

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Μοριακοί μηχανισμοί κικκάδιων ρυθμών: μελέτη σε πειραματόζωα και οι πρώτες ενδείξεις στον άνθρωπο

Μ. Τσαούσογλου¹
Δ. Μπερή²
Α. Βγόντζας³
Γ. Χρούσος¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο βηματοδότης είναι μία αυτοσυντηρούμενη λειτουργική οντότητα, εντοπιζόμενη στους υπερχιασματικούς πυρήνες του εγκέφαλου, που επιτρέπει στους οργανισμούς να αντιμετωπίζουν ή να ανταποκρίνονται σε χρονικά συγκεκριμένες λειτουργίες. Αυτός ο βηματοδότης, ο οποίος είναι επίσης γνωστός ως «κικκάδιο ρολόι», θα πρέπει να είναι συντονισμένος με τον περιβαλλοντικό χρόνο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται φυσιολογική ομοιόσταση. Τα clock genes (γονίδια ρύθμισης κικκάδιου ρυθμού) κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες εισέρχονται στον πυρήνα και καταστέλλουν τη μεταγραφή ομοειδών γονιδίων τους, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο συντονισμός με τον περιβαλλοντικό χρόνο. Η ανασκόπηση υπογραμμίζει τις δομικές και λειτουργικές παραμέτρους αυτών των clock genes, καθώς και τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων υποστηρίζουν την οργάνωση του συστήματος του κικκάδιου ρυθμού. (*Δελτ Α' Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών 2006, 53(2):125-133*)

Λέξεις ευρητηριασμού: βηματοδότης, κικκάδιο ρολόι, γονίδια ρύθμισης κικκάδιου ρυθμού, μοριακοί μηχανισμοί, κικκάδιοι ρυθμοί.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος «κικκάδιος» προέρχεται από τις λατινικές λέξεις «circa», που σημαίνει «περίπου» και «dies» που σημαίνει «ημέρα». Οι κικκάδιοι ρυθμοί είναι αυτοσυντηρούμενοι, περίπου 24ωροι ρυθμοί (24.2)¹, οι οποίοι υπάρχουν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, από τους μονοκύτταρους οργανισμούς έως τα θηλαστικά, και επιτρέπουν στον οργανισμό να ανταπεξέρχεται στον κύκλο φωτός - σκοταδιού. Ορίζονται βάσει τριών φαινομενολογικών κριτηρίων^{2,3}. Το πρώτο κριτήριο είναι ότι οι κικκάδιοι ρυθμοί επιμένουν σε σταθερές συνθήκες, με ενδογενή κικκαδιανή περίοδο περίπου 24 ωρών. Το δεύτερο κριτήριο είναι ότι αυτοί οι ρυθμοί είναι ανεξάρτητοι της θερμοκρασίας, έτσι ώστε να εξελίσσονται σχεδόν πάντοτε με τον ίδιο ρυθμό (ίδια περιοδικότητα), ανεξάρτη-

¹Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία»

²Τμήμα Ινκουστικής, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία»

³Hersey University Medical Scholl, Pennsylvania State University, Hersey, Pennsylvania, USA

τα της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Τέλος, το τρίτο κριτήριο είναι ότι αυτοί οι ενδογενείς ρυθμοί, περίπου 24 ωρών, μπορούν να συγχρονιστούν σε ακριβώς 24 ώρες, επηρεασμένοι από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως κύκλοι φωτός/ σκοταδιού, κοινωνικές αλληλεπιδράσεις κ.ά.

Το κिरκάδιο σύστημα των θηλαστικών απαρτίζεται από τρεις κύριες συνιστώσες, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή και το συντονισμό του βηματοδότη³: α) έναν ενδογενή κिरκάδιο βηματοδότη, β) μία οδό εισροής δεδομένων (input pathway), για την ανίχνευση και τη σηματοδότηση περιβαλλοντικών χρονικών υποδείξεων (παραμέτρων) για το συντονισμό του βηματοδότη και γ) οδούς «εκροής» πληροφοριών (output pathway), για την έκφραση έκδηλων ρυθμών περιοδικότητας στη βιοχημεία, φυσιολογία και συμπεριφορά του οργανισμού.

Ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) είναι ένα αμφοτερόπλευρο συμμετρικό όργανο, το οποίο εντοπίζεται άνωθεν του οπτικού χιάσματος του προσθίου υποθαλάμου και επί τα εκτός της τρίτης κοιλίας^{5,6}. Αφορά σε ένα ζεύγος μικροκυτταρικών νευρικών σωματίων, το οποίο απαρτίζεται από μικρά κυτταρικά σωματίδια, που είναι χωρισμένα σε δύο μέρη, ανάλογα με τις νευροδραστικές ουσίες και τις οπτικές προσεκβολές. Ο πρώτος επιστήμονας που διαπίστωσε την ύπαρξη της οδού εισαγωγής δεδομένων φωτός και ως επακόλουθο το ρόλο του SCN, ήταν ο Robert Moore⁶, τη δεκαετία του 1970. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένα αμινοξέα κατάφερε να ταυτοποιήσει την ύπαρξη της αμφιβληστροειδο-υποθαλαμικής οδού (RHT), η οποία προσεκβάλλει στο SCN. Αν και ο SCN περιγράφηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1920 από τον Gurdjian, η σημασία του, όσον αφορά σε σχέση με τους κिरκάδιους ρυθμούς^{7,8}, εδραιώθηκε στη δεκαετία του 1970, μετά από τη διαπίστωση μίας σειράς διαταραχών του SCN.

Η ικανότητα των οργανισμών να αντεπεξέρχονται ή να ανταποκρίνονται σε χρονικά-ειδικές συμπεριφορές, εξαρτάται από το συγχρονισμό του ενδογενούς «ρολογιού» τους με τον περιβαλλοντικό χρόνο. Η ενσωμάτωση ή συγχρονισμός είναι η διαδικασία μέσω της οποίας ένας περιβαλλοντικός ρυθμός, όπως ο κύκλος σκοταδιού - φωτός, μπορεί να ρυθμίσει την ενδογενή περιοδικότητα ενός αυτοσυντηρούμενου κिरκάδιου ρολογιού, με τέτοιο τρόπο, ώστε και οι δύο ρυθμοί να επαναλαμβάνονται με την ίδια σχέση φάσης. Όπως επισημάνθηκε από τον Wright και τους συνεργάτες του, «η ενδογενής κिरκάδια περιο-

δικότητα ορίζεται ως η ακριβής περίοδος, η οποία απορρέει από τον ίδιο τον κिरκάδιο βηματοδότη σε δεδομένη χρονική στιγμή και η οποία είναι διακριτή από τις παρατηρούμενες κिरκάδιες περιοδικότητες, που επηρεάζονται από εξωγενή κिरκάδια ερεθίσματα, τα οποία επιδρούν στο βηματοδότη κατά τη χρονική διάρκεια παρατήρησης⁹. Αυτοί οι παράγοντες συγχρονισμού ορίζονται και ως zeitgebers (όρος που προέρχεται από τις γερμανικές λέξεις «zeit»-χρόνος και «geber»-δότης), συντονιστές και χρονικές υποδείξεις (time cues).

Αρκετά χρόνια παλαιότερα, εθεωρείτο ότι οι κοινωνικές επαφές αντιπροσώπευαν τις επικρατούσες περιβαλλοντικές χρονικές υποδείξεις για το συγχρονισμό των ανθρώπινων κिरκάδιων ρολογιών. Έκτοτε, έχει αποδειχθεί ότι ο κिरκάδιος βηματοδότης των θηλαστικών είναι περισσότερο ευαίσθητος στο φως, συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη χρονική υπόδειξη¹⁰. Αρκετές μελέτες¹⁰⁻¹⁵ έχουν δείξει ότι το φως είναι ο κύριος περιβαλλοντικός συντονιστής του κिरκάδιου βηματοδότη στους ανθρώπους.

Οι πληροφορίες σχετικά με το φως καθίστανται αντιληπτές μέσω ειδικών φωτοευαίσθητων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, τα οποία έχουν άμεσες προσεκβολές στον SCN¹⁶⁻¹⁸, στη θέση εντόπισης του κिरκάδιου βηματοδότη των θηλαστικών, μέσω της μονοσυναπτικής RHT. Μελέτες που διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια, των οποίων τα ραβδία και τα κωνία είχαν καταστραφεί πλήρως, έδειξαν ότι τα ποντίκια διαθέτουν επιπρόσθετους οφθαλμικούς φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι τους επιτρέπουν να ελέγχουν την κिरκάδια ρυθμικότητα¹⁹. Αυτό υποδηλώνει ότι άλλοι φωτοϋποδοχείς στον αμφιβληστροειδή είναι κυρίως υπεύθυνοι για το συντονισμό των κिरκάδιων ρυθμών, οι οποίοι όμως δρουν συμπληρωματικά με το σύστημα ραβδίων/κωνίων. Πρόσφατα στοιχεία¹⁷ υποδηλώνουν ότι οι φωτοϋποδοχείς συντονισμού είναι αμφιβληστροειδικά γαγγλιακά κύτταρα (RGCs) που προσεκβάλλουν στον SCN. Η μελανοψίνη είναι μία πρωτεΐνη δίκην-οψίνης και εικάζεται ότι αντιπροσωπεύει την οπτική χρωστική των RGCs, που κατευθύνουν το κिरκαδιανό ρολόι¹⁸.

ΚΙΡΚΑΔΙΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Κατά τη διάρκεια της περασμένης δεκαετίας, αρκετές μελέτες διερεύνησαν τους κिरκάδιους ρυθμούς σε μοριακό επίπεδο. Οι πρώτες ενδείξεις ότι οι κिरκάδιοι ρυθμοί ελέγχονται μέσω γονιδίων παρουσιάστηκαν από τους Ronald Konopka και

Seymour Bezner, οι οποίοι μετά από μία σειρά γενετικών ελέγχων οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη του period (per) locus στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*. Αναλύοντας per μεταλλαγμένες μύγες και ακολούθως επιπρόσθετα clock genes τα οποία ταυτοποιήθηκαν, παρατήρησαν ότι η μετάλλαξη αυτών των γονιδίων μπορεί είτε να επιταχύνει, είτε να επιβραδύνει τη διάρκεια της περιοδικότητας της κερκάδιας ρυθμικότητας, ή ακόμη και να εξαλείψει πλήρως την ικανότητα της μύγας να επιδεικνύει ρυθμικότητα²⁰⁻²².

Σήμερα πιστεύεται, ότι τα clock genes είναι η «μηχανή» του κερκάδιου μηχανισμού και η ρύθμιση των κερκάδιων ρυθμών σε μοριακό επίπεδο μεσολαβείται μέσω αντιγραφής και μετάφρασης αυτορυθμιζόμενων αγκυλών. Αυτές οι αγκύλες παλίνδρομης ρύθμισης (feedback loops) απαρτίζονται από θετικές και αρνητικές συνιστώσες, ώστε να επιτυγχάνεται μια περιοδική μεταβολή (ταλάντωση). Ο ρόλος των θετικών συνιστωσών είναι να ενεργοποιείται η μεταγραφή των clock genes και οι προκύπτουσες μεταφρασμένες clock-πρωτεΐνες να δρουν ως αρνητικές συνιστώσες που αναστέλλουν τη δράση των θετικών συνιστωσών.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί δώδεκα πυρηνικά κερκάδια clock genes, τα οποία είναι: Clock, Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1, Cry 2, Bmal/Mop3, Bmal2/Mop9, Npas2/Mop4, Tim, CKIε και Rev-Erba. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων σχηματίζουν τον πρωτογενή κερκάδιο, περιοδικά μεταβαλλόμενο, μοριακό μηχανισμό. Όλα τα γονίδια των θηλαστικών, τα προϊόντα τους και οι ιδιότητές τους παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1.

ΠΥΡΗΝΙΚΑ CLOCK GENES

Period genes (Per1, Per2, Per3). Και τα τρία αυτά γονίδια είναι μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας PAS: πρόκειται για τομείς αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με πρωτεΐνες οι οποίες μεσολαβούν για το σχηματισμό ετεροδιμερών. Το Π αντιπροσωπεύει το Per, το Α αντιπροσωπεύει τον ανθρώπινο aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator και το Σ αντιπροσωπεύει την single minded πρωτεΐνη²³. Τα μεταφρασμένα πρωτεϊνικά προϊόντα τους δρουν ως αρνητικές συνιστώσες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των ίδιων τους των γονιδίων. Οι φορείς μηδενικών μεταλλάξεων (null mutants) του Per1 locus εμφανίζουν κερκάδιο φαινότυπο περίπου 1 ώρα βραχύτερο και απώλεια της ρυθμικότητας μετά από τουλάχιστον δύο εβδομάδες^{22,24}. Οι ομοζυγώτες

της μετάλλαξης Per2 εμφανίζουν έναν ουσιαστικό κερκάδιο φαινότυπο με περίοδο εγρήγορσης (free-running period) βραχύτερη κατά 1,5 ώρες^{22,24}. Οι φορείς της μετάλλαξης Per3 έχουν ελαφρά μικρότερη περιοδικότητα, όμως η απουσία της πρωτεΐνης PER3 δεν συνδυάστηκε με σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη κερκάδια συμπεριφορά και ως εκ τούτου, δεν θεωρείται σημαντική συνιστώσα του μηχανισμού του κερκάδιου ρολογιού²⁵.

Cryptochrome genes (Cry1, Cry2). Τα γονίδια Cry1, Cry2 είναι μέλη της οικογένειας των φλαβοπρωτεϊνών, που κωδικοποιούν συνιστώσες με αρνητική δράση στην κερκάδια μοριακή ρυθμιστική συσκευή. Μετά την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες PER, τις μετατοπίζουν από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου αναστέλλουν τη δράση των θετικών συνιστωσών (OMIM). Οι φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το Cry1 επιδεικνύουν περίοδο εγρήγορσης βραχύτερη περίπου κατά μία ώρα, ενώ οι φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το Cry2 επιδεικνύουν περίοδο μεγαλύτερη περίπου κατά μία ώρα. Τα γονίδια Cry1 και Cry2 χαρακτηρίζονται, κατά συνέπεια, ως δύο αντίθετης δράσης ταλαντωτές²⁶.

Clock gene. Το γονίδιο Clock κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας-αγκυλής-έλικας (bHLH)-PAS. Ο τομέας bHLH διευκολύνει τη DNA-σύνδεση, τον πρωτεϊνικό διμερισμό και τομείς ενεργοποίησης²⁴, δρώντας έτσι ως θετική συνιστώσα, η οποία κατευθύνει τη μεταγραφή clock genes²⁷. Και οι ομοζυγώτες και οι ετεροζυγώτες φορείς Clock μεταλλάξεων²² παρουσίασαν δραματική αύξηση της κερκάδιας περιοδικότητας κατά περίπου 4 ώρες, ακολουθούμενη μετά από μία βραδεία κερκάδια ρυθμικότητα και τελικά από πλήρη απώλεια της ρυθμικότητας σε ομοζυγώτες της μετάλλαξης.

Bmal1/Mop3 gene. Αυτό το γονίδιο είναι μέλος της οικογένειας των (bHLH)-PAS μεταγραφικών παραγόντων, επιδεικνύοντας τα ίδια χαρακτηριστικά με το Clock gene που αναφέρθηκαν παραπάνω και δρώντας ως το ετεροδιμερές ζεύγος του. Οι φορείς μεταλλάξεων²¹ Bmal1/Mop3 εμφανίζουν άμεση και πλήρη απώλεια της κερκάδιας ρυθμικότητας.

Bmal2/Mop9 gene. Πρόκειται για μία Bmal1/Mop3 παραλλαγή, για την οποία δεν υπάρχουν διαθέσιμοι φορείς μετάλλαξης²⁴.

Npas2/Mop4 gene. Επίσης μέλος της οικογένειας των (bHLH)-PAS μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρά με το Bmal1/Mop3, ενεργοποιώντας

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. CLOCK GENES ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ: ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Γονίδιο (ανθρώπινο)	Γονδιακός τόπος (ποντίκι/ άνθρωπος)	Ιδιότητες	Ταξινόμηση	Ρόλος clock γονιδίου	Έκφραση (Peak CT)	Φαινότυπος μετάλλαξης
Clock (CLOCK)	5/4q12	Μεταγραφικός παράγοντας, DNA σύνδεση, πρωτεϊνικός διμερισμός, το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του Per1	bHLH-PAS	Θετική συνιστώσα	Ιδιοσυστασιακό	Επιμήκυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~4 ώρες, βράχυνση κερκάδιας ρυθμικότητας, ανθρώπνες διαταραχές
Per1 (PER1)	11/17p12	Αλληλεπιδρά με τα PERs και τα CRYs, ρυθμίζει το PER2 σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, CLOCK-BMAL1 αναστολέας	PAS-τομέας	Αρνητική συνιστώσα	CT4 στο SCN, CT10 στον αμφιβληστροειδή	Βράχυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~1 ώρα, οι ομοζυγώτες της μετάλλαξης Per1-Per2 είναι άρρυθμοι
Per2 (PER2)	1/2q37,3	Ρυθμίζει την έκφραση των clock genes σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, CLOCK-BMAL1 αναστολέας	PAS-τομέας	Αρνητική συνιστώσα	CT8 στο SCN, CT14 στον αμφιβληστροειδή	Βράχυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~1,5 ώρα, οι ομοζυγώτες της μετάλλαξης Per1-Per2 είναι άρρυθμοι
Per3 (PER3)	4/1	Κανένας σημαντικός ρόλος στο κερκάδιορολοι, αλληλεπίδραση PER/CRY	PAS-τομέας	Αρνητική συνιστώσα	CT6 στο SCN, CT10-14 στον αμφιβληστροειδή	Βράχυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~0,5 ώρα
Cry1 (CRY1)	10C/12q23 -q24,1	Ανοστέλλει την CLOCK-BMAL1 δραστικότητα, τα Cry1/Cry2 είναι αντίθετης δράσης ταλαντωτές, αλληλεπιδρά με τα PERs	Φλαβοπρωτεΐνη	Αρνητική συνιστώσα	CT4 στο SCN, CT14 στον αμφιβληστροειδή	Βράχυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~1 ώρα, οι ομοζυγώτες της μετάλλαξης Cry1-Cry2 είναι άρρυθμοι
Cry2 (CRY2)	2E/11	Ανοστέλλει την CLOCK-BMAL1 δραστικότητα, τα Cry1/Cry2 είναι αντίθετης δράσης ταλαντωτές, αλληλεπιδρά με τα PERs	Φλαβοπρωτεΐνη	Αρνητική συνιστώσα	CT12 στο SCN, CT9 στον αμφιβληστροειδή	Επιμήκυνση κερκάδιας περιόδου κατά ~1 ώρα, οι ομοζυγώτες της μετάλλαξης Cry1-Cry2 είναι άρρυθμοι
Bmal1/Mor3 (ARNTL)	7F2- F3/11P15	Μεταγραφικός παράγοντας, σχηματίζει το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 το οποίο ενεργοποιεί την μεταγραφή του Per1	bHLH-PAS	Θετική συνιστώσα	CT4 στο SCN, CT10 στον αμφιβληστροειδή	Άμεση απώλεια κερκάδιας ρυθμικότητας

