

ОГЛЯДИ

УДК 577.112.7:616

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЦИРКАДІАЛЬНОГО ГОДИННИКА

Л. Л. КАРБОВСЬКИЙ¹, Д. О. МІНЧЕНКО^{1,2}, Я. А. ГАРМАШ¹, О. Г. МІНЧЕНКО¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ominchenko@yahoo.com;

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

Більшість фізіологічних процесів у всіх живих організмів є ритмічними з періодом близько однієї доби і генеруються ендогенним біологічним годинником, який має кожна клітина організму, але центральний годинник («пейсмейкер») у ссавців локалізований у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса. Молекулярними компонентами системи цього біологічного годинника є фактори груп *Period* (*PER1*, *PER2* та *PER3*), *BMAL* (*BMAL1* та *BMAL2*), *Cryptochromes* (*CRY1* та *CRY2*), а також ряд інших. Частина цих факторів містить E-бокс послідовності і їхня експресія безпосередньо регулюється комплексом транскрипційних факторів *CLOCK*–*BMAL1*. Ензими, що відповідають за пост-трансляційні модифікації продуктів циркадальних генів, також є невід'ємними компонентами системи циркадального годинника, оскільки саме вони задають темп його роботи та визначають тривалість добового ритму, від якого залежить функціональний стан всього організму. Найважливішими з них є кazeїнкінази-1 ϵ та -1 δ . Аналізуються дані про зв'язок між циркадальним годинником, клітинним циклом та канцерогенезом, а також зміни експресії циркадальних генів за дії на організм токсичних речовин та наноматеріалів.

Ключові слова: циркадальний годинник, гени, *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *CRY1*, кazeїнкіназа-1 ϵ .

Усі живі організми мають досить надійну багаторівневу систему регуляції їхньої життєдіяльності та захисту від негативних впливів зовнішніх факторів, що забезпечує їхнє виживання та збереження генотипу, а також певну адаптацію до змін оточуючого середовища. В останні роки детально вивчаються молекулярні основи механізмів циклічного характеру протікання основних процесів життєдіяльності організмів та поведінки живих істот. У їхній більшості існує здатність до автономних коливань у поведінці та протіканні фізіологічних і біохімічних процесів із періодом близьким до 24 годин синхронно з обертанням Землі навколо своєї осі, які називають циркадальними ритмами і які генеруються ендогенним біологічним годинником, що є у кожній клітині організму і функціонує автономно [1, 2]. Цей біологічний годинник представляє собою групу взаємопов'язаних між собою ключових факторів регуляції транскрипції, що одержали назву циркадальних (*PER1*, *PER2*, *PER3*, *CLOCK*, *BMAL1*, *CRY1*, *CRY2* та ряд

інших) і контролюють експресію великої групи генів [3–6]. Система біологічного годинника кожної із клітин організму знаходиться під контролем центрального годинника («пейсмейкера»), який у ссавців локалізований у супрахіазматичних ядрах передньо-вентральної частини гіпоталамуса [7]. Під час руйнування супрахіазматичних ядер у тварин спостерігається втрата циркадальної ритміки регуляції циклу «сон–бадьорість», артеріального тиску та інших функцій організму. Було показано, що нейрони супрахіазматичних ядер у тканинній культурі можуть зберігати циркадальні осциляції своєї електрофізіологічної та нейроендокринної активності протягом кількох місяців, причому периферичні тканини та клітини, що культивовані *in vitro*, також здатні автономно підтримувати циркадальні ритми подібно до супрахіазматичних ядер [8, 9]. Проте циркадальний годинник здатний щодня синхронізуватися з зовнішніми часовими сигналами, найважливішим з яких є добовий світловий режим зовнішнього середовища.

Така організація годинника передбачає, що для координації функцій цілісного організму супрахіазматичні ядра мають узгоджувати роботу численних периферичних осциляторів.

