 1, 2, 3 z CRY1 i CRY2 prowadzi do inhibicji transkrypcji aktywowanej przez heterodimery BMAL1-CLK. Pełniąc taką rolę, CRY staje się głównym elementem mechanizmu zegara biologicznego ssaków. Zmiana roli tego białka ze stymulatora transkrypcji genów *per* i *tim* u muszki owocowej na jej represor u myszy, stanowi zagadkowy i fascynujący zwrot w ewolucji molekularnego mechanizmu zegara biologicznego. Jednocześnie dotychczasowe badania zdają się wskazywać na to, że u myszy białko to straciło funkcję fotoreceptora, chociaż pełni ją u organizmów tak różnych jak rośliny i owady.



Ryc. 5. Dobowy wzór ekspresji genów *per* i *tim* u *D. melanogaster*. Linia ciągła oznacza dobowe zmiany w ilości transkryptów (mRNA), natomiast linia punktowana zmiany ilości białek. Najwyższy poziom transkryptów występuje na początku nocy, natomiast najwyższy poziom białek pod koniec nocy. Faza okołodobowego rytmu białka jest znacznie przesunięta w stosunku do fazy rytmu odpowiedniego mRNA, co sugeruje występowanie pętli sprzężenia zwrotnego między procesem transkrypcji a translacji.

Choć wiadomo, że CRY łączy się z CLOCK i BMAL1, szczegóły tego hamowania zwrotnego nadal nie są jasne. Wydaje się, że kluczową rolę w procesie aktywacji lub represji transkrypcji pełni koniec C białka BMAL1. Być może jest więc przełącznikiem między tymi dwoma procesami. Z pewnością sprzężenie to jest kluczowe w procesie generowania oscylacji, gdyż u myszy mutanty *Clock* i *Bmal1*, u których nie działa sprzężenie zwrotne, nie podtrzymują okołodobowych oscylacji w ekspresji genów.

Cechą charakterystyczną molekularnego mechanizmu zegara biologicznego ssaków, tak jak i *D. melanogaster*, jest obecność zachodzących na siebie pętli sprzężeń zwrotnych. Wydaje się, że w molekularnym mechanizmie zegara ssaków, podobnie jak u muszki, występuje dodatkowa pętla ujemnego hamowania zwrotnego. Głównymi elementami tej pętli są geny *Dec1* i *Dec2*, - ortologi genu *cwo* u *D. melanogaster*. Kodują one białka typu bHLH, które mogą tworzyć ze sobą dimery i jako takie wiązać się z DNA, aby wpływać na ekspresję genów.

Pętla sprzężenia ujemnego jest także u ssaków dodatkowo stabilizowana przez pętlę sprzężenia dodatniego, która kontroluje ekspresję genu *Bmal1*. W pętli tej rolę analogiczną do roli VRI u muszki pełni receptor jądrowy REV-ERBα, który hamuje transkrypcję *Bmal1* poprzez łączenie się z elementami regulatorowymi RORE (*REV-ERBα/ROR responsive elements*) w obrębie jego promotora.

Rytmy okołodobowe są także ściśle regulowane poprzez zachodzącą po translacji modyfikację białek (ang. *post-translational modifications*). Wiele spośród mutacji genetycznych wywołujących zmiany w potranslacyjnej modyfikacji białek zegara wywołuje także zmiany w rytmice zachowania organizmów.

Aby poprawnie funkcjonować jako chronometr czasu środowiskowego SCN musi reagować na światło, które jest wiarygodnym wskaźnikiem cyklicznych zmian dnia i nocy. Informacje świetlne ze środowiska docierają do SCN bezpośrednio z siatkówki oka, a kluczową rolę w tym procesie odgrywa grupa wyspecjalizowanych, światłoczułych komórek zwojowych siatkówki (ang. *ipRGCs – intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*; 1–3% wszystkich komórek zwojowych siatkówki), zawierających pigment melanopsynę.

Czy istnieją także inne rodzaje oscylatorów?

W przedstawionym powyżej molekularnym mechanizmie zegara biologicznego kluczową rolę odgrywają dobowe zmiany w poziomie transkrypcji jego genów. Najnowsze badania, które opublikowano

w styczniu tego roku wskazują na to, że powstawanie dobowych fluktuacji molekularnych procesów komórkowych jest także możliwe bez oscylacji w natężeniu procesu transkrypcji. Zegar, w którym transkrypcja nie jest kluczowym elementem mechanizmu generującego oscylacje znaleziono w czerwonych krwinkach człowieka. W ludzkich erytrocytach (które jak wiadomo pozbawione są jądra komórkowego) obserwuje się okołodobową rytmikę procesów komórkowych pomimo tego, że w komórkach tych w ogóle nie zachodzi proces transkrypcji. Wykazano, że w 24-godzinnym rytmie ulegają utlenianiu i redukcji enzymy zwane peroksyredoksynami (PRX, ang. *peroxiredoxins*), które regulują poziom reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Rytm ten jest rytmem endogennym, gdyż występuje także w stałych warunkach środowiska.

Co ciekawe, niezależny od transkrypcji oscylator znaleziono także u glonów. Może to oznaczać, że tego typu zegary są powszechne u organizmów żywych. Dalsze badania pozwolą wyjaśnić jaki jest ich dokładny mechanizm, czy oksydacja PRX jest elementem mechanizmu zegara erytrocytów, a czy może jest tylko „wskazówkami" tego zegara.

Dr Jolanta Górska-Andrzejak jest adiunktem w Zakład Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii UJ w Krakowie.
E-mail: j.gorska-andrzejak@uj.edu.pl

TAJEMNICA JEZIORA ACRAMAN

Marek S. Żbik (Australia)

Odkrycie

Wszystko zaczęło się w 1979 r. kiedy pracownik koncernu BHP Minerals, George Williams studiował fotografie z satelity Landsat jako zakrojoną na dużą skalę kampanię poszukiwania nowych złóż surowców mineralnych w trudno dostępnych częściach Australii. Przeglądając zestaw fotografii pochodzących z wulkanicznego masywu Gawler położonego w centralnej części półwyspu Erie w Australii Południowej uwagę jego przykuła dziwna geologiczna struktura kolista w miejscu w którym położone jest słone jezioro Acraman. George, przywykły do interpretacji zdjęć satelitarnych zrozumiał natychmiast, że może to być ślad dawnej katastrofy kosmicznej i postanowił czym prędzej wyruszyć w ten rejon, by pobrać próbki skał dla badań mineralogicznych. Niestety we wrześniu 1979 r. w związku z intensywnymi opadami deszczu teren ten nie był dostępny dla eksploracji. Udało mu się jednak dotrzeć tam w maju 1980 r. Na miejscu, badając skały wulkaniczne, których wychodnie w wielu miejscach przebijały się poprzez białą jak śnieg taflę soli, stwierdził że skały są niezwykle silnie spękane i w wielu miejscach widoczne są tak zwane stożki uderzeniowe, świadectwo ogromnej katastrofy jaka się tu wydarzyła przed milionami lat.

Pobrane próbki skał Roger przekazał do laboratorium gdzie stwierdzono, że w ziarnach kwarcu widoczne są siateczki równoległych linii. Takie linie stwierdzono wcześniej jako wywołane metamorfizmem uderzeniowym powstałym jako efekt zderzenia się ciała kosmicznego o olbrzymiej energii kinetycznej z Ziemią i znane jako linie PDF (ang. *planar deformation features*). Wyniki badań mikroskopowych oraz makroskopowo widoczne stożki uderzeniowe prowadziły do jedynej konkluzji, jezioro Acraman jest pozostałością po ogromnej katastrofie kosmicznej jaka wydarzyła się tu w dawnych epokach geologicznych.

Ryc. 1. Lokalizacja zdarzenia.

Biorąc pod uwagę, że erozja odsłoniła jedynie głębokie korzenie dawnego krateru, można było przypuszczać, iż współczesne rozmiary tej kolistej struktury geologicznej oceniane na 30 km stanowią dolną granicę średnicy pierwotnego krateru. Rozmiary te postawiły Acraman jako największy krater meteorytowy znaleziony kiedykolwiek w Australii. Pozostało pytanie kiedy wydarzyła się katastrofa kosmiczna w miejscu jeziora Acraman. Na to z pozoru proste pytanie nie było jednak jasnej odpowiedzi. Wiek skał