

MOLEKULARNY MECHANIZM RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH U ROŚLIN

MOLECULAR MECHANISM OF PLANT CIRCADIAN RYTHMS

Tomasz ULICZKA, Damian GRUSZKA

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Streszczenie: Rotacja ziemi wokół własnej osi prowadzi do zmian intensywności światła oraz temperatury, które określają cykl dzień-noc. Większość organizmów koordynuje własny cykl życiowy poprzez dostosowanie przebiegu procesów metabolicznych do zmian w środowisku. Synchronizacja tempa procesów fizjologicznych z cyklicznymi zmianami w środowisku osiągana jest za pomocą wewnętrznego mechanizmu kontrolującego upływ czasu – zegara biologicznego. Zegar ten jest endogennym mechanizmem generującym rytmy o okresie w przybliżeniu 24-godzinnym, który umożliwia dostosowanie metabolizmu do dziennych oraz sezonowych zmian w środowisku. Zegar okołodobowy może być rozpatrywany, jako mechanizm tłumaczący sygnały pochodzące ze środowiska na informacje, które rytmicznie koordynują metabolizm i fizjologię. Rytmy okołodobowe umożliwiają zachodzenie poszczególnych biologicznych procesów w najbardziej odpowiednich porach cyklu dzień-noc, co umożliwia prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Zegar okołodobowy reguluje wiele procesów u roślin, wliczając w to ruchy liści, otwieranie szparek, fotosyntezę, wzrost, a także kwitnienie. Rytmy okołodobowe są generowane przez centralny oscylator, który u *Arabidopsis thaliana* składa się z sieci czynników transkrypcyjnych zorganizowanych we wzajemnie połączone pętle negatywnych sprzężeń zwrotnych, obejmujące wiele elementów. Są to głównie geny *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*), *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1*) oraz *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*). Białko *TOC1* indukuje transkrypcję i translację genów *LHY* i *CCA1*, co zwrótnie hamuje ekspresję *TOC1*. Istotną cechą centralnego oscylatora jest to, że może on zostać nastawiony przez dzienne zmiany światła i temperatury. Uzupełnieniem pełnego modelu zegara okołodobowego są szlaki wyjściowe umożliwiające połączenie centralnego oscylatora z różnymi biologicznymi procesami, które podlegają jego kontroli. Unikalną cechą działania centralnego oscylatora jest kompensacja temperatury – stabilność długości trwania pełnego cyklu w szerokim zakresie temperatur fizjologicznych oraz utrzymywanie się rytmów w przypadku braku sygnałów ze środowiska. Istnieje ponadto dwukierunkowa, wzajemna regulacja między szlakami transdukcji sygnału hormonów roślinnych, m.in. auksyn, kwasu abscysynowego i cytokinin, a szlakami interakcji komponentów centralnego oscylatora. Hormony roślinne i centralny oscylator wspólnie kontrolują przebieg wielu procesów fizjologicznych, a dodatkowo istnieją dowody na równoległą regulację ekspresji wspólnej puli genów. Regulacja działania mechanizmów centralnego oscylatora odbywa się nie tylko na poziomie inicjacji transkrypcji genów kodujących jego poszczególne elementy. Wykazano, że wpływ na ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne, stanowiące elementy centralnego oscylatora odbywa się również na poziomie stabilności transkryptów, alternatywnego wycinania intronów lub mikroRNA. Kolejnym poziomem regulacji ekspresji genów centralnego oscylatora jest kontrola de-

gradacji kodowanych białek, której pierwszym etapem jest ich fosforylacja. Odrębnym i wciąż słabo poznany zagadnieniem jest regulacja ekspresji genów centralnego oscylatora poprzez zmiany architektury chromatyny zawierającej sekwencje kodujące i regulatorowe tych genów.

Słowa kluczowe: cykl okołodobowy, zegar okołodobowy, centralny oscylator, sprzężenie zwrotne, czynniki transkrypcyjne.

Summary: The rotation of earth around its axis leads to environmental changes in light intensity and temperature that predictably define day-night cycle. Most organisms coordinate their life cycle in anticipation of these environmental fluctuations. The measurement of time and synchronization with the environment are achieved by an internal time-keeping mechanism – biological clock. The circadian clock is an endogenous mechanism that generates rhythms with an approximately 24-h period and enables plants to adapt to daily and seasonal changes in their environment. The circadian clock can be considered as a mechanism that translates environmental signals into temporal information in order to rhythmically coordinate metabolism and physiology. Circadian rhythms enable biological processes to occur at the most appropriate times during the day-night cycle, which confers a advantage to organisms. Circadian clock regulates many processes in plants, including leaf and stomatal movements, photosynthesis and growth and contributes to photoperiodism. Circadian rhythms are generated by molecular oscillators that in *Arabidopsis thaliana* have been shown to consist of network of transcription factors arranged in interlocking negative-feedback loops involving a number of elements. Circadian clock is based on the feedback loop involving the genes *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*), *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1*) and *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*). Protein *TOC1* induces the transcription of genes *LHY1* and *CCA1*, which are translated into proteins that repress the expression of *TOC1*. An important characteristic of circadian oscillators is that they can be entrained by cues from the environment, such as daily changes in light and temperature, transduced via input pathways. The last components of circadian clock model are the output pathways that provide a link between the oscillator and the various biological processes and their rhythms, which are controlled by circadian clock. A unique property of circadian oscillator's mechanism is temperature compensation – the stability of the period of the clock over a wide range of physiological temperatures and the persistence of rhythms in the absence of environmental signals. Bidirectional, mutual regulation is known between plant hormones' (auxin, abscisic acid, cytokinin) signaling pathways and grid of interactions of central oscillator's compounds. Plant hormones and central oscillator together control many physiological processes, and additionally, parallel regulation of common pool of genes was reported. Mechanism of central oscillator is regulated not only during initiation of transcription of genes encoding oscillator's compounds. It was shown that influence on the expression of oscillator's genes encoding transcription factors is exerted at the level of transcript stability, alternative splicing or miRNA as well. Control of degradation of oscillator's proteins, through their phosphorylation as a first step, is yet another level of genes expression regulation. Distinct and still not fully elucidated aspect of expression of central oscillator's genes is its regulation through alterations of chromatin architecture.

Key words: circadian rhythm, circadian clock, central oscillator, feedback mechanism, transcription factors.

HISTORIA BADAŃ

Pierwsze zapiski odnoszące się do okołodobowych rytmów roślin pochodzą z IV wieku p.n.e. Grecki filozof, Androstenes, opisał wówczas własne spostrzeżenia dotyczące ruchów liści *Tamarindus indicus*, które zaobserwował na wyspie Tylos (obecnie Bahrajn) w Zatoce Perskiej podczas przemarszu wojsk Aleksandra Wielkiego [38]. Nie podejrzewano, że przyczyna tych cyklicznych zmian może mieć charakter endogennej. Dopiero prawie dwa tysiące lat później zostało to eksperymentalnie potwierdzone. W 1729 roku francuski astronom de Mairan ogłosił, iż

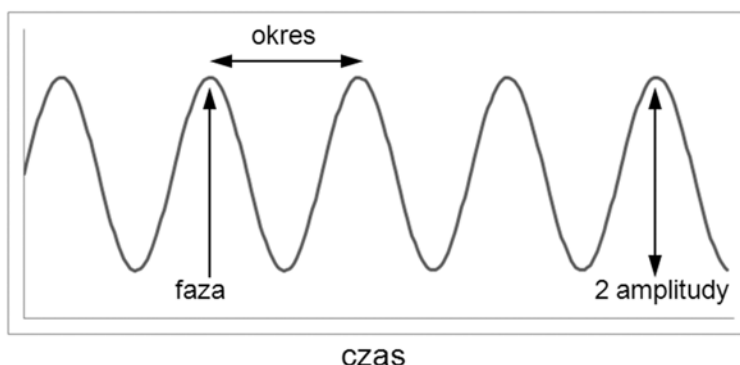
dobowe ruchy heliotropicznej rośliny (prawdopodobnie *Mimosa pudica*) utrzymują się w warunkach ciągłej ciemności, demonstrując w ten sposób wewnętrzną naturę tego procesu [14, 38]. Prawie wiek później, okres (czyli czas trwania pełnego cyklu) ruchów liści został dokładnie zmierzony. Rytmu te były w przybliżeniu 24-godzinne, co sprawiło, że przypisano im nazwę okołodobowe. Pojawiły się również sugestie dotyczące ich endogennego pochodzenia oraz skomplikowanego sposobu odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Doświadczenie przeprowadzone w kosmosie na grzybie *Neurospora crassa* na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku ostatecznie potwierdziło tezę de Mairana i obaliło przypuszczenia dotyczące kierowania omawianego rytmu przez subtelne i niewykrywalne geofizyczne czynniki związane z rotacją ziemi wokół własnej osi. Cykliczność i okresowość rytmów zaobserwowanych przez Franza Halberga zainspirowała go do wprowadzenia w 1859 roku terminu cirkardialny, czyli okołodobowy, od łacińskich słów *circa* – około i *dies* – dzień [38].

CHARAKTERYSTYKA CYKLI OKOŁODOBOWYCH ROŚLIN

Wiele aspektów związanych z metabolizmem, fizjologią i zachowaniem organizmów zmienia się w ciągu dnia i nocy. Przeważająca część organizmów aktywnie zmienia swój metabolizm antycypując pojawienie się wraz ze świtem bodźca świetlnego. Rośliny, jak wszystkie Eukaryota i część Prokaryota, rozwinęły wyszukane mechanizmy mające na celu przewidywania zmian w środowisku, które powstają na skutek rotacji Ziemi wokół własnej osi.

Zjawiska regularnie powtarzające się w czasie określane są mianem rytmu. Występują one w procesach na poziomie metabolicznym, jak np. subtelne rytmy w procesie fotosyntezy oraz na poziomie wzrostowo-rozwojowym, jak otwieranie kwiatów, ruchy liści. Okres, częstotliwości, amplituda i faza są parametrami charakteryzującymi każdy rytm (ryc. 1) [38]. Okres rytmu, czyli czas potrzebny do zakończenia jednego kompletnego cyklu może być różny, od sekund do wielu lat. Częstotliwość jest liczbą okresów pojawiających się w jednostce czasu. Wielkość wahań intensywności procesów rytmicznych, np. rozpiętość między największą a najmniejszą intensywnością oddychania lub fotosyntezy, to dwie amplitudy. Faza to chwilowy stan oscylacji rytmu w czasie trwania okresu. Okresowość procesów biologicznych pozwala dostosować cykl rozwojowy organizmów do zmian warunków środowiska. Cykliczne zmiany czynników zewnętrznych mogą wywołać periodyczność rytmu, aczkolwiek wiele zjawisk rytmicznych powstaje w wyniku wspólnego działania czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Zmiany rytmu w procesach metabolicznych mogą występować nawet w przypadku niewykazywania przez warunki środowiskowe zmienności zsynchronizowanej z tym rytmem [14].