Молекулярні механізми добової ритміки базуються на системі саморегуляторних транскрипційних та трансляційних зворотних зв'язків, які утворюють основу циркадіального годинника і мають як позитивні, так і негативні елементи. Комплекси з двох позитивних елементів, що є транскрипційними факторами, активують транскрипцію генів негативних елементів. До позитивних елементів відносяться White Collar-1 і 2 (WC-1 і WC-2) у *Neurospora crassa*, dCLOCK і Cycle у *Drosophila melanogaster* та CLOCK і BMAL1 у ссавців [10, 11]. Обидва позитивні елементи (CLOCK і BMAL1) функціонують як транскрипційні фактори, що містять PAS (PER-Arnt-Sim) та bHLH (basic Helix-Loop-Helix – спіраль–петля–спіраль) структурні домени. Ці транскрипційні фактори утворюють гетеродимер, який зв'язується з E-бокс енхансерним елементом (канонічна послідовність – CACGTG), і активують транскрипцію негативних елементів та генів, що контролюються циркадіальним годинником [5, 12, 13].

Негативними елементами слугують Frg (від англ. frequency – частота) у *Neurospora*, PER (від англ. period – період) і Tim (від англ. timeless – без відчуття ритму) у *Drosophila*, PER1, 2, 3 та CRY1, 2 (від англ. cryptochrome – криптохром) у ссавців [10, 14]. Негативні елементи також формують гетеродимерні комплекси, які після фосфорилування транспортуються в ядро, де пригнічують транскрипційну активність позитивних елементів та синтез відповідних протеїнових продуктів. За фосфорилування негативних елементів відповідають кальцій/кальмодулінзалежна кіназа (CaMK), казеїнкіназа I (CKI) та казеїнкіназа II (CKII) у *Neurospora*, Dbt (від англ. double-time – подвійний ритм; гомолог CKIε), Shaggy (лахматий) і CKII у *Drosophila*, CKIε, CKIδ та кіназа глікогенсинтази 3β (GSK3β; гомолог Shaggy) у ссавців [15–17].

Крім наведеного вище механізму функціонування біологічного годинника, існують додаткові зв'язки, які допомагають підтримувати осциляції в організмі. Так, у дрозофіли фактор CLOCK негативно регулює транскрипцію власного гена, а транскрипційний фактор Vriille є негативним регулятором генів *PER* і *TIM*, але у ссавців система додаткових зв'язків є значно складнішою [18]. Негативні елементи PER1 та

PER2 підсилюють транскрипцію BMAL1, а ядерні рецептори ретиноевої кислоти Rev-erba і Rora модулюють експресію BMAL1 [19]. Для транскрипційних факторів Dec1 та Dec2 було показано, що їхня експресія активується комплексом CLOCK–BMAL1, а протеїнові продукти Dec1 та Dec2, що містять bHLH домени, інгібують транскрипцію, що індукована гетеродимером CLOCK–BMAL1 [20]. Основні механізми функціонування молекулярного годинника, що контролює добові ритми метаболізму та поведінки організмів зображені на рис. 1.

Транскрипційний фактор CLOCK

Циркадіальний регулятор CLOCK в організмі людини кодується геном, який містить 23 екзони. Існує 11 транскрипційних варіантів гена *CLOCK*, з яких 3 кодують протеїнові продукти, що складаються з 846 амінокислотних залишків і відрізняються між собою лише одиничними амінокислотними замінами. CLOCK виступає транскрипційним фактором, який має 4 структурні домени: bHLH (а.к. 48–85), PAS 1 (а.к. 107–177), PAS 2 (а.к. 262–332) та PAC (PAS associated C-terminal, а.к. 336–379), а також C-кінцеву ділянку, збагачену глютаміновими залишками. Протеїн CLOCK модифікується тирозиновими та серин/треоніновими протеїнкіназами по залишкам Tyr³³¹, Ser⁴²⁷, Ser⁴³¹, Ser⁴³⁴, Ser⁴³⁷, Thr⁴⁶¹, а також ацетилюється по залишкам Lys³¹ та Lys⁴¹ [21, 22].

Виявлено, що транскрипційний фактор CLOCK проявляє ацетилтрансферазну активність щодо гістонів H3 та H4, яка є необхідною для ритмічної експресії головних компонентів циркадіального годинника, а також генів, контрольованих цим годинником, причому гістон-ацетилтрансферазна активність також суттєво посилюється за присутності BMAL1 [23]. Пізніше було показано, що CLOCK також ацетилює негістонові субстрати. Зокрема його функціональний партнер BMAL1 специфічно ацетилюється по висококонсервативному залишку Lys⁵³⁷. Таке ацетилювання BMAL1 полегшує взаємодію гетеродимеру CLOCK–BMAL1 з протеїном CRY1, що проявляється в транскрипційній репресії низки генів [24]. Протеