



НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ ЗА ИЗУЧЕНИЕ ГЕНА, РЕГУ- ЛИРУЮЩЕГО СУТОЧНЫЕ РИТМЫ ОРГАНИЗМА



Нобелевская премия 2017 года вручена за открытие и исследование молекулярных механизмов, управляющих циркадными ритмами – внутренними часами, которые работают в живых организмах, подстраивая жизнедеятельность к смене дня и ночи. Подавляющая часть физиологических процессов связана с циркадными ритмами. Лауреатами стали американские ученые – Джеффри Холл, Майкл Росбаш и Майкл Янг.

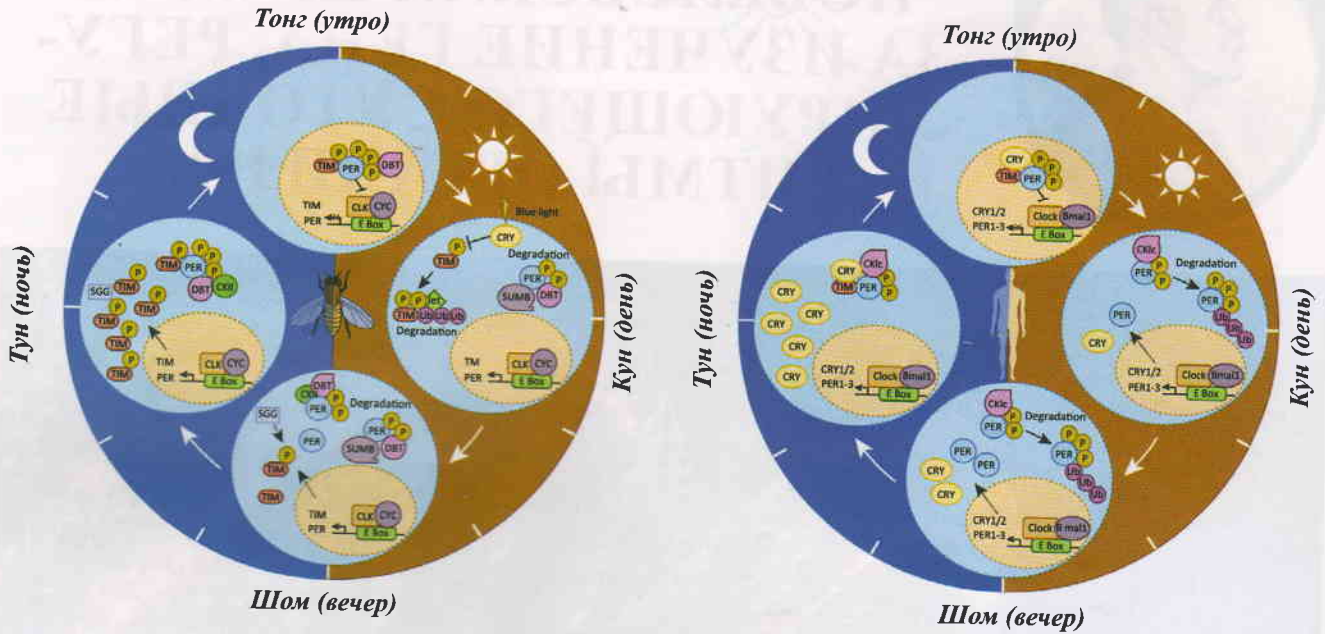
Циркадные (суточные) ритмы (от лат. *circa* – около, кругом и лат. *dies* – день) – циклические колебания интенсивности различных биологических процессов, связанные со сменой дня и ночи. Систему, образующую и контролирующую суточные ритмы, – внутренние (биологические) часы, период которых обычно близок к 24 ч, можно обнаружить практически у любых организмов: от бактерий до человека. При этом у всех живых организмов внутренние часы регулируют физиологические циклы отдыха и бодрствования, температуры, мышечной активности у животных, внимания и т.д.

Холл, Росбаш и Янг начали свои работы в начале 1970-х годов, и, чтобы понять значение их

открытий, нужно вернуться назад, в конец 1960-х годов, и выяснить, что интересовало специалистов по суточным ритмам в то время, когда были начаты исследования нынешних нобелевских лауреатов. В 1729 г. французский астроном Жан-Жак де Меран наблюдал суточные изменения у мимозы: оставленная в темноте, она закрывала и разворачивала листья вне зависимости от освещенности, в соответствии со своими внутренними настройками на 24-часовой ритм. С этого началась наука о суточных ритмах. Через два с половиной столетия, в 1960 г. на симпозиуме в Колд Спринг Харбор с говорящим наименованием «Суточные ритмы» были суммированы достижения в этой области и главные теку-

Drosophila melanogaster

Сутэмизувчилар (млекопитающие)



Drosophila melanogaster ва сутэмизувчиларда циркад циклининг схематик тасвири. Турли рангдаги фон циклининг кундузги (зарғалдоқ) ва тунги (кўк) фазасини билдиради. Молекуляр шериклар кўрсатилган (Mazzoccoli at al., Trends in Molecular Medicine. Volume 22. Issue 1. P. 68–81. 2016 January).

Схематическая иллюстрация циркадного цикла у *Drosophila melanogaster* и млекопитающих. По-разному цветные фоны указывают дневную (оранжевую) или ночную (синюю) фазы цикла. Указаны молекулярные партнеры (Mazzoccoli at al., Trends in Molecular Medicine. Volume 22. Issue 1. P. 68–81. 2016 January)

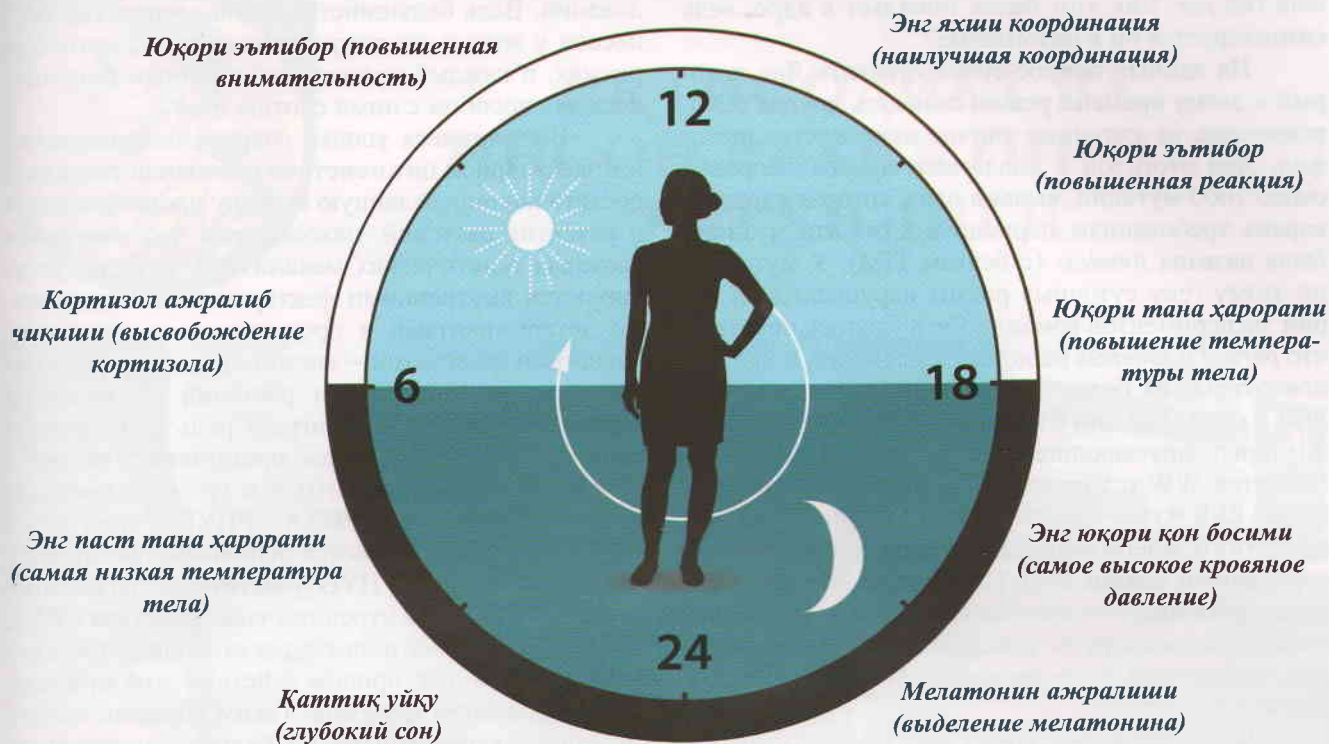
щие вопросы: «Мы так ничего и не знаем о типах суточных часов. Открытым остается вопрос о том, идут ли эти часы постоянно или начинают идти и останавливаются после прохождения 24-часового цикла, а затем их требуется «завести» снова. Употребляя термин «часы», мы не предполагаем, что циферблат обязан состоять из 24 делений. Часы должны измерять время, и разные организмы измеряют тот период времени, который подходит для их целей. Можно ожидать, что внутри того или иного организма работают несколько часов с совершенно разными циферблатами. И они не обязаны идти постоянно, а могут заводиться лишь в определенный жизненный момент. В настоящее время циркадные ритмы изучаются с помощью измерений различных функций организмов. Но никто не может с надежностью утверждать, как наблюдаемые изменения связаны с внутренними часами и, соответственно, какая из функций наилучшим образом представляет эти часы. Было бы исключительно полезно, если бы мы смогли показать, что, какую бы функцию мы ни взяли – эозинофилию, или локомоцию, или еще что-нибудь, – результаты циркадных экспериментов будут всегда сходными...».

Как видно, о природе циркадных ритмов к 1970-м годам практически ничего не было известно, и было даже не слишком ясно, с какой сторо-

ны к этому вопросу подступиться. В начале 1970-х годов Сеймур Бензер (Seymour Benzer) и Рональд Конопка (Ronald J. Konopka) начали исследования на дрозофилах, выявив один ген, связанный с суточными ритмами, они его назвали *period (per)*. Ген находился на X-хромосоме: его удалось картировать, ограничив с обеих сторон известными мутациями.

Ген *per* был первым выявленным материальным носителем внутренних суточных ритмов: нечто, присущее исключительно организму, а не среде, связано с цикличностью физиологических проявлений. Мутации в этом гене нарушали циркадную ритмику и у личинок, и у взрослых, так что это был ген, который контролировал суточную физиологию на всех стадиях развития, – ген общего действия, регулятор высокого уровня. Поэтому вокруг локуса *per* развернулась активная работа, в которую включились Джеффри Холл и Майкл Росбаш.

С использованием передовой тогда технологии клонирования участков ДНК в бактериях они смогли напрямую доказать связь *period* с циркадными ритмами. Вместе с Рональдом Конопкой и коллегами из Массачусетского и Нью-Йоркского университетов они сначала с большей точностью изучили строение самого локуса, выделили его функциональную часть и клонировали ее в бактериях, а затем с помощью плазмидных векторов ввели нормаль-



Циркад соат физиологиямизнинг кўплаб хусусиятларига таъсир этади. Бу соат уйқу, озиқланиш, гормон ажралиши, қон босими ва тана ҳароратини тартибга солади. Генларимизнинг катта қисми шу соат билан бошқарилади.

Циркадные часы влияют на многие аспекты нашей физиологии. Эти часы помогают регулировать картины сна, поведение кормления, высвобождение гормонов, кровяное давление и температуру тела. Большая часть наших генов регулируется часами.

ные участки в мух, мутантных по гену *per*. Сегодня такая работа представляется, хотя и кропотливой, но вполне рутинной, а в начале 1980-х годов это был самый передовой край науки. В результате у мутантных мух с нарушенной периодичностью двигательной активности и другими нарушениями ритмов (в частности, в самцовой песенке ухаживания) суточные ритмы восстановились. Тогда же ученые определили несколько транскриптов с этого локуса и нашли один с интересными свойствами. Во-первых, у мутантов он или отсутствовал, или присутствовал в ничтожном количестве, во-вторых, у нормальных мух его количество резко менялось в течение суток: днем его было много, а ночью мало. Очевидно, что белковый продукт, снятый с этой интересной мРНК, напрямую участвует в регуляции суточного ритма. Иными словами, это кандидат на роль главного регулятора физиологических часов.

Параллельно ту же самую работу с тем же самым результатом в Рокфеллеровском университете Нью-Йорка проделала команда Майкла Янга, опубликовав результаты ровно тогда же, в 1984 г. Ясно, что этой работе предшествовали точные исследования строения локуса *per* и его транскриптов, выполненные Янгом с коллегами.

При этом одна команда (Холл и Росбаш) продемонстрировала, что *per* работает практически

во всех тканях тела, особенно в глазах и в мозге, а другая команда (Янг и Байлес) установила, что длительность цикла зависит от количества продуктов *per*. И то, и другое вплотную придвинуло исследователей к вопросу о механизме регуляции суточных ритмов.

И действительно, вскоре Холлом и Росбашем была предложена принципиальная модель регуляции суточных ритмов. Она основывалась на идее обратной связи между белком PER и интенсивностью экспрессии соответствующего гена: накопление белка тормозит его синтез, а при снижении количества белка синтез активируется. В этой модели, помимо принципиальной схемы, были поставлены следующие вопросы (буквально): За счет каких молекулярных механизмов срабатывает эта петля? Какие есть белковые и генетические инструменты для реализации этой схемы? Как влияет поведение на суточные ритмы? Где происходит молекулярная регуляция – в ядре (экспрессия *per*) или в цитоплазме (активность мРНК)? Иными словами, была составлена программа будущих исследований.

Занявшись иммуноцитохимическими опытами, Росбаш и Холл в 1992 г. определили, где внутри клетки концентрируется белок PER. Оказалось, что внутри ядра. Ученые заключили, что PER выступает особым фактором, который регулирует собствен-

ный ген *per*. Как этот белок попадает в ядро, ведь синтезируется он в цитоплазме?

На данный вопрос сумел ответить Янг, который к этому времени решил поискать другие гены, влияющие на суточные ритмы активности дрозофил. Для этого он с коллегами проанализировал около 7000 мутаций, выявив одну, которая удовлетворяла требованиям периодичности. Эта мутация была названа *timeless* (с белком ТИМ). У мутантов по этому гену суточные ритмы нарушались. В серии экспериментов команде Янга удалось показать, что *period* и *timeless* работают совместно, и именно новооткрытый белок ТИМ обеспечивает доставку PER в ядро. Там они блокируют транскрипционные факторы, запускающие их собственный синтез. У мутантов WW с удлинённым ритмом изменённый белок PER хуже связывается с ТИМ, и, вероятно, из-за этого задерживаются доставка и аккумуляция тормозящей связки PER/ТИМ в ядро. Позже было также доказано, что количество ТИМ в клетке меняется в зависимости от освещённости. Таким образом, жизненный ритм организма подстраивается к смене дня и ночи.

Через некоторое время Янг выявил и исследовал ещё один ген, участвующий в регуляции суточных ритмов. Для этого понадобилось прочесть 15 000 хромосом (были выбраны вторая и третья хромосомы) у мух, которых подвергли действию химического мутагена. В результате были выделены две линии с новой мутацией в гене *doubletime* (*dbt*) с соответствующим белком. Одна из них – первая из обнаруженных – резко укорачивала период ритмов: вместо 24-часового получался 18-часовой цикл активности. А другая, наоборот, увеличивала период циклов до 26–27 ч.

Роль этого гена (точнее, его белка), как выяснилось, состоит в том, чтобы разрушать лишние белки PER, которые накапливаются в цитоплазме. Когда в цитоплазму поступают белки ТИМ, они связываются с белком PER и переправляются в ядро – остаток PER должен быть удален из цитоплазмы для начала следующего цикла. Это и делают DBT. И если при постоянном освещении или его отсутствии цикличность поступления ТИМ в цитоплазму нарушается, то DBT способны сами собой поддерживать цикл без всякой смены освещённости.

Именно поэтому у мутантов *dbt* регистрируются нарушения суточных циклов лишь в экспериментах в темноте, а при нормальной смене светлой и темной фаз суточные ритмы у них не нарушаются – срабатывает регуляция ТИМ. Следовательно, DBT обеспечивает стабильность суточных ритмов при сменах темной и светлой фаз.

Таким образом, приступив в 1970-е годы к исследованиям в дисциплине, которая состояла из одних вопросов, к началу нового века эти трое ученых, ставшие лауреатами Нобелевской премии в этом году, фактически заново создали науку о циркадных ритмах. Они построили предметную базу для очень полезных и академических, и прикладных исследова-

ний. Ведь большинство физиологических процессов у живых организмов завязано на суточных ритмах, и каждый процесс собственным биохимическим способом с ними соотносится.

Выдающиеся успехи современной геномики и молекулярной цитогенетики позволили составить достаточно определенную картину процессов роста и развития растений, находящихся под контролем сложных генетических механизмов, которые регулируются внутренними факторами – генетическими детерминантами и продуктами их экспрессии; внешними факторами – светом. Учеными установлено, что в способности растений распознавать чередование дня и ночи играет роль фитохромная система, а фоторецепторы принимают участие в регуляции циркадных ритмов и времени цветения растений. Фитохромы PHYA – PHYE и криптохромы CRY1 и CRY2 являются основными фоторецепторами. Фитохром PHYB участвует в деградации белка CONSTANS в утренние часы, тогда как CRY1, CRY2 и PHYA необходимы для стабилизации этого белка в конце дня, причем действие этих стабилизаторов взаимозаменяемое. Таким образом, вместо описанных выше PER и CRY белков, участвующих в циркадном ритме животных, у растений задействованы PHY и CRY.

С помощью фитохрома свет прямо или косвенно контролирует большинство важнейших процессов жизнедеятельности растительного организма – рост, дифференцировку и морфогенез. Именно фитохромная система во многих случаях опосредует адаптацию растений. Поэтому исследование фито- и криптохромной регуляции фотоморфогенеза сельскохозяйственных растений становится все более актуальным.

В этом плане наиболее важными представляются исследования ученых нашего Центра в получении фенотипов хлопчатника с агрономически полезными и выгодными генами. Так, впервые в мире под руководством профессора И.Ю. Абдурахмонова было клонировано, секвенировано и охарактеризовано семейство генов фитохромов (PHYA, PHYB, PHYD и PHYE) хлопчатника вида *G.hirsutum*, которые играют важную роль в морфогенезе, цветении и удлинении волокна. Настоящим рывком в отечественной науке явилось подавление функции гена фитохрома A хлопчатника с помощью РНК-интерференции, в результате чего были созданы раннеспелые «ген-нокаутующие» сорта с измененным биологическим ритмом, т.е. со сдвигом стадии цветения на более ранние сроки, что, в свою очередь, позволяет получить и собрать урожай до наступления холодов.

Елена Никитина,
Венера Камбурова.

Центр геномики и биоинформатики АН РУз.

Иллюстрации: www.nobelprize.org