Cykl okołodobowy jest najbardziej znanym przykładem rytmów występujących u roślin. Nie każdy endogeny rytm może być uznawany za dobowy. Okres takiego rytmu dobowego powinien wynosić ok. 24 godziny z (wahaniem w zakresie 20–28 godzin). Drugą właściwością rytmów okołodobowych jest ich występowanie i



RYCINA 1. Parametry charakteryzujące rytm. Okres rytmu, czyli czas potrzebny do zakończenia jednego kompletnego cyklu może być różny, od sekund do wielu lat. Częstotliwość jest liczbą okresów pojawiających się w jednostce czasu. Wielkość wahań intensywności procesów rytmicznych np. rozpiętość między największą a najmniejszą intensywnością oddychania lub fotosyntezy to dwie amplitudy. Faza to chwilowy stan oscylacji rytmu w czasie trwania okresu [wg 55, zmodyfikowane]

FIGURE 1. Parameters characterizing rhythm. Period of the rhythm, defined as the time needed to end one complete cycle, may be different and could last seconds as well as many years. Frequency is the number of periods occurring in a time unit. Dimension of intensity fluctuation of rhythmic processes such as e.g. difference between the minimum and maximum value of cellular respiration and photosynthesis intensity, is marked as 2 amplitudes. Phase is the temporary state of rhythm oscillation occurring during the period [according to 55, modified].

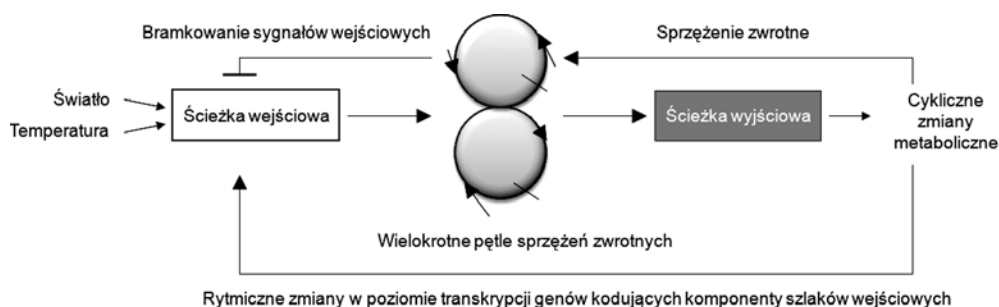
utrzymywanie się w sposób samopodtrzymujący się (ang. *self-sustaining*) w stałych warunkach oświetlenia i temperatury. W takich kontrolowanych warunkach organizm pozbawiony wszelkich zewnętrznych czynników mogących informować go o porze doby wykazuje periodyczność cyklu wynoszącą w przybliżeniu 24 godziny. Bodźce zewnętrzne nie są niezbędne do funkcjonowania cyklu okołodobowego, aczkolwiek cyklicznie zmieniające się czynniki zewnętrzne, takie jak: światło, ciemność, temperatura, mogą modyfikować i przesunąć fazę rytmu. Kolejną cechą cykli okołodobowych jest niezmiennosc rytmu w szerokim zakresie temperatur fizjologicznych, warunkowana w procesie kompensacji temperatury [37].

Najprostszy model opisujący zegar okołodobowy (ang. *circadian clock*) składa się z sygnałów wejściowych, nastawiających centralny oscylator, który generuje rytmiczne sygnały wyjściowe (ryc. 2). Jest to jednak nadmierne uproszczenie, ponieważ wiele komponentów związanych ze szlakami wejściowymi może podlegać regulacji sterowanej przez szlaki wyjściowe, a rytmiczne sygnały wyjściowe mogą



RYCINA 2. Uproszczony schemat zegara okołodobowego [wg 20, zmodyfikowane]

FIGURE 2. Simplified scheme of circadian clock [according to 20, modified]



RYCINA 3. Szczegółowy schemat zegara okołodobowego [wg 20, zmodyfikowane]

FIGURE 3. Detailed scheme of circadian clock [according to 20, modified]

oddziaływać przez sprzężenie zwrotne na centralny oscylator (ryc. 3). Uważa się, że ze względu na zdecentralizowaną organizację budowy roślin, centralny oscylator zlokalizowany jest w każdej komórce roślinnej [14].

Endogenne rytmy okołodobowe *Arabidopsis thaliana* wahają się w zakresie od 22 do 28 godzin w zależności od warunków wzrostu [20]. W celu synchronizacji ze środowiskiem, roślinny zegar biologiczny ma szereg mechanizmów dostarczających informacji ze środowiska zewnętrznego do centralnego oscylatora, które regulują jego fazę i utrzymują periodyczność na poziomie bliskim 24 godzin [20, 55, 60]. Prawidłowe nastawienie zegara przy udziale sygnałów świetlnych jest zależne od jego wrażliwości na bodźce zewnętrzne o różnej porze doby. W pewnych punktach cyklu okołodobowego impulsy światła przyspieszają fazę zegara, a w innych zostanie ona opóźniona [14, 60]. Mechanizm stanowiący podstawę nastawiania zegara wydaje się niejasny. Centralny oscylator może zostać zresetowany tylko w niektórych częściach doby. Dodatkowo czas trwania sygnału świetlnego musi być relatywnie wydłużony w celu wykasowania jego wcześniejszych ustawień. Ta właściwość zapewnia niemożność wyzerowania oscylatora przez bodźce o obniżonej intensywności, na przykład światło księżyca lub krótkim czasie trwania, jak np. błyskawice podczas burzy [14].

Zegar biologiczny jest ciągle regulowany przez intensywność i długość trwania bodźca świetlnego, aczkolwiek tylko fazowo-specyficzne działanie może zapewnić jego wyzerowanie. Jest bardzo prawdopodobne, że odpowiednia synchronizacja i utrzymywanie rytmów okołodobowych polega zarówno na reakcjach związanych z odpowiednią fazą cyklu, jak i ciągłym mechanizmie kasującym ustawienia zegara. Bramkowanie (ang. *gating*), czyli regulowanie przekazywania niektórych sygnałów, pozwala roślinom lepiej reagować na szeroki zakres i intensywność sygnałów pochodzących ze środowiska, którym nieustannie podlegają. Zmiana wrażliwości na różne bodźce środowiskowe umożliwia roślinom odpowiedź na nie tylko wtedy, kiedy jest to dla nich korzystne. Przykładem takiego zjawiska jest hamowanie elongacji łodygi przez wiatr w czasie dnia [20]. Narażenie *Cosmos bipinnatus* na podmuchy powietrza w różnych porach doby skutkowało odmiennymi efektami związanymi ze

wzrostem. Najintensywniejsze efekty były obserwowane, kiedy mechaniczny bodziec w postaci wiatru został zastosowany podczas dnia [12]. Podobnie, mechaniczne hamowanie wydłużania łodygi *Phaseolus vulgaris* wykazywało wyższą wartość na początku dnia. Badania te sugerują rytmiczną wrażliwość na mechaniczne bodźce wielu gatunków roślin. Centralny oscylator może blokować drogi sygnałów poprzez bezpośredni mechanizm, w którym sygnały wyjściowe generowane przez niego są częścią takiej sygnalizacji. Mechanizm pośredni polega na regulacji dodatkowego specyficznego szlaku, modulującego poszczególne etapy transdukcji sygnału bodźca. Możliwe jest również bramkowanie bodźców równocześnie w sposób pośredni, jak i bezpośredni [20].

Zdolność do przewidywania cyklicznych zmian środowiska może przynosić korzyści organizmowi. U sinic zdolność do przeżywania w konkretnym środowisku zależy od zgodności między endogennym okresem rytmu okołodobowego a długością dnia. Formy dzikie rosną lepiej niż mutanty o wydłużonym lub skróconym okresie rytmu w warunkach 24-godzinnej cyklu (12/12 godzin światło lub ciemność) [38]. W cyklu 30 godzin (15/15 godzin światło lub ciemność) mutanty o endogennym okresie 30 godzin rosną lepiej niż formy dzikie (okres 24-godzinny) [23, 38]. Mutanty *A. thaliana* o okresie rytmu wynoszącym 28 godzin mają mniejszą biomasa niż te ze skróconym okresem (20 godzin), kiedy przebywają w warunkach 20-godzinnej cyklu okołodobowego (10/10 godzin światło lub ciemność) [38]. Różnice w wielkości biomasy wynikać mogą z modyfikacji procesów fizjologicznych, na przykład obniżenia tempa syntezy chlorofilu i wiązania węgla [6].

CYKLE OKOŁODOBOWE INNYCH ORGANIZMÓW – WYSTĘPOWANIE I CHARAKTER

Kontrola wielu procesów, regulowana przez zegar okołodobowy, jest kluczowa dla wszystkich organizmów [2]. Pomimo zasadniczo odmiennego pochodzenia filogenetycznego i ogromnych różnic w złożoności mechanizmów regulacyjnych u organizmów wykazujących okołodobową rytmiczność rdzeń zegara stanowi przynajmniej jeden, wewnętrzny i autonomiczny centralny oscylator. Komponenty zegara okołodobowego nie wykazują zachowawczości między królestwami w toku ewolucji [14]. W przypadku roślin, centralny oscylator zawiera elementy pozytywnej i negatywnej regulacji, tworzące samoregulującą się pętlę sprzężenia zwrotnego, w wielu przypadkach generującą 24-godzinne rytmy. Komponenty takiej pętli otrzymują informacje bezpośrednio ze środowiska w postaci bodźców pozwalających na synchronizację zegara, która reguluje rytmiczną ekspresję genów CCG (*Clock-Controlled Genes*) oraz przebieg procesów biologicznych. Jednokomórkowe organizmy mają zegary okołodobowe programujące 24-godzinne rytmy w wielu procesach. Bardziej złożone organizmy wielokomórkowe, zawierające zróżnicowane tkanki, w celu utrzymywania skoordynowanych i precyzyjnych rytmów mogą rozdzielać funkcje zegara między różne typy komórek. Tak zróżnicowane grupy organizmów,

jak: sinice, ptaki, a także ssaki, zawierają w swoich komórkach wyspecjalizowany oscylator *pacemaker*, funkcjonujący niezależnie od innych oscylatorów, który odpowiada na sygnały pochodzące ze środowiska i generuje sygnały wyjściowe regulujące bezpośrednio odpowiedź fizjologiczną lub inne podległe mu oscylatory. U ssaków na przykład, centralny oscylator znajduje się w wyspecjalizowanych komórkach jądra nadskrzyżowaniowego – SCN (ang. *SupraChiasmatic Nucleus*) w mózgu. SCN steruje i narzuca rytm podległym, półautonomicznym oscylatorom występującym w przyległych tkankach [2, 14]. Taka sieć połączonych oscylatorów wydaje się zapewniać stabilność i precyzyjność zegara okołodobowego umożliwiając indywidualnym oscylatorom w komórkach i tkankach kontrolowanie różnorodnych, rytmicznych procesów [2].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA CYKL OKOŁODOBOWY

Rola światła w funkcjonowaniu cyklu okołodobowego – budowa i funkcja fotoreceptorów i mechanizm interakcji z elementami szlaku cyklu okołodobowego

Światło jest prawdopodobnie najistotniejszym bodźcem dla roślin. Zestaw fotowrażliwych barwników umożliwia optymalny rozwój w szerokim zakresie warunków świetlnych [14]. Barwniki absorbujące światło dalekiej czerwieni i czerwieni regulują wiele procesów morfogenetycznych i fizjologicznych. Percepcja sygnałów świetlnych z naturalnego otoczenia odgrywa istotną rolę u wszystkich organizmów, szczególnie u roślin, które nie mają możliwości migracji. W efekcie, światło wpływa na wiele aspektów rozwoju rośliny począwszy od kiełkowania, przez deetiologię siewek, fototropizm aż do kwitnienia. Rośliny rozwinęły grupę fotoreceptorów przetwarzających informacje o ilości i właściwościach światła. Do fotoreceptorów należą fitochromy (Phy), które absorbują światło czerwone ($\lambda_{max} \approx 660$ nm) i dalekiej czerwieni ($\lambda_{max} \approx 730$ nm) oraz kryptochromy (Cry) i fototropiny (Phot) pochłaniające, odpowiednio światło UV-A i niebieskie $\lambda_{max} \approx 490$ nm. Ostatnie badania wskazują na udział promieniowania UV-B oraz światła zielonego w procesach rozwoju, ale mechanizm stanowiący podstawę tej odpowiedzi nie został jeszcze wyjaśniony [22]. Wykazano natomiast, że zielone światło $\lambda_{max} \approx 560$ nm oddziałuje na rośliny poprzez szlaki zależne i niezależne do kryptochromu [14].

Fitochrom jest rozpuszczalną w wodzie chromoproteiną o charakterystycznym błękitnym zabarwieniu, która występuje w dwóch formach Pr i Pfr, różniących się między sobą właściwościami spektralnymi i mogących się wzajemnie przekształcać z jednej formy w drugą w procesie zwanym fotokonwersją. Naświetlenie rośliny światłem czerwonym powoduje konwersję formy Pr w Pfr, a światło dalekiej czerwieni przekształca cząsteczkę Pfr w formę Pr. Badania genetyczne przeprowadzone na *A. thaliana* pozwoliły poznać rolę pięciu typów fitochromów: PhyA, PhyB, PhyC, PhyD, PhyE oraz trzech rodzajów kryptochromów: Cry1, Cry2 i Cry3 w percepcji sygnałów wejściowych zegara biologicznego [22, 46]. Światło-labilny PhyA

jest dominującym fotoreceptorem absorbującym wiązkę światła czerwonego i niebieskiego o niewielkiej intensywności, natomiast PhyB i Cry1 odpowiadają za pochłanianie światła o wysokiej intensywności z zakresu fal czerwonych i niebieskich [46].

Do procesów fizjologicznych regulowanych działaniem fitochromów należą m.in. kiełkowanie, rozwój liścieni, elongacja hypokotyli oraz kontrola czasu kwitnienia [22]. Kryptochrom reguluje wiele procesów morfogenetycznych, takich jak: hamowanie elongacji siewek, stymulacja rozwoju liścieni, liści i korzeni, indukcja kwitnienia, synteza chlorofilu i antocyjanów oraz proces programowanej śmierci komórki. Kryptochrom reguluje rytmy okołodobowe u wielu organizmów, również u ssaków [66].

Aktywność fotoreceptorów jest kontrolowana przez zmiany właściwości światła. Ekspresja genów kodujących fotoreceptory jest konstytutywna, a regulacja ich funkcji opiera się głównie na potranslacyjnych modyfikacjach. Światło może modulować aktywność fotowrażliwych barwników przez indukowanie zmian ich lokalizacji komórkowej. Fitochrom jest syntetyzowany w nieaktywnej formie Pr, która absorbując światło czerwone ulega konwersji w aktywną formę Pfr. Fotokonwersja fitochromu doprowadza do przemieszczenia Pfr z cytoplazmy do jądra komórkowego, umożliwiając jego współdziałanie z różnymi komponentami szlaku transdukcji sygnału, co skutkuje inicjacją kaskady transdukcji. Białko Cry2 *A. thaliana* jest stale zlokalizowane w jądrze komórkowym, podczas gdy Cry1 w czasie ciemności znajduje się w jądrze komórkowym, a w warunkach dostępności światła w większości w cytoplazmie. Kryptochromy znajdujące się w jądrze oddziałują blisko z chromatyną. Cry3 zlokalizowany w mitochondriach i chloroplastach pośredniczy w transdukcji sygnałów do tych organelli. Sugeruje się, że jego potencjalną rolą jest regulacja transkrypcji [22]. Fototropiny *A. thaliana* są związane głównie z błoną plazmatyczną, lecz światło indukuje przemieszczenie części tych białek do cytoplazmy. Wkład fototropin w regulację transkrypcji jest relatywnie znikomy ze względu na małą ilość genów będących pod ich kontrolą.

Aktywność fotoreceptorów jest zależna od poziomu ich fosforylacji. Fosforylacja PhyA moduluje jego właściwości – kontroluje lokalizację komórkową, stabilność i wpływa na kontrolę transdukcji sygnałów [54]. Fitochromy prawdopodobnie pełnią rolę kinaz, wykazując większą aktywność jako formy Pfr, które zaangażowane są w transdukcję sygnałów związanych ze światłem [1]. Autofosforylacja Cry1 i Cry2 u *A. thaliana* jest również istotna dla ich właściwego funkcjonowania [22]. Aktywacja N-końcowego regionu Cry1 – CNT (ang. *CRY N-terminal domain*) światłem przypuszczalnie indukuje zmiany konformacji domeny CCT (ang. *CRY C-terminal domain*), pozwalając tym samym na autofosforylację, dimeryzację i możliwość interakcji z innymi białkami [58]. Białka fototropin również wykazują aktywność kinazy. Światło niebieskie przyczynia się do autofosforylacji tych fotoreceptorów, inicjując kilka szlaków transdukcji sygnałów [22]. Aktywacja fotoreceptorów, głównie fitochromów i kryptochromów ma znaczny wpływ na transkrypcję wielu genów centralnego oscylatora [14].

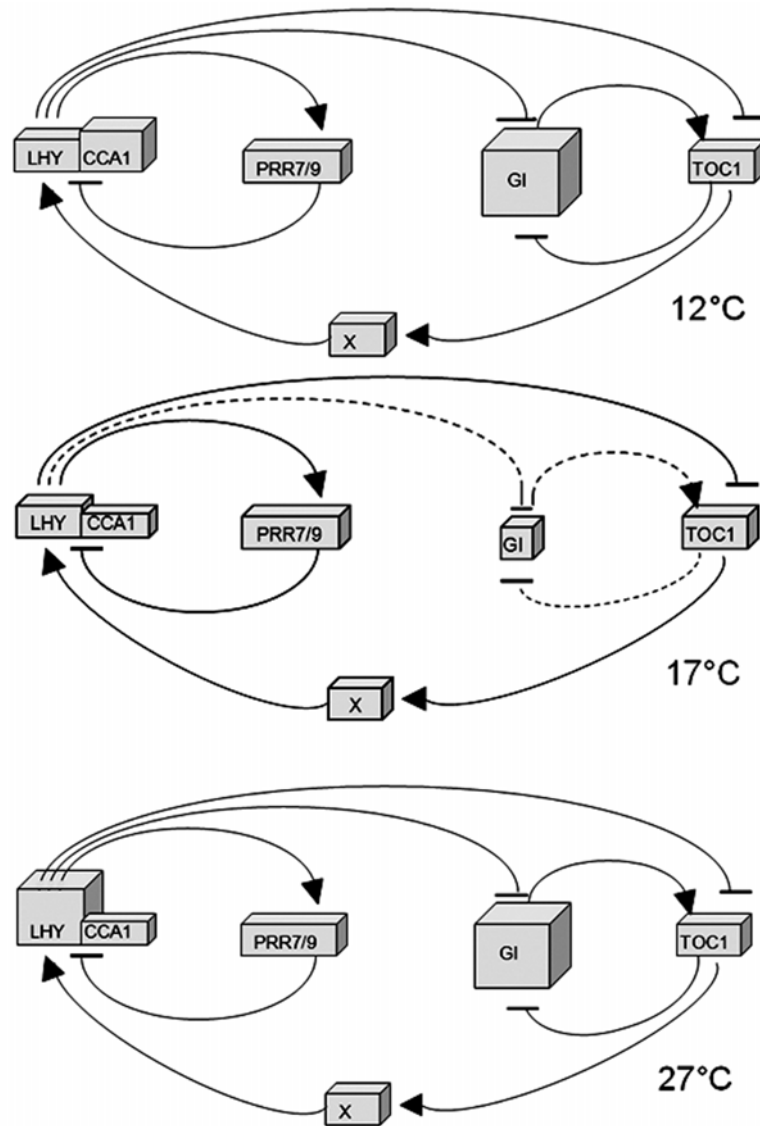
Kompensacja temperatury

Pierwsze badania wpływu temperatury na długość okresu cyklu okołodobowego nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Przewidywano, że podobnie jak w innych procesach chemicznych funkcjonowanie centralnego oscylatora powinno wykazywać zmiany w zależności od temperatury. Szybkość reakcji chemicznej podwaja się w przypadku podwyższenia temperatury o 10°C ($Q_{10} = 2$). Okres ruchów liści *Phaseolus coccineus* wykazuje przyspieszenie wynoszące tylko 1,2. Zjawisko to znane jako kompensacja temperatury zostało zaobserwowane u wielu gatunków roślin i zwierząt [38, 49]. Zegar biologiczny może zostać nastawiony przez cykliczne zmiany temperatury różniące się co najmniej o 4°C między dniem i nocą. Rytmiczna ekspresja głównych elementów stanowiących rdzeń centralnego oscylatora *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*), *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) i *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) również może zostać zmieniona przez cykliczne zmiany temperatury (ryc. 4).

Analiza mutantów *A. thaliana* doprowadziła do wniosku, że białka PRR7 (*PSEUDO RESPONSE REGULATOR7*) i PRR9 blisko związane z oscylatorem mają istotny wpływ na nastawianie zegara. Podwójne mutanty *prrr7prrr9* wykazują zaburzony okres oscylacji elementów centralnego oscylatora w przypadku nastawiania zegara jedynie przez temperaturę, przy pominięciu cyklicznych zmian światła. Oscylacje poziomu transkryptów genów kodujących elementy oscylatora *A. thaliana* są uwarunkowane zmianami temperatury [49, 56]. Amplituda oscylacji poziomu transkrypcji genu *TOC1* jest znacznie większa w temperaturze 27°C niż 17°C, a amplitudy oscylacji elementów *LHY* i *CCA1* są odpowiednio zmniejszone w przypadku wyższych temperatur. Białko LHY ma istotną funkcję w utrzymywaniu niezmiennego okresu oscylacji poziomu transkryptów genu *CAB2* (*Chlorophyll a/b-binding protein 2*) w 27°C i *CCA1* w temperaturze 12°C. U mutantów genu *GI* (*GIGANTEA*) zjawisko kompensacji temperatury nie jest obserwowane. Mutanty te wykazują zmiany w długości okresu rytmów ruchów liści i ekspresji genu *CAB2* w szerokim zakresie wysokich i niskich temperatur, które znacznie przewyższają wartości obserwowane u form dzikich [15]. Funkcją białka GIGANTEA jest przypuszczalnie utrzymywanie rytmów okołodobowych w warunkach temperatury różnych od 17°C ze względu na znikomą jego rolę w tej temperaturze [49].

RELACJE MIĘDZY CYKLEM OKOŁODOBOWYM A CYKLEM ROZWOJOWYM

Zegar okołodobowy kontroluje wiele procesów rozwojowych zachodzących w ciągu całego życia rośliny. Jedne z nich mają codzienny charakter i są bezpośrednio regulowane przez zegar. Inne zdarzają się w odstępach rocznych i są kontrolowane przez zmiany długości dnia (fotoperiod) wykrywane przez centralny oscylator. Już w najwcześniejszych stadiach rozwoju system okołodobowy może regulować kiełkowanie nasion. U wielu gatunków roślin między innymi *Betula*



RYCINA 4. Kompensacja temperatury zegara okołodobowego *A. thaliana*. Białka są symbolizowane przez prostopadłościany z nazwą w środku. Ciągłe linie zakończone grotami symbolizują pozytywną aktywność białek. Poprzeczne kreski kończące ciągłe linie oznaczają negatywną aktywność białek. Linie przerywane oznaczają interakcje niepotwierdzone eksperymentalnie. Wielkość figur oznacza względny udział białka w procesie kompensacji we wskazanej temperaturze [wg 73, zmodyfikowane].

FIGURE 4. Temperature compensation of the *A. thaliana* circadian clock. Proteins are depicted as rectangular prism with the protein name within the shape. Positive protein activity is indicated with solid lines ending in arrowheads. Lines ending in perpendicular dashes indicate negative activity. Dashed lines denote hypothetical interactions. Size of boxes indicates the relative contribution of each protein in compensation at the indicated temperatures [according to 73, modified]

pubescens, *Diapensia lapponica* i *Chamaedaphne calyculata* kiełkowanie jest zależne od fotoperiodu. Obecność fotoperiodycznej kontroli tego procesu sugeruje aktywność zegara okołodobowego w kiełkujących nasionach, przynajmniej u niektórych gatunków. Absorpcja wody przez nasiona *A. thaliana* powoduje synchronizację ekspresji genów będących pod kontrolą centralnego oscylatora. Suche nasiona *Allium cepa* wykazują okołodobową rytmiczność w procesach wymiany gazowej w warunkach ciągłej ciemności. Wskazuje to na prawdopodobne funkcjonowanie oscylatora również w nasionach niekiełkujących. Elongacja hipokotyli *A. thaliana* związana jest z działalnością centralnego oscylatora. Szybkość wzrostu hipokotyli jest największa wieczorem, a minimalna w godzinach porannych. Światło może nastawić jego zegar biologiczny nawet przed wykiełkowaniem. Podobne zależności dotyczące elongacji zaobserwowano u dorosłych osobników *Lycopersicum esculentum* i *Chenopodium rubrum*. Ruchy liści i liścieni są regulowane u *A. thaliana* oraz roślin strączkowych przez centralny oscylator [68]. Mechanizmy zmian turgoru komórki oraz zróżnicowanego wzrostu komórkowego, kontrolujące ruchy roślin różnią się między gatunkami. Szybkość zachodzenia ruchów nastycznych łodyg znajduje się również pod kontrolą zegara okołodobowego i jest najwyższa w czasie świtu [45]. Proces unikania zacielenia regulowany przez oscylator, a polegający na wykrywaniu zagrożeń związanych z brakiem światła, pozwala roślinom zapoczątkować odpowiednie zmiany w tempie i kierunku wzrostu, zanim dojdzie do kompletnego zacielenia. Wśród szeregu mechanizmów nazwanych „syndromem unikania zacielenia” zaobserwowano zmiany dotyczące wydłużania się łodyg i szypulek liści często kosztem rozwoju samych liści oraz organów magazynujących [68].

Najlepiej scharakteryzowanym zjawiskiem regulowanym przez zegar okołodobowy jest kwitnienie. Według modelu zewnętrznej zgodności, centralny oscylator kontroluje ekspresję genów regulujących odpowiedź na czynnik świetlny. Odpowiednie warunki świetlne oraz poziom niektórych czynników, np. białka CO (*CONSTANS*) w liściach stymulują kwitnienie roślin. *A. thaliana* jest fakultatywnie wrażliwa na długość dnia, zakwita wcześniej w okresie długiego niż krótkiego fotoperiodu. Analizy wielu mutantów pozwoliły zidentyfikować białko GI jako komponent zegara regulujący indukcję kwitnienia [14, 36, 41, 65].

Zegar okołodobowy kontroluje również zapylenie, które jest niezbędne dla prawidłowego wytworzenia nasion. Reprodukacja wielu gatunków roślin jest uzależniona od organizmów zapylających, które są aktywne tylko w pewnych porach dnia. Niektóre gatunki roślin w celu maksymalizowania prawdopodobieństwa skutecznego zapylenia i minimalizacji zniszczeń regulują otwieranie kwiatów przez centralny oscylator tylko w tym okresie dnia, który koreluje z aktywnością tych organizmów. Płatki korony kwiatów *A. thaliana* otwierają się rano, a zamykają w południe, podczas gdy gatunek *Cestrum nocturnum* otwiera swoje kwiaty wieczorem i zamyka około świtu [68].

Kolejną istotną cechą w relacjach na linii roślina-owad są charakterystyczne zapachy wydzielane przez rośliny będące kombinacją unikalnych, lotnych związków chemicznych. Emitowanie niektórych z nich jest regulowane przez centralny oscylator

w odpowiedniej fazie zgodnej z aktywnością owadów-zapylaczy. Przykładowo u *Antirrhinum majus*, którego kwiaty zapylane są przez pszczoły, emisja benzoesanu metylu, mirceny i (E)- β -ocimeny jest wysoka w ciągu dnia. Dla kontrastu benzoesan metylu jest emitowany w ciągu nocy przez kwiaty *Nicotiana suaveolens* i *Petunia x hybryda* w celu przyciągania ciem. Rytmiczność tych procesów związana jest z aktywnością centralnego oscylatora i prawdopodobnie jest rezultatem okołodobowych oscylacji na poziomie mRNA genów związanych z wytwarzaniem zapachów oraz zmian aktywności enzymów uczestniczących w ich biosyntezie, a także ilości dostępnych substratów. Wydzielanie nektarów jest dodatkowym czynnikiem mogącym wpływać na skuteczne zapylenie. Odpowiedni czas sekrecji nektaru wabiącego potencjalnych zapylaczy u niektórych gatunków *Compositae* jest sterowany przez centralny oscylator [68].

U niektórych podgatunków roślin uprawnych, np. *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* tworzenie bulw jest zależne od fotoperiodu, a ortolog genu *CONSTANS* może być również zaangażowany w ten proces. Innym procesem zależnym od fotoperiodu jest przechodzenie roślin drzewiastych w stan spoczynku zimowego. Geny centralnego oscylatora *Castanea sativa* wydają się częściowo brać udział w regulowaniu tego procesu [51]. Zegar okołodobowy może kontrolować również procesy na poziomie pojedynczej komórki. Aparaty szparkowe *A. thaliana* otwierają się w dzień, a rośliny typu C₄ mają szparki otwarte w nocy. Fotosynteza i wiązanie CO₂ są dwoma istotnymi procesami mającymi miejsce w ciągu dnia. Ekspresja wielu genów *A. thaliana* biorących udział w funkcjonowaniu kompleksu zbierającego energię świetlną podczas fotosyntezy, m.in. genów *LHCA/LHCB* (*Light-Harvesting Complex A/Light-Harvesting Complex B*) kodujących polipeptydy wiążące chlorofil a i b w fotosystemach I/II (PSI/II) oraz genów *RBCS* (*RUBISCO SMALL SUBUNIT*) i *RCA* (*RUBISCO ACTIVASE*) biorących udział w wiązaniu CO₂, jest pod kontrolą centralnego oscylatora [68]. Niektóre geny kodujące białka zaangażowane w fotooddychanie, transport i metabolizm cukrów mogą być również pod kontrolą zegara okołodobowego [34]. Centralny oscylator może także regulować ekspresję genów kodujących enzymy katalizujące biosyntezę pigmentów chroniących rośliny przed światłem. Poziom mRNA niektórych genów odpowiedzi na patogeny u *A. thaliana* może również być modulowany przez system okołodobowy [68].

MOLEKULARNE PODSTAWY FUNKCJONOWANIA CENTRALNEGO OSCYLATORA

Sygnały wejściowe

Najistotniejszym bodźcem wpływającym na działanie centralnego oscylatora jest światło [14, 60]. Pomimo że rola fotoreceptorów w funkcjonowaniu zegara okołodobowego została dobrze opisana, w dalszym ciągu mało wiadomo na temat transdukcji sygnałów świetlnych do centralnego oscylatora. Ekspresja genów *CCA1/LHY*, *GI*, *ELF4* i *PRR9* stanowiących rdzeń zegara jest indukowana przez światło

[10, 26, 32]. Jednym z elementów łączących sygnały świetlne z oscylatorem jest PIF3 (*PHYTOCHROM-INTERACTING FACTOR 3*), czynnik transkrypcyjny współdziałający z PhyA i PhyB. Wykazano, że białko PIF3 tworzy kompleks z elementem G-box białek CCA1/LHY oraz aktywną formą fitochromu (Pfr) absorbującą światło dalekiej czerwieni [20]. Indukcja światłem czerwonym jest osłabiona w niektórych liniach, w których ekspresji ulegają antysensowne transkrypty genu *PIF3*. Sugeruje to zaangażowanie białka PIF3 w regulację ekspresji genów *CCA1/LHY*. Jak wykazała analiza dwuhybrydowa, u drożdży białko PIF3 wchodzi w interakcję z białkiem TOC1, jednakże genetyczne modyfikacje ekspresji genu *PIF3* przez nadekspresję jego sekwencji antysensownej nie wywierały żadnego wpływu na okresowość lub zmianę fazy zegara, co sugeruje, że *PIF3* nie pełni żadnej istotnej roli w tych aspektach funkcjonowania zegara okołodobowego [64]. Światło może wpływać również na centralny oscylator przez produkt genu *DET1* (*DE-ETIOLATED 1*), a białko o tej samej nazwie jest negatywnym regulatorem sygnałów związanych z receptorami Phy i Cry. Mutant *A. thaliana det1* ma skrócony okres rytmu okołodobowego, prawdopodobnie z powodu hamowania degradacji białka LHY. Białko COP1 (*CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1*) przypuszczalnie bierze udział w transdukcji sygnałów świetlnych do centralnego oscylatora, podobnie jak DET1. Mutant *cop1-6* wykazuje skróconą okresowość rytmu okołodobowego [20, 61]. Geny *FHY* (*FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1*) oraz *FHY3* kodują czynniki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów z fotoreceptora PhyA, niezbędne do zmiany fazy rytmu ruchów liści w odpowiedzi na bodźce świetlne z zakresu dalekiej czerwieni [20]. Mutacja genu *SPA1* (*SUPPRESSOR OF PHYA1*), który jest również zaangażowany w transdukcję sygnałów z PhyA do centralnego oscylatora, prowadzi do niewielkiego skrócenia okresu ekspresji genów *TOC1/LHY* [21]. Mutacja genu *SRR1* (*SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1*) związanego z przekazywaniem sygnałów z PhyB podobnie jak *SPA1* i *FHY3* powoduje skrócenie okresu oscylacji ruchów liści oraz wpływa na periodyczność ekspresji *TOC1* i *CCA1* – komponentów centralnego oscylatora. Pewne szlaki sygnałów wejściowych do centralnego oscylatora podczas świtu są bramkowane, co powoduje mniejszą wrażliwość zegara biologicznego podczas tej fazy dnia. Proces ten jest zależny od genu *ELF3* (*EARLY FLOWERING3*). Bramkowanie sygnałów jest konieczne dla prawidłowego nastawienia zegara w czasie długiego fotoperiodu oraz dla kontynuowania oscylacji w ciągłym świetle. Białko ELF3 może wchodzić w interakcję z fotoreceptorem PhyB hamując jego funkcje w godzinach porannych [20].

Prawdopodobnie także inne fotoreceptory poza kryptochromami i fitochromami mogą brać udział w nastawianiu centralnego oscylatora. Fototropiny są kandydatami do transdukcji sygnałów świetlnych w zakresie światła niebieskiego, jednak ich rola nie została jeszcze gruntownie zbadana [14]. Alternatywną możliwością jest pośredniczenie w przesyłaniu sygnałów świetlnych przez białka ZTL (*ZEITLUPE*) i LKP2 (*LOV/KELCH PROTEIN 2*). ZTL należy do rodziny białek zawierających trzy charakterystyczne domeny: centralną kasetę F-box, domenę LOV (*LIGHT, OXYGEN, VOLTAGE*), która wykazuje podobieństwo z domeną przylączającą chromofor

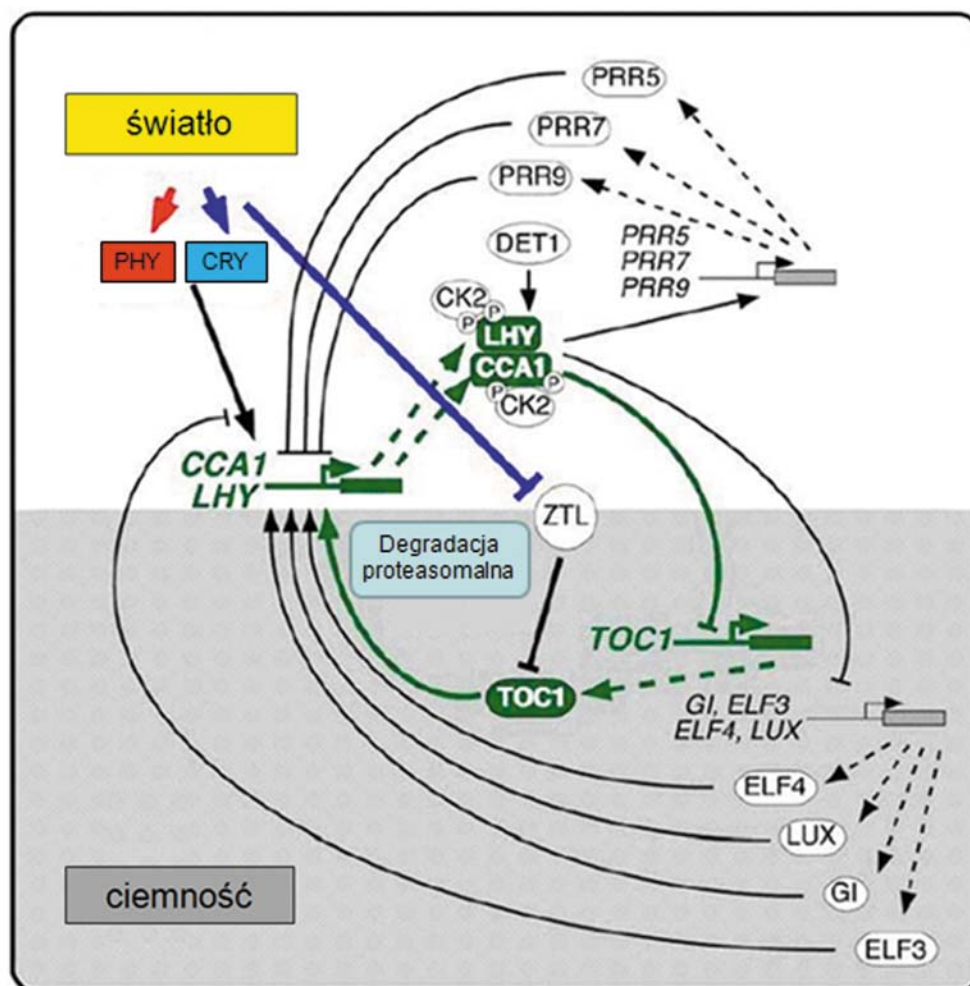
fototropin oraz sześciu terminalnych powtórzeń KELCH. Domena LOV zmienia swoją konformację w czasie ekspozycji na światło niebieskie w warunkach *in vitro* [20]. Wszystkie opisane mutacje genu *ZTL* powodują wydłużenie okresu rytmu okołodobowego nie tylko w ciągłym świetle, ale również w ciągłej ciemności, co sugeruje, że światło nie musi być istotnym regulatorem *ZTL* [24].

Wielokrotne pętle sprzężeń zwrotnych

Centralny oscylator u *A. thaliana* składa się z elementów zorganizowanych w wielokrotne pętle sprzężeń zwrotnych (ryc. 5) [10, 14]. Interakcje genów *TOC1*, *LHY* i *CCA1* stanowią podstawę głównego sprzężenia zwrotnego. Gen *CCA1* ma wysoki stopień podobieństwa do innego genu centralnego oscylatora *LHY* [69]. Geny *CCA1* i *LHY* kodują czynniki transkrypcyjne typu MYB-like, które wiążą się do podobnych sekwencji DNA. Nadekspresja obu genów zwiększa amplitudę rytmu okołodobowego, co wskazuje, że są one komponentami oscylatora i odgrywają częściowo uzupełniające się funkcje w jego działaniu [14]. Białka kodowane przez geny *CCA1* i *LHY* wiążą się z promotorem genu *TOC1*. Transkrypcja i translacja genu *TOC1* promuje ekspresję genów *CCA1* i *LHY* przez nieznaną mechanizm [5, 9, 14, 15, 32, 35, 38, 40, 44]. Ilość transkryptów *CCA1* i *LHY* jest największa podczas świtu. Białka *CCA1* i *LHY* są produkowane w ciągu 2–3 godzin i hamują ekspresję genu *TOC1*, przylaczając się do jego sekwencji promotorowej [14]. To powoduje stopniowy spadek ilości białka *TOC1*, a w konsekwencji obniżenie produkcji protein *CCA1* i *LHY*. Po zmniejszeniu się ich poziomu, represja ekspresji genu *TOC1* jest zniesiona i cykl zostaje wznowiony.

Wydaje się, że białko *TOC1* jest niewystarczające do zainicjowania ekspresji genów *CCA1* i *LHY*. Ekspresja kilku innych genów, wliczając w to *GI*, *ELF3*, *ELF4* (*EARLY FLOWERING 4*) i *LUX* (*LUX ARRHYTHMO*) jest wymagana do ekspresji genów *CCA1* i *LHY* [19]. Przynajmniej dwie inne pętle są powiązane ze sprzężeniem zwrotnym genów *TOC1*, *LHY* i *CCA1* [38]. Wiele biologicznych badań opierających się na analizach matematycznych wykazało niekompletność modelu uwzględniającego jedną pętlę sprzężenia zwrotnego. Wymagał on modyfikacji w celu pełniejszego wyjaśnienia mechanizmów rządzących cyklem okołodobowym. Czas, w którym rozpoczyna się transkrypcja *CCA1* i *LHY*, nie zgadza się z czasem, w którym translacja *TOC1* osiąga swój maksymalny poziom [20, 32]. Jest to dowód na istnienie dodatkowych elementów centralnego oscylatora. Modelowanie komputerowe pozwoliło na ustalenie dodatkowych hipotetycznych komponentów X i Y [32]. Element X odpowiada za opóźnienie między ekspresją genów *TOC1* i *LHY/CCA1*. Białko Y pozytywnie reguluje ekspresję genu *TOC1*, a transkrypcja genu *Y* jest hamowana przez białka *TOC1*, *LHY* i *CCA1* [33, 36]. Wzór ekspresji *GI* jest bardzo podobny do charakterystyki elementu Y [20, 32, 41]. Czynniki transkrypcyjne *CCA1* i *LHY* negatywnie regulują ekspresję genów *TOC1* i *GI* [36].

Ekspresja genu *LUX*, którego produkt białkowy ma domenę MYB wiążącą DNA, jest skorelowana z ekspresją genu *TOC1*. Rośliny, u których występuje nadekspresja genu *LUX*, stają się stopniowo arytmiczne w ciągłym świetle lub w ciągłej ciemności.



RYCINA 5. Molekularny model działania centralnego oscylatora *A. thaliana*. Geny są symbolizowane przez prostokąty z nazwą odpowiedniego genu po lewej stronie. Białkom odpowiadają owalne i podłużne kształty zawierające nazwę właściwego białka w środku. Przerywane linie oznaczają transkrypcję i translację. Ciągłe linie zakończone grotami symbolizują pozytywną aktywność białek. Poprzeczne kreski kończące ciągłe linie oznaczają negatywną aktywność białek. Sprzężenie zwrotne genów *CCA1/LHY/TOC1* będących rdzeniem centralnego oscylatora jest zaznaczone kolorem zielonym. Fosforylacja białek LHY i CCA1 przez CK2 jest symbolizowana przez literę P w kole. Zaciemniony obszar określa elementy, których maksymalna aktywność następuje w nocy. Biały obszar zawiera elementy, których fazą maksymalnej aktywności jest dzień [wg 55, zmodyfikowane]

FIGURE 5. A molecular model of the *A. thaliana* circadian oscillator's activity. Genes are indicated by solid boxes with the gene names at the left. Proteins are depicted as oval and oblong shapes, with the protein name indicated within the shape. Transcription and translation are indicated by dashed lines. Protein activity is indicated with solid lines, with lines ending in arrowheads indicating positive action and lines ending in perpendicular dashes indicating negative action. The core *CCA1/LHY/TOC1* feedback loop is highlighted in green with thick lines and closed shapes. Phosphorylation of LHY and CCA1 by CK2 is indicated with circled Ps. Shaded area indicates activities peaking in the subjective night. White area indicates activities peaking during the subjective day [according to 55, modified]

Mutant *lux1* wykazuje brak oscylacji w obu warunkach. Sugeruje to centralną rolę genu *LUX* w generowaniu rytmów [19, 47].

Gen *ELF4*, którego ekspresja występuje w tej samej fazie co *TOC1*, może być elementem kolejnego sprzężenia zwrotnego. Jest on niezbędny do normalnego funkcjonowania zegara okołodobowego [40]. Mutacja *elf4* obniża amplitudę rytmu okołodobowego, co sprawia, że gen ten jest zaliczany do głównych komponentów tworzących centralny oscylator [26, 40]. Ekspresja *ELF4* indukowana jest światłem i wymaga interakcji z genami *CCA1* i *LHY*, zaś białko ELF4 niezbędne jest do rozpoczęcia ekspresji *CCA1* i *LHY* [20]. Mutanty *elf4-1* wykazują niski poziom ekspresji genów *CCA1* i *LHY*, podczas gdy ekspresja *TOC1* jest wysoka [26, 40], co sugeruje negatywną regulację ekspresji genu *TOC1* przez białko ELF4 [38].

Geny *CCA1* i *LHY* są pozytywnymi regulatorami ekspresji grupy genów *PRR* (*PSEUDO RESPONSE REGULATORS*): *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*, do której należy również *TOC1* [10, 17, 42]. Białka *PRR5/7/9* negatywnie regulują ekspresję genów *CCA1* i *LHY*. Maksymalny poziom transkrypcji genów *PRR7* i *PRR9* następuje w momencie spadku ekspresji *CCA1/LHY*, prawdopodobnie dzięki bezpośredniemu zaangażowaniu białek *PRR7* i *PRR9* w hamowanie ekspresji elementów *CCA1* i *LHY*. Zdolność do specyficznego wiązania się czynnika transkrypcyjnego *CCA1* z sekwencjami promotorowymi genów *PRR7/9* oraz fakt, że faza maksymalnej ilości białek *CCA1/LHY* następuje na kilka godzin przed pojawieniem się mRNA *PRR7/9*, sugerują bezpośrednią regulację transkrypcji genów *PRR7* i *PRR9* przez białka *CCA1* i *LHY* [10].

Białko ZEITLUPE (ZTL) mające domenę F-box przyłącza się do białka *TOC1* przyczyniając się do jego degradacji przez kulinę (*COLLINA*) wchodzącą w skład kompleksu funkcjonalnego SCF. ZTL reguluje również degradację białka *PRR1* przez bezpośrednie przyłączenie [18, 25, 35]. Interakcje między białkami *TOC1* i ZTL zapobiegają interakcjom na poziomie *TOC1/PRR3* prowadząc do hamowania degradacji białka *TOC1* w tkankach naczyniowych [11, 35, 48]. Dodatkowo ZTL jest stabilizowane przez bezpośrednie oddziaływanie z białkiem GI podczas wzrostu w niebieskim świetle [27, 35, 53].

Sygnały wyjściowe i mechanizm sprzężenia zwrotnego

Sygnały wyjściowe generowane przez centralny oscylator prowadzą do tworzenia rytmów obejmujących takie procesy, jak: fotosynteza, ruchy liści, elongacja hypocotyli, otwieranie szparek [45]. Mechanizmy przesyłania impulsów wytworzonych przez centralny oscylator i regulujących fizjologię nie zostały jeszcze dokładnie opisane. Można wyróżnić przynajmniej trzy sposoby regulacji transdukcji sygnałów generowanych przez centralny oscylator: kontrola ilości wytworzonego białka, regulacja aktywności enzymatycznej, zmiany w poziomie metabolitów. Zegar okołodobowy może regulować ilość białek zaangażowanych w ścieżki metaboliczne poprzez kontrolę transkrypcji genów, stabilność mRNA, tempo translacji i regulację degradacji białek. Białka regulatorowe wykazujące rytmiczność mogą regulować aktywność białek powiązanych ze ścieżkami metabolicznymi [20]. Ustabilizowany

poziom ilości transkryptu genu wchodzącego w skład centralnego oscylatora może inicjować powstanie sygnału wyjściowego. Wiele czynników transkrypcyjnych reguluje bezpośrednio ekspresję genów biorących udział w dalszej części procesu. Białko CCA1 aktywuje ekspresję genów *LHC* i hamuje ekspresję kilku innych genów przyłączając się do ich sekwencji promotorowych [14]. Oscylator reguluje również ekspresję genów kodujących kluczowe czynniki transkrypcyjne, które z kolei wpływają na ekspresję genów związanych z rdzeniem zegara okołodobowego. W przybliżeniu od 2 do 16% wszystkich transkryptów *A. thaliana* wykazuje oscylacje. Transkrypty te kodują białka zaangażowane w syntezę flawonoidów, lignin, kwitnienie, elongację komórek, metabolizm węgla, wiązanie azotu, asymilację związków mineralnych i fotosyntezę [9, 14]. Wiele z nich koduje białka regulatorowe, takie jak kinazy i fosfatazy. Prawdopodobnie ilość transkryptów będących pod kontrolą zegara okołodobowego jest większa, niż sugerowałaby to przytoczona wcześniej wartość procentowa. Geny kodujące białka biorące udział w powiązanych ze sobą procesach podlegają wspólnej regulacji w specyficznych fazach cyklu. Dla przykładu jednoczesna ekspresja genów, które kodują białka będące komponentami kompleksu zbierającego światło LHC, następuje w środkowej części dnia, kiedy intensywność światła jest największa [20]. Podobnie maksymalny poziom ekspresji genów związanych ze wzrostem wydłużeniowym następuje podczas popołudnia. Badania wskazują, że rytmiczne oscylacje transkryptów stanowią podstawę wielu procesów fizjologicznych u *A. thaliana* [14].

Sygnały wejściowe mogą bazować na zmianach w koncentracji uwolnionego w cytozolu Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) [6, 13]. U *A. thaliana* koncentracja cytozolowego Ca^{2+} wykazuje oscylacje okołodobowe w ciągłym świetle i w czasie trwania cyklu dzień/noc. Dzielne oscylacje wolnego, cytozolowego Ca^{2+} przypuszczalnie niosą sygnały związane z fotoperiódem, a natura tego procesu jest obszarem aktywnych badań [7, 28, 63, 67]. Jony Ca^{2+} są istotnym wtórnym przekazywaczem i dlatego okołodobowe modulacje koncentracji $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ mogą wpływać na fizjologię komórki [14]. Funkcje $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ w rytmicznych oscylacjach okołodobowych nie zostały jeszcze ustalone. Zaproponowano natomiast udział tych jonów w reakcjach roślin na światło, ruchach liści i fotosyntezie typu C4 [6, 13]. Identyfikacja roli $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ jest utrudniona ze względu na problemy techniczne przy pomiarze oscylacji na poziomie pojedynczej komórki [28].

Obecność u *A. thaliana* dodatkowej pętli związanej z sygnalizacją małej cyklicznej molekuly cADPR (cykliczny adenozyndifosforan rybozy) podkreśla znaczenie wpływu zegara biologicznego na procesy mające miejsce w cytozolu [8, 52]. U ssaków cADPR jest ważnym wewnątrzkomórkowym pośrednikiem uwalniającym Ca^{2+} . Kofaktorem cyklicznej ADP rybozy, przeprowadzającej reakcję metabolizowania cADPR jest NAD (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy), a produkt uboczny – nikotynoamid hamuje produkcję cADPR. Rośliny reagują na cADPR uwalniając zasoby Ca^{2+} z wakuoli oraz retikulum endoplazmatycznego. Receptory i enzymy zaangażowane w produkcję cADPR nie zostały jeszcze scharakteryzowane na poziomie molekularnym. cADPR jest związany z kilkoma odpowiedziami roślin na

stres [52]. Okołodobowe oscylacje cADPR są kierowane przez transkrypcyjne pętle zwrotne centralnego oscylatora. Hamowanie produkcji cADPR przez nikotynoamid znosi okołodobowe oscylacje cytozolowego Ca^{2+} oraz wydłuża okres ekspresji genów *CCA1*, *LHY*, *TOC1*, *CAB2* i okres ruchów liści. Wskazuje to, że cADPR jest wymagany do kierowania oscylacjami $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oraz moduluje pętle zwrotne. Istnienie pętli transdukcji sygnału w cytozolu, ściśle związanej z centralnym oscylatorem wzmacnia jego stabilność i pozwala zarówno na jego modulację przez stres oraz regulację odpowiedzi na ten czynnik. Cytoplazmatyczne stężenie Ca^{2+} i cADPR bierze udział w przesyłaniu sygnałów zależnych zarówno od stresów biotycznych, jak i abiotycznych [8].

ROLA HORMONÓW W FUNKCJONOWANIU ZEGARA OKOŁODOBOWEGO

Hormony wpływają na większość znanych procesów kontrolowanych przez zegar okołodobowy, a w niektórych przypadkach funkcjonuje on dzięki zmianom w poziomie hormonów i ich percepcji. Sygnały generowane przez oscylator oraz szlaki hormonalne zazębiają się wskazując na udział hormonów w cyklu okołodobowym. Jak zauważono już w 1937 roku, wrażliwość roślin na działanie auksyn zmienia się w ciągu dnia [52]. Ma to związek z bramkowaniem sygnalizacji auksyn przez centralny oscylator [4]. Auksyny są regulatorem wzrostu i rozwoju roślin [30]. Poziomy IAA (kwas indolilo-3-octowy) i jego skoniugowanej formy IAA-kwas aspartamowy wahają się w ciągu doby u *A. thaliana*. Ekspresja genów zaangażowanych w transport i biosyntezę auksyn, odpowiedź na auksyny i ich percepcję kontrolowana jest przez centralny oscylator [4, 52]. Interakcje na poziomie hormon-zegar okołodobowy nie są ograniczone tylko do auksyn, ale dotyczą również ABA (kwas abscysynowy), cytokinin i etylenu. ABA reguluje wiele procesów, między innymi kiełkowanie oraz kontroluje procesy wegetatywne i generatywne. Kwas abscysynowy jest zaangażowany w odpowiedzi rośliny na liczne stresy, wliczając w to deficyt wody, niedotlenienie, zasolenie i wpływa na odpowiedzi podczas zranienia lub ataku patogenów. Centralny oscylator reguluje wiele z tych procesów. Występuje znacząca ilość genów, których ekspresja jest regulowana przez oscylator i przez ABA [43]. Dla kontrastu grupa genów, których ekspresja regulowana jest przez etylen, cytokininy, gibereliny i brasinosteroidy, nie pokrywa się z grupą genów będących pod kontrolą cyklu okołodobowego [8, 43, 52]. Otwieranie szparek jest przykładem fizjologicznego procesu regulowanego zarówno przez centralny oscylator, jak i kwas abscysynowy. Aktywacja kanałów wpływu jonów K^{+} do komórki powoduje otwieranie szparek [29]. Podczas deficytu wody ABA zmniejsza otwarcie szparki. Otwieranie szparek umożliwiające pobieranie CO_2 w chłodne poranki, kiedy transpiracja jest najmniejsza oraz zamykanie ich w czasie gorącego popołudnia może być związane z bramkowaniem przez centralny oscylator sygnałów wywołanych przez ABA [52]. Sygnalizacje ABA i centralnego oscylatora są w wysokim stopniu powiązane, ABA wpływa na okresowość zegara okołodobowego.

dobowego. Okres rytmicznych oscylacji genów *CCA1*, *CAB2* i *GRP7/CCR2* (*Glycine-rich RNA-binding protein7/Cold, Circadian Rhythm RNA-binding 2*) wydłuża się w przypadku podania egzogenego ABA w ciągłym świetle [16]. Wpływ ABA na koncentrację cADPR może tłumaczyć efekty tego hormonu związane z wydłużaniem okresu cyklu okołodobowego, lecz zmiany w ilości cADPR w znikomy sposób oddziałują na oscylator [8, 52].

Cytokiny przyspieszają podziały komórkowe oraz odpowiadają za formowanie pędów. Egzogenna aplikacja cytokinin wpływa na fazę, ale nie na okres zegara okołodobowego i zwiększa transkrypcję genów *CCA1*, *LHY* oraz *TOC1* [16, 57, 70]. Uważa się, że gen odpowiedzi na cytokiny *ARR4* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR4*) pośredniczy w regulowaniu działania rdzenia centralnego oscylatora [52, 57]. Mutant *arr4* jest niewrażliwy na cytokiny [70], a linia *ARR4-ox*, która wykazuje nadekspresję tego genu, cechuje się nadwrażliwością na ten hormon [16].

Oscylacje ilości etylenu w ciągu dnia związane są z regulowaniem przez centralny oscylator poziomu transkryptu genu syntazy ACC (kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy) przekształcającej S-adenozylometioninę w ACC, który jest bezpośrednim prekursorem etylenu. Etylen prawdopodobnie nie ma wpływu na oscylator i generowanie sygnałów wyjściowych, jednakże odgrywa rolę w reakcjach na stres biotyczny i abiotyczny [52].

TRANSKRYPCYJNE, TRANSLACYJNE I POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE ELEMENTÓW CENTRALNEGO OSCYLATORA

Kontrola transkrypcyjna jest prawdopodobnie jednym z najistotniejszych mechanizmów regulacji procesów związanych z rozwojem, fizjologią i metabolizmem roślin. Badania przeprowadzone na myszach, *Drosophila melanogaster* i *Neurospora crassa* wykazały, że duży procent genomu różnych organizmów jest pod kontrolą zegara okołodobowego [68]. Genom cyjanobakterii *Synechococcus elongates* PCC 7942 jest w zdecydowanej większości pod kontrolą centralnego oscylatora. System przesyłania sygnałów, zbudowany z dwóch komponentów wydaje się być jednym z mechanizmów, dzięki którym zegar okołodobowy cyjanobakterii reguluje transkrypcję [39, 62].