Γονίδιο (ανθρώπινο)	Γονιδιακός τόπος (ποντίκι/ άνθρωπος)	Ιδιότητες	Ταξινόμηση	Ρόλος clock γονιδίου	Έκφραση (Peak CT)	Φαινότυπος μετάλλαξης
Bmal1/Mor3 (ARNTL)	7F2- F3/11P15	Μεταγραφικός παράγοντας, σχηματίζει το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 το οποίο ενεργοποιεί τη μεταγραφή του Per1	bHLH-PAS	Θετική συνιστώσα	CT4 στο SCN, CT10 στον αμφιβληστροειδή	Άμεση απώλεια κirkάδιας ρυθμικότητας
Bmal2/Mor9 (ARNTL2)	6/12	Μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρά με το CLOCK, Bmal1 paralog	bHLH-PAS	Θετική συνιστώσα	Όχι προσδιορισμένο	Δεν υπάρχουν διαθέσιμοι φορείς της μετάλλαξης
Npas2/Mor4 (NPAS2)	1/2q13	Μεταγραφικός παράγοντας, αλληλε- πιδρά με το BMAL1 και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων Per1, Per2 και Cry1, CLOCK paralog	bHLH-PAS	Θετική συνιστώσα	Όχι προσδιορισμένο	Βράχυνση κirkάδιας περιόδου κατά ~0,2 ώρες, τροποποιημένη προσαρμοστικότητα συμπεριφοράς και ύπνου
Timeless (TIMELESS)	10/12q12-q13	Συσχέτιση με τα PERs, Per-Per αλληλε- πιδράσεις έχουν αντικαταστήσει Per-Tim αλληλεπιδράσεις οι οποίες παρατηρούνται στην Δροσόφylla	PER- αλληλεπιδραση	Συνιστώσα διευκόλυνσης	Ιδιοσυστασιακό	Πρώιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα σε ομόζυγους φορείς της μετάλλαξης
CKIε (CSNK1E)	15/22q-q13	Φωσφορύλιωση των γονιδίων Per, Cry και Bmal1	Κινάση καζείνης	Αρνητική συνιστώσα	Ιδιοσυστασιακό	Η μετάλλαξη Tau βραχύνει την κirkάδια περίοδο κατά ~0,4 ώρες
Rev-Erba (NR1D1)	11/17q11,2	Κύριος ρυθμιστής της κυκλικής BMAL1 μεταγραφής, συνδέει τα θετικά και αρνητικά σκέλη της σγκύλης παλίνδρομης ρύθμισης	Ορφανός πυρηνικός υποδοχέας	Αρνητική συνιστώσα	CT4 στο SCN, CT4 στον αμφιβληστροειδή	Βράχυνση κirkάδιας περιόδου κατά ~0,4 ώρες

τη μεταγραφή των clock genes *Per1*, *Per2* και *Cry1*. Οι φορείς μεταλλάξεων του *Npas2/Mor4* έχουν λίγο βραχύτερη περίοδο εγρήγορσης, περίπου κατά 0,2 ώρες, και επιδεικνύουν τροποποιημένο ύπνο και προσαρμοστικότητα συμπεριφοράς²⁴.

Timeless gene (Tim)

Το *Tim* έχει περιγραφεί ως συνιστώσα διευκόλυνσης, η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με τα γονίδια *Per*. Αν και έχει αποδειχθεί ότι στη *Drosophila* το *Tim* αλληλεπιδρά με το *Per* και συμμετέχει σε μία ενδοκυττάρια αγκύλη παλίνδρομης ρύθμισης μεταγραφής/μετάφρασης, η οποία είναι ο κεντρικός μηχανισμός του ρολογιού, στα θηλαστικά, η αλληλεπίδραση *Per-Tim* έχει αντικατασταθεί από αλληλεπίδραση *Per-Per*²⁴. Οι ομόζυγες μεταλλάξεις²² του *Tim* οδήγησαν σε πρώιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα, ενώ οι ετεροζυγώτες αυτών των μεταλλάξεων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές με τα ζώα αγρίου τύπου.

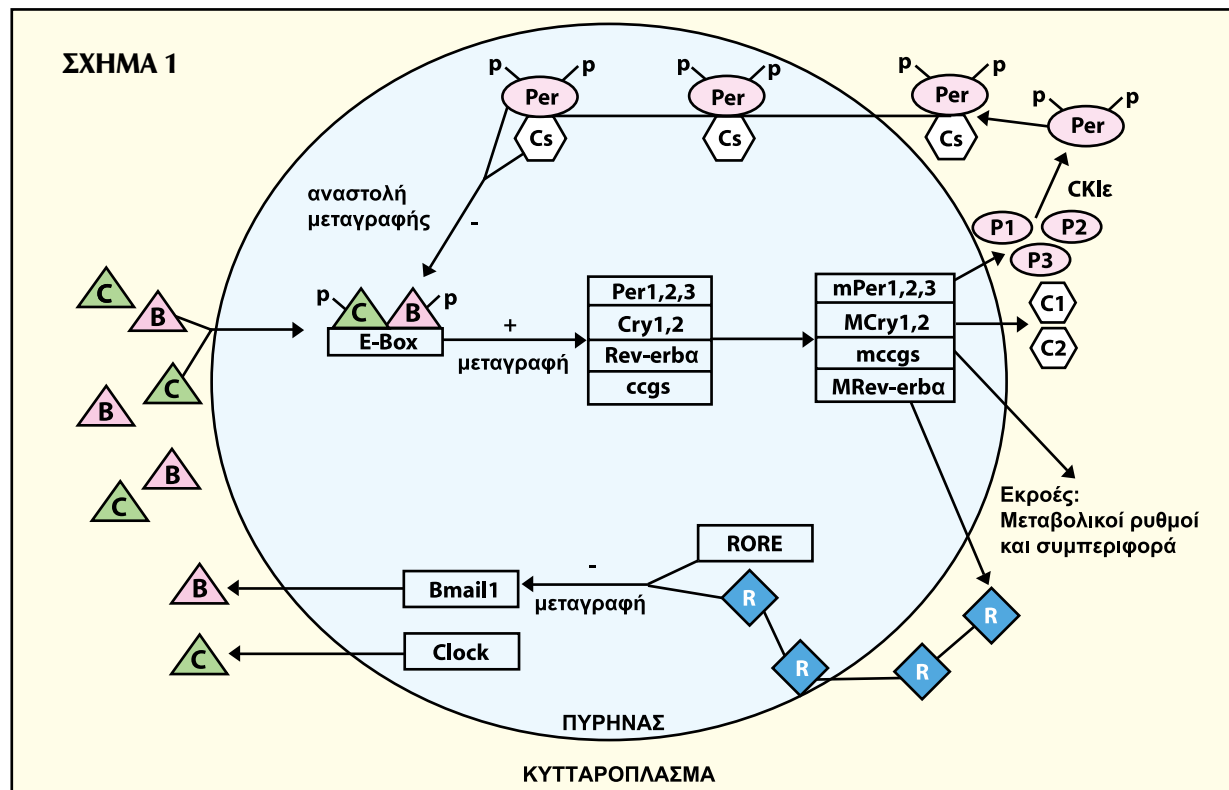
Casein kinase I, epsilon (CKIε)

Η CKIε είναι ένα μέλος των σερίνη/θρεονίνη κινά-

σών και είναι το μόνο ένζυμο που έχει αναγνωριστεί έως σήμερα ανάμεσα στα πυρηνικά clock genes. Ο πιο σημαντικός ρόλος της CKIε είναι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών *Per*. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι προάγει τη φωσφορυλίωση σε όλα τα πυρηνικά clock genes²⁸, καταλήγοντας τελικά στην αποδόμησή τους, πιθανότατα μέσω της οδού ubiquitin-proteasome. Οι φορείς μεταλλάξεων *Tau* εμφάνισαν μία C-T transition στο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την CKIε, οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης εμφάνισαν βράχυνση της κερκάδιας περιόδου κατά περίπου 2 και 4 ώρες αντίστοιχα²².

Rev-Erb-alpha gene (Rev-Erba)

Το *Rev-Erba* κωδικοποιεί έναν ορφανό πυρηνικό υποδοχέα και ο ρόλος του είναι να συνδέσει το θετικό με το αρνητικό σκέλος της αγκύλης παλίνδρομης ρύθμισης. Επιπρόσθετα, είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυκλικής *Bmal1* μεταγραφής. Αν και *Rev-Erba* knockout ζώα εμφανίζουν μικρή βράχυνση της κερκάδιας περιόδου²⁹, το γονίδιο αυτό δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή ρυθμού.



B: BMal1, C: Clock, P1: Per1, P2: Per2, P3: Per3, C1: Cry1, C2: Cry2, R: Rev-Erba, ccgs: clock ελεγχόμενα γονίδια, RORE: σχετιζόμενα με ρετινοϊκό οξύ συστατικά ανταπόκρισης ορφανού υποδοχέα.

Ο μηχανισμός περιοδικότητας των θηλαστικών.

Η δημιουργία του 24ώρου περιοδικού μηχανισμού των θηλαστικών εξαρτάται από ένα στενά ελεγχόμενο συντονισμό και έκφραση συγκεκριμένων clock γονιδίων. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων αυτών συμμετέχουν στον 24ωρο κύκλο, μέσω του αρνητικού σκέλους της αγκύλης παλίνδρομης ρύθμισης, όπου αναστέλλουν τους εκκινητές τους.

Τα βήματα του κερκάδιου κύκλου παρίστανται στο σχήμα 1 και έχουν ως εξής:

B: Bmal1, C: Clock, P1: Per1, P2: Per2, P3: Per3, C1: Cry1, C2: Cry2, R: Rev-Erba, ccgs: clock ελεγχόμενα γονίδια, PORE: σχετιζόμενα με ρετινοϊκό οξύ συστατικά ανταπόκρισης ορφανού υποδοχέα.

1. Ο κύκλος ξεκινά το πρωί όπου το σύμπλοκο BMAL1/CLOCK μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων Per και Cry, μέσω σύνδεσης με μία ειδική ακολουθία βάσεων DNA, το E-box (CACGTG)^{30,31}.

2. Τα επίπεδα των Per και Cry αγγελιοφόρων RNAs κορυφώνονται στη μέση-έως-όψιμη κερκάδια ημέρα και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ριβοσωμάτια συνδέονται με τα αγγελιοφόρα RNAs, όπου μεταφράζουν το γενετικό τους υλικό σε πρωτεΐνες²⁷.

3. Αργότερα, η CKIε, μία ενζυμική κινάση, προάγει τη σταδιακή φωσφορυλίωση της PER πρωτεΐνης, η οποία στη συνέχεια θα σχηματίσει ένα σταθερό ετεροδιμερές σύμπλοκο με το CRY³². Η φωσφορυλίωση και η πρωτεόλυση των clock-πρωτεϊνών μπορεί να καθορίσει την κυτταρική τους εντόπιση και σταθερότητα, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του 24ωρου μοριακού μηχανισμού³³.

4. Το βράδυ, περίπου 4 ώρες αργότερα, το σύμπλοκο PER/CRY θα μετακινηθεί στον πυρήνα²⁴.

5. Μετά τη μετακίνηση στον πυρήνα, το σύμπλοκο PER/CRY ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλέγματος BMAL1/CLOCK, ελαττώνοντας έτσι τα επίπεδα Per και Cry mRNA.

6. Η αναστολή οδηγεί σε σταδιακή απώλεια των Per και Cry mRNA και των PER και CRY πρωτεϊνών, που θα εξαφανιστούν πλήρως εντός των επόμενων 12 ωρών, ελευθερώνοντας έτσι την αναστολή στους μεταγραφικούς ενεργοποιητές BMAL1 και CLOCK, με αποτέλεσμα να ξαναρχίσει ο κύκλος³⁴.

7. Επιπρόσθετα, το BMAL1/CLOCK διμερές σύμπλοκο ενεργοποιεί ταυτοχρόνως τη μεταγραφή του γονιδίου ορφανού πυρηνικού υποδοχέα Rev-Erba²⁹. Η REV-ERBA πρωτεΐνη συνδέει «σχετιζόμενα

με το ρετινοϊκό οξύ - συστατικά ανταπόκρισης του ορφανού υποδοχέα» (ROREs-retinoic acid-related orphan receptor response elements) με τους υποκινητές τους και αναστέλλει τη μεταγραφή από το γονίδιο Bmal1 και πιθανότατα από τα γονίδια Clock και Cry1^{34,35}.

8. Τέλος, το BMAL1/CLOCK σύμπλεγμα ενεργοποιεί ορισμένα γονίδια τα οποία δεν αποτελούν μέρος των clock genes, αλλά φέρουν E-boxes και επομένως εξαρτώνται από το σύμπλεγμα. Αυτά είναι τα επονομαζόμενα clock-ελεγχόμενα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με περίοδο πολύ κοντά στις 24 ώρες και είναι συχνά σημαντικά για τη μεσολάβηση τοπικών διαδικασιών εντός ειδικών ιστών³².

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες, κατά πλειοψηφία σε πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στα clock genes μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχή ή απώλεια του κερκάδιου ρυθμού και στην εμφάνιση σπανίων συνδρόμων πρώιμης ή καθυστερημένης έναρξης ύπνου (advanced and delayed sleep phase syndromes, ASPS and DSPS). Επιπρόσθετα, μια μελέτη³⁶ που διεξάχθηκε το 2005, έδειξε ότι ποντίκια μεταλλαγμένα στο γονίδιο clock γίνονται παχύσαρκα ως αποτέλεσμα της υπερφαγίας και στη συνέχεια, αυτό οδηγεί σε μεταβολικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπερλεπτιναιμία, υπερλιπιδαιμία, ηπατική στεάτωση, υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Μέχρι σήμερα, μόνο δύο μεταλλάξεις έχουν προσδιοριστεί στους ανθρώπους. Η πρώτη είναι ένας πολυμορφισμός μήκους στο κερκάδιο γονίδιο Per3, η οποία συσχετίστηκε με το σύνδρομο DSPS³⁷. Η δεύτερη μετάλλαξη που αναγνωρίστηκε, είναι στο κερκάδιο γονίδιο Per2, η οποία συσχετίστηκε με το σύνδρομο ASPS³⁸. Και τα δύο σύνδρομα έχουν προσδιοριστεί σε πολύ μικρό αριθμό ανθρώπων. Ωστόσο, πιστεύουμε ότι υπάρχουν μη διαγνωσμένοι ασθενείς με διαταραχές του κερκάδιου ρυθμού, οι οποίοι πρέπει να χαρακτηριστούν και να μελετηθούν.