U *A. thaliana* 36% genomu jest kontrolowane przez centralny oscylator, którego przynajmniej dwa elementy są czynnikami transkrypcyjnymi (białka *CCA1* i *LHY*) bezpośrednio kontrolującymi ekspresję wielu genów [9, 68, 69]. Kilka charakterystycznych motywów zostało zidentyfikowanych w sekwencjach promotorowych genów regulowanych przez białka związane z centralnym oscylatorem. Jeden z nich o sekwencji zasad AAATATCT znany również jako EE (*Evening Element*) jest bogato reprezentowany w promotorach genów centralnego oscylatora, których ekspresja wykazuje najwyższą wartość wieczorem [68]. Badania *in vitro* pokazały, że białka *CCA1* i *LHY* mogą bezpośrednio przyłączać się do elementu EE [17, 19]. Co więcej, sztucznie stworzony promotor zawierający cztery tandemowo powtórzone sekwencje EE oddzielone szesnastoma przypadkowymi nukleotydami zapewnia ekspresję genu

reporterowego *LUC* w fazie wieczornej cyklu. Sekwencja EE determinuje w ten sposób ekspresję genu zgodną z fazą rytmu [17]. Mutacje w sekwencji EE powodują zmianę w okołodobowym wzorze ekspresji. Wiele genów regulowanych przez zegar okołodobowy, których ekspresja następuje wieczorem, nie zawiera w swoich sekwencjach promotorowych motywu EE, podczas gdy jego obecność została odkryta w promotorach genów, których najwyższy poziom ekspresji zachodzi w godzinach rannych [68].

Tylko jedna para zasad azotowych różni kolejny istotny motyw związany z regulacją transkrypcji genów centralnego oscylatora. Motyw CBS (*CCA1-Binding Site*) o sekwencji AAAAATCT po raz pierwszy został scharakteryzowany w 1997 roku przez Wanga i współpracowników w promotorze genu *CAB1*, do którego przyłącza się białko CCA1 [68]. CBS nie jest nadmiernie reprezentowany w sekwencjach promotorowych genów centralnego oscylatora. Istnieją jednak sprzeczne informacje dotyczące roli elementu CBS w determinacji fazy ekspresji genów. Zmiana jednej zasady, powodująca przekształcenie się elementu EE w CBS w sztucznej sekwencji promotorowej, bazującej na rzeczywistym promotorze genu *CCR2*, nie miała wpływu na fazę maksymalnej ekspresji tego genu [17, 68]. Dla kontrastu zamiana elementu EE w promotorze genu *CAT3* (*CATALASE 3*) w CBS nie powodowała zmiany fazy maksymalnej ekspresji genu z wieczornej na poranną. Prawdopodobnie inne elementy w sekwencji promotorowej genu *CAT3* są wymagane do determinacji fazy jego ekspresji. Same sekwencje EE i CBS obecne w promotorach genów będących pod kontrolą centralnego oscylatora są niewystarczające do wyjaśnienia wszystkich mechanizmów rządzących systemem okołodobowym. Różne kombinacje poznanych i jeszcze niepoznanych motywów w sekwencjach promotorowych są niezbędne do prawidłowej ekspresji w odpowiedniej fazie. Zidentyfikowana sekwencja AACCACGAAAAT może mieć udział w determinacji ekspresji genów fazy porannej [17]. Przyłącza się do niej nieznany jeszcze czynnik transkrypcyjny. Innym motywem jest sekwencja G-box (CACGTG) aktywowana światłem oraz związany z nią element Hex, aczkolwiek nie zostały one jeszcze zbadane eksperymentalnie [68].

Transkrypty genów związanych z centralnym oscylatorem *A. thaliana* wykazują wysoką niestabilność związaną z obecnością w ich sekwencjach elementów DST (ang. *destabilizing downstream*) w rejonach 3'UTR (ang. *untranslated region*). Eksperymenty na mutantach z zaburzoną funkcją destabilizacji transkryptów regulowaną przez DST wykazały, że okołodobowa regulacja czasu połowicznej degradacji transkryptów funkcjonuje w całej roślinie [31, 37]. Wyniki te sugerują, że szlaki degradacji mRNA mogą częściowo regulować cykl okołodobowy u roślin. Bardziej specyficzne badania genu *CCA1* wykazały, że światło reguluje stabilność jego transkryptu. mRNA genu *CCA1* jest stabilne w ciemności, ale w świetle czerwonym i niebieskim czas jego połowicznej degradacji jest krótszy. Określono lokalizację miejsc odpowiedzialnych za niestabilność tego transkryptu, które znajdują się w regionach kodujących [37, 69]. Regulacja transkrypcji genu *CCA1* przez światło, a także degradacja jego mRNA są istotne dla dokładnego zsynchronizowania zegara okołodobowego ze środowiskiem [37].

Oscylator może również regulować modyfikacje potranskrypcyjne. Białko GRP7, które wiąże RNA, ilustruje kolejny przykład potranskrypcyjnej regulacji elementów centralnego oscylatora. Konstytutywna nadekspresja genu *GRP7* promuje alternatywny splicing własnego pre-mRNA, prowadząc do wytworzenia krótszego wariantu mRNA. Gen *GRP7* reguluje oscylacje własnego transkryptu dzięki mechanizmowi sprzężenia zwrotnego. Białko GRP7 wiąże się specyficznie do dwóch sekwencji obecnych we własnym mRNA [37]. Negatywna autoregulacja może występować dzięki bezpośrednim kontaktom między białkiem a jego własnym pre-mRNA. Okresy połowicznej degradacji transkryptów genów *CCL* (*CCR-LIKE*) i *SEN1* (*SENESCENCE ASSOCIATED GENE 1*) wykazują większą intensywność rano niż w południe, nawet w warunkach stałej temperatury i ciągłego światła [31, 68].

Interesującym obszarem nowych badań są mikroRNA (miRNA) mogące funkcjonować jako sekwencje wyciszające (ang. *silencers*) ekspresję genów poprzez degradację mRNA lub hamowanie translacji. Wyniki ostatnich badań scharakteryzowały funkcjonalną rolę dwóch cząsteczek miRNA w resetowaniu fazy zegara okołodobowego ssaków. Centralny oscylator u roślin może być regulowany przez podobne mechanizmy [3, 37].

Kontrola translacyjna może być istotnym czynnikiem wprowadzającym opóźnienie pomiędzy produkcją transkryptów będących składnikami centralnego oscylatora a syntezą odpowiednich protein. Kontrola degradacji białek jest integralnym mechanizmem utrzymującym silne oscylacje okołodobowe na poziomie białek. Degradację przynajmniej jednego kluczowego białka będącego elementem centralnego oscylatora zaobserwowano u cyjanobakterii, *N. crassa*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* i ssaków. Fosforylacja białek poprzedzająca ich degradację wydaje się być bardzo istotną cechą charakteryzującą wszystkie powyższe organizmy. W wielu przypadkach CK1 (*Casein Kinase 1*) i CK2 mogą być głównymi kinazami białkowymi odpowiedzialnymi za ten proces. Przyłączenie do białka specjalnego znacznika, którym jest łańcuch ubikwityny, powoduje przeznaczenie tego białka do hydrolitycznej degradacji. W procesie tym, poza samą ubikwityną i proteasomem, uczestniczy również dodatkowy enzym będący kompleksem funkcjonalnym SCF, w którego skład wchodzi białka Skpl (*S-phase kinase associated protein1*), kulina oraz polipeptyd zawierający kasetę F [14]. Różne białka typu F-box mogą wchodzić w skład kompleksu SCF degradując w ten sposób różne elementy centralnego oscylatora, wliczając w to TOC1 *A. thaliana*.

Transkrypcyjne i potranskrypcyjne modyfikacje elementów centralnego oscylatora są istotne, ale najnowsze badania rzuciły nowe światło na mechanizmy regulujące cykl okołodobowy. Zmiany w strukturze chromatyny mogą mieć wpływ na ekspresję genów związanych z zegarem. Architektura chromatyny zmienia się podczas jej kondensacji i dekondensacji, a kontrola tych zmian jest powiązana z regulacją specyficznych funkcji komórki. Remodeling chromatyny, a więc zmiany w jej strukturze, indukowane są przez potranslacyjne modyfikacje N-końcowych fragmentów histonów [37, 50]. Takie modyfikacje chromatyny modulują dostępność genomu, tym samym regulują ekspresję genów. Hiperacetylacja histonów powoduje relaksację

włókien chromatyny i aktywację transkrypcji genów, zaś hipoacetylacja wywołuje kondensację chromatyny i hamowanie transkrypcji [59]. Dynamiczne zmiany w strukturze chromatyny są ściśle związane z funkcjonowaniem centralnego oscylatora *A. thaliana* [50].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich osiemnastu lat został poczyniony znaczący postęp dotyczący zrozumienia mechanizmów rządzących zegarem okołodobowym, jednakże wiele z nich pozostaje jeszcze niejasnych. Zarys budowy centralnego oscylatora jest znany, ale model ten pozostaje nadal niekompletny. Wydaje się, że model wzajemnie powiązanych pętli zwrotnych tworzących centralny oscylator jest prawidłowy, lecz nie wszystkie jego komponenty zostały zidentyfikowane, a szczegóły dotyczące funkcjonowania prawie każdego elementu centralnego oscylatora są niezupełnie poznane. Nie ma żadnych wątpliwości, że zegar okołodobowy odgrywa istotną rolę w życiu roślin, a także innych organizmów. Wbrew temu znaczeniu i pomimo znacznych postępów w zrozumieniu funkcjonowania centralnego oscylatora i szlaków wejściowych nadal mało wiadomo, jak zegar jest w stanie bardzo precyzyjnie regulować tak wiele różnorodnych procesów. Rozszyfrowanie mechanizmów, dzięki którym te procesy są kontrolowane, może pozwolić na modyfikację specyficznych procesów, które są regulowane przez zegar biologiczny. Umożliwi to również lepsze zrozumienie wielu aspektów fizjologii roślin. Priorytetem przyszłych badań powinna być identyfikacja nowych komponentów centralnego oscylatora, jak również wyjaśnienie interakcji między nimi. Postępy w zrozumieniu mechanizmów regulujących system okołodobowy mogą pomóc wyjaśnić złożoność funkcjonowania zegara i przyczynić się do bliższego zrozumienia fizjologii i metabolizmu roślin.

LITERATURA

- [1] AL-SADY B, NI W, KIRCHER S, SCHÄFER E, QUAIL PH. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 2006; **23**: 439–446.
- [2] BELL-PEDERSEN D, CASSONE VM, EARNEST DJ, GOLDEN SS, HARDIN PE, THOMAS TL, ZORAN MJ. Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **6**: 544–556.
- [3] CHENG HYM, PAPP JW, VARLAMOVA O, DZIEMA H, RUSSELL B, CURFMAN JP, NAKAZAWA T, SHIMIZU K, OKAMURA H, IMPEY S, OBRIETAN K. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 2007; **54**: 813–829.
- [4] COVINGTON ME, HARMER SL. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 2007; **5**: e222.
- [5] DING Z, MILLAR AJ, DAVIS AM, DAVIS SJ. *TIME FOR COFFEE* encodes a nuclear regulator in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Plant Cell* 2007; **19**: 1522–1536.
- [6] DODD AN, SALATHIA N, HALL A, KEVEI E, TOTH R, NAGY F, HIBBERD JM, MILLAR AJ, WEBB AAR. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival and competitive advantage. *Science* 2005; **309**: 630–633.

- [7] DODD AN, JAKOBSEN MK, BAKER AJ, TELZEROW A, HOU SW, LAPLAZE L, BARROT L, POETHIG RS, HASELOFF J, WEBB AAR. Time of day modulates low-temperature Ca^{2+} signals in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006; **48**: 962–973.
- [8] DODD AN, GARDNER MJ, HOTTA CT, HUBBARD KE, DALCHAU N, LOVE J, ASSIE JM, ROBERTSON FC, JAKOBSEN MK, GONCAVALES J, SANDERS D, WEBB AAR. The *Arabidopsis* circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science* 2007; **318**: 1789–1792.
- [9] EDWARDS KD, ANDERSON PE, HALL A, SALATHIA NS, LOCKE JC, LYNN JR, STRAUME M, SMITH JQ, MILLAR AJ. FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2006; **18**: 639–650.
- [10] FARRÉ EM, HARMER SL, HARMON FG, YANOVSKY MJ. Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol* 2005; **15**: 47–54.
- [11] FUJIWARA S, WANG L, HAN L, SUH SS, SALOMÉ PA, MCCLUNG CR, SOMERS DE. Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J Biol Chem* 2008; **283**: 23073–23083.
- [12] GAAL TV, ERWIN JE. Diurnal variation in thigmotropic inhibition of stem elongation. *HortTechnology* 2005; **15**: 291–294.
- [13] GARDNER MJ, DODD AN, HOTTA CT, SANDERS D, WEBB AAR. Circadian regulation of Ca^{2+} signalling. *Annu Plant Rev* 2005; **21**: 191–210.
- [14] GARDNER MJ, HUBBARD KE, HOTTA CT, DODD AN, WEBB AAR. How plants tell the time. *Biochem J* 2006; **397**: 15–24.
- [15] GOULD PD, LOCKE JC, LARUE C, SOUTHERN MM, DAVIS SJ, HANANO S, MOYLE R, MILICH R, PUTTERILL J, MILLAR AJ, HALL A. The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2006; **18**: 1177–1187.
- [16] HANANO S, DOMAGALSKA MA, NAGY F, DAVIS SJ. Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells* 2006; **11**: 1381–1392.
- [17] HARMER SL, KAY SA. Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 1926–1940.
- [18] HARMON F, IMAIZUMI T, GRAY WM. CUL1 regulates TOC1 protein stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant J* 2008; **55**: 568–579.
- [19] HAZEN SP, SCHULTZ TF, PRUNEDA-PAZ JL, BOREVITZ JO, ECKER JR, KAY SA. LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10387–10392.
- [20] HOTTA TC, GARDNER MJ, HUBBARD KE, BAEK SJ, DALCHAU N, SUHITA D, DODD AN, WEBB AAR. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ* 2007; **30**: 333–349.
- [21] ISHIKAWA M, KIBA T, CHUA NH. The *Arabidopsis* *SPA1* gene is required for circadian clock function and photoperiodic flowering. *Plant J* 2006; **46**: 736–746.
- [22] JIAO Y, LAU OS, DENG XW. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 217–230.
- [23] JOHNSON CH. Testing the adaptive value of circadian systems. *Methods Enzymol* 2005; **393**: 818–837.
- [24] KEVEI E, GYULA P, HALL A, KOZMA-BOGNÁR L, KIM WY, ERIKSSON ME, TOTTH R, HANANO S, FEHER B, SOUTHERN MM, BASTOW RM, VICZIÁN A, HIBBERD V, DAVIS SJ, SOMERS DE, NAGY F, MILLAR AJ. Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of *ZEITLUPE*. *Plant Physiol* 2006; **140**: 933–945.
- [25] KIBAT, HENRIQUES R, SAKAKIBARA H, CHUA NH. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCF-ZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2007; **19**: 2516–2530.
- [26] KIKIS EA, KHANNA R, QUAIL PH. *ELF4* is a phytochrome-regulated component of a negative feedback loop involving the central oscillator components *CCA1* and *LHY*. *Plant J* 2005; **44**: 300–313.
- [27] KIM WY, FUJIWARA S, SUH SS, KIM J, KIM Y, HAN L, DAVID K, PUTTERILL J, NAM HG, SOMERS DE. *ZEITLUPE* is a circadian photoreceptor stabilized by *GIGANTEA* in blue light. *Nature* 2007; **449**: 356–360.
- [28] KOLMOS E, SCHOOF H, PLÜMER M, DAVIS SJ. Structural insights into the function of the core-circadian factor *TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1)*. *J Circadian Rhythms* 2008; **6**: 3.
- [29] LEBAUDYA, VAVASSEURA, HOSY E, DREYER I, LEONHARDT N, THIBAUD JB, VÉRY AA, SIMONNEAU T, SENTENAC H. Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5271–5276.

- [30] LEYSER O. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 2005; **121**: 819–822.
- [31] LIDDER P, GUTIÉRREZ RA, SALOMÉ PA, MCCLUNG CR, GREEN PJ. Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiol* 2005; **138**: 2374–2385.
- [32] LOCKE JCW, SOUTHERN MM, KOZMA-BOGNÁR L, HIBBERD V, BROWN PE, TURNER MS, MILLAR AJ. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* 2005; **1**: E1–E9.
- [33] LOCKE JCW, KOZMA-BOGNÁR L, GOULD PD, FEHÉR B, KEVEI E, NAGY F, TURNER MS, HALL A, MILLAR AJ. Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 2006; **2**: 59.
- [34] LU Y, GEHAN JP, SHARKEY TD. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* 2005; **138**: 2280–2291.
- [35] LU SX, KNOWLES SM, ANDRONIS C, ONG MS, TOBIN EM. *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* and *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* function synergistically in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **150**: 834–843.
- [36] MARTIN-TRYON EL, KREPS JA, HARMER SL. *GIGANTEA* acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiol* 2007; **143**: 473–486.
- [37] MÁ S P. Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 273–281.
- [38] MCCLUNG CR. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 2006; **18**: 792–803.
- [39] MCCLUNG CR. Two-component signaling provides the major output from the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 11819–11820.
- [40] MCWATERS HG, KOLMOS E, HALLA, DOYLE MR, AMASINO RM, NAGY F, MILLAR AJ, DAVIS SJ. *ELF4* is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiol* 2007; **144**: 391–401.
- [41] MIZOGUCHI T, WRIGHT L, FUJIWARA S, CREMER F, LEE K, ONOUCHI H, MOURADOV A, FOWLER S, KAMADA H, PUTTERILL J, COUPLAND G. Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 2255–2270.
- [42] MIZUNO T, NAKAMICHI N. Pseudo-response regulators (*PRRs*) or true oscillator components (*TOCs*). *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 677–685.
- [43] MIZUNO T, YAMASHINO T. Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 481–487.
- [44] NAKAMICHI N, KITA M, ITO S, YAMASHINO T, MIZUNO T. *PSEUDO-RESPONSE REGULATORS*, *PRR9*, *PRR7* and *PRR5*, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 686–698.
- [45] NIINUMA K, SOMEYA N, KIMURA M, YAMAGUCHI I, HAMAMOTO H. Circadian rhythm of circumnutation in inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1423–1427.
- [46] OLIVERIO AK, CREPY M, MARTIN-TRYON EL, MILICH R, HARMER SL, PUTTERILL J, YANOVSKY MJ, CASAL JJ. *GIGANTEA* regulates phytochrome A-mediated photomorphogenesis independently of its role in the circadian clock. *Plant Physiol* 2007; **144**: 495–502.
- [47] ONAI K, ISHIURA M. *PHYTOCLOCK1* encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells* 2005; **10**: 963–972.
- [48] PARA A, FARRÉ EM, IMAIZUMI T, PRUNEDA-PAZ JL, HARMON FG, KAY SA. *PRR3* is a vascular regulator of *TOC1* stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2007; **19**: 3462–3473.
- [49] PENFIELD S. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol* 2008; **179**: 615–628.
- [50] PERALES M, MÁ S P. A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Cell* 2007; **19**: 2111–2123.
- [51] RAMOS A, PEREZ-SOLIS E, IBANEZ C, CASADO R, COLLADA C, GOMEZ L, ARAGONCILLO C, ALLONA I. Winter disruption of the circadian clock in chestnut. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 7037–7042.
- [52] ROBERTSON FC, SKEFFINGTON AW, GARDNER MJ, WEBB AAR. Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 419–427.
- [53] RUBIO V, DENG XW. Standing on the Shoulders of *GIGANTEA*. *Plant Sci* 2007; **318**: 1–2.

- [54] RYU JS, KIM J, KUNKEL T, KIM B, CHO D, HONG S, KIM S, FERNÁNDEZ A, KIM Y, ALONSO J, ECKER JR, NAGY F, LIM PO, SONG PS, SCHÄFER E, NAM HG. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* 2005; **120**: 395–406.
- [55] SALOMÉ PA, MCCLUNG CR. What makes the *Arabidopsis* clock tick on time? A review on entrainment. *Plant Cell Environ* 2005; **28**: 21–38.
- [56] SALOMÉ PA, MCCLUNG CR. *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR* 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2005; **17**: 791–803.
- [57] SALOMÉ PA, TO JPC, KIEBER JJ, MCCLUNG CR. *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell* 2006; **18**: 55–69.
- [58] SANG Y, LI QH, RUBIO V, ZHANG YC, MAO J, DENG XW, YANG HQ. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell* 2005; **17**: 1569–1584.
- [59] SHAHBAZIAN MD, GRUNSTEIN M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 75–100.
- [60] SOMERS DE. Entrainment of the circadian clock. *Annu Rev Plant Biol* 2005; **21**: 85–105.
- [61] SONG HR, CARRÉ IA. DET1 regulates the proteasomal degradation of LHY, a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Mol Biol* 2005; **57**: 761–771.
- [62] TAKAI N, NAKAJIMA M, OYAMA T, KITO R, SUITA M, KONDO T, IWASAKI H. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12109–12114.
- [63] TANG RH, HAN S, ZHENG H, COOK CW, CHOI CS, WOERNER TE, JACKSON RB, PEI ZM. Coupling diurnal cytosolic Ca^{2+} oscillations to the CAS-IP3 pathway in *Arabidopsis*. *Science* 2007; **315**: 1423–1426.
- [64] VICZIÁN A, KIRCHER S, FEJES E, MILLARAJ, SCHÄFER E, KOZMA-BOGNÁR L, NAGY F. Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 for the *Arabidopsis thaliana* circadian clock work. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1591–1602.
- [65] WIGGE PA, KIM MC, JAEGER KE, BUSCH W, SCHMID M, LOHMANN JU, WEIGEL D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 2005; **309**: 1056–1059.
- [66] WU G, SPALDING EP. Separate functions for nuclear and cytoplasmic cry 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 18813–18818.
- [67] XU X, HOTTA CT, DODDAN, LOVE J, SHARROCK R, LEE YW, XIE Q, JOHNSON CH, WEBB AAR. Distinct light and clock modulation of cytosolic free Ca^{2+} oscillations and rhythmic *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN2* promoter activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3474–3490.
- [68] YAKIR E, HILMAN D, HARIR Y, GREEN RM. Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS J* 2007; **274**: 335–334.
- [69] YAKIR E, HILMAN D, HASSIDIM M, GREEN RM. *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* transcript stability and the entrainment of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007; **145**: 925–932.
- [70] ZHENG B, DENG Y, MU J J, JI Z, XIANG T, NIU QW, CHUA NH, ZUO J. Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and *Arabidopsis* response regulator 4-dependent manner. *Physiol Plant* 2006; **127**: 277–292.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 26.05. 2010 r.

Przyjęto: 14.07. 2010 r.

Damian Gruszka, Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski

40-032 Katowice, ul. Jagiellońska 28

E-mail: damian.gruszka@us.edu.pl