Molecular mechanisms of circadian rhythms: studies on animals and the first findings in man

M. Tsoussoglou, D. Beri, A. Vgontzas, G. Chrousos
(Ann Clin Paediatr 2006, 53(2):125-133)

A pacemaker is a self-sustaining functional entity, located in the suprachiasmatic nuclei of the brain, which allows organisms to anticipate or respond to

time-specific functions. This pacemaker, also known as the "circadian clock", is synchronized (entrained) to environmental time to achieve physiologic homeostasis. Clock genes encode proteins that enter the nucleus and suppress transcription of their cognate genes to attain entrainment. This review underlines the structural and functional aspects of these clock genes as well as the molecular mechanisms, through which they produce circadian organization.

Key words: *pacemaker, circadian rhythms, circadian clock, clock genes, molecular mechanisms, circadian organization.*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συντομογραφίες συμβόλων ανθρώπινων γονιδίων

- CLOCK: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
- PER1, PER2, PER3: Period
- CRY1, CRY2: Cryptochrome
- ARNTL (Bmal1/Mop3): Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like
- ARNTL2 (Bmal2/Mop9): Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2
- NPAS2/MOP4: Neuronal Pas Domain Protein 2
- TIMELESS: Timeless
- CSNK1E: Casein Kinase 1, Epsilon
- NR1D1: Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dunlap JC, Sunderland JJ. Chronobiology: biological timekeeping. Massachusetts: Sinquer Associates, 2004.
2. Njus D, McMurry L, Hastings JW. Conditionality of circadian rhythmicity: synergistic action of light and temperature. *J Comp Physiol* 1977; 117:335-344.
3. Roenneberg T, Morse D. Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 1993; 362:362-364.
4. Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. London: Chapman and Hall, 1995.
5. Moore RY, Silver R. Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol Int* 1998; 15:475-487.
6. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. In: Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. New York: Oxford UP, 1991.
7. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42:201-206.
8. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:1583-1586.
9. Wright Jr PK, Hughes RJ, Kronauer RE, Dijk D-J, Czeisler CA. Intrinsic near-24-h pacemaker period determines limits of circadian entrainment to a weak synchronizer in humans. *Neurobiol* 2001; 98:14027-14032.
10. Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, et al. Bright light induction of strong (Type O) resetting of the human circadian pacemaker. *Science* 1989; 244:1328-1333.
11. Czeisler CA, Richardson GS, Zimmerman JC, Moore-Ede MC, Weitzman ED. Entrainment of human circadian rhythms by light-dark cycles: a reassessment. *Photochem Photobiol* 1981; 34:239-247.
12. Wever RA, Polasek J, Wildgruber CM. Bright light affects human circadian rhythms. *Plufgers Arch* 1983; 396:85-87.
13. Czeisler CA. The effect of light on the human circadian pacemaker. *CIBA Found Symp* 1995; 183:254-90; discussion 290-302.
14. Lockley SW, Skene DJ, Buttler LJ, Arendt J. Sleep and activity rhythms are related to circadian phase in the blind. *Sleep* 1999; 22:616-623.
15. Khalsa SS, Jewett ME, Cajochen C, Czeisler CA. A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J Physiol* 2003; 549.3:945-952.
16. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 2001; 4:1165.
17. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295:1070-1073.
18. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003; 424:76-81.
19. Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z K, et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284:502-504.
20. Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Grosse J. Non-photopic phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res* 1992; 591:20-26.
21. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in

- mammals. *Cell* 2000; 103:1009-1017.
22. *Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zamenides PD, Ralph MR, et al.* Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000; 288:483-491.
23. *Lindebro MC, Poellinger L, Whitelaw ML.* Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *Embo J* 1995; 14(14):3528-3539.
24. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>
25. *Bae K, Jin X, Maywood E, Hastings M, Reppert S, Weaver D.* Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. *Neuron* 2001; 30(2):525-536.
26. *van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, et al.* Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398:627-630.
27. *Dunlap JC.* Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96:271-290.
28. *Ko HW, Jiang J, Edey I.* Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* period protein phosphorylated by doubletime. *Nature* 2002; 420:673-678.
29. *Preitner N, Damiola F, Luis-Lopez-Molina, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U.* The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110(2):251-260.
30. *Hao H, Allen DL, Hardin PE.* A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7):3687-3693.
31. *Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280:1564-1569.
32. *Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES.* A clockwork web: circadian timing in the brain and periphery, in health and disease. *Nat rev: neurosci* 2003; 4:649-661.
33. *Clayton JD, Kyriacou CP, Reppert SM.* Keeping time with the human genome. *Nature* 2001; 409:829-831.
34. *Lowrey PL, Takahashi JS.* Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *An rev genom hum gen* 2004; 5:407-441.
35. *Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al.* A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002; 418:534-539.
36. *Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon, et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* 2005; 308:1043-1045.
37. *Archer NS, Robilliard LD, Skene JD, Smits M, Williams A, Arendt J, et al.* A length polymorphism in the circadian clock gene *per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep* 2003; 26:413-415.
38. *Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, von Schantz M.* A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the *hPER2* gene is associated with diurnal preference. *J Sleep Res* 2005; 14:293-297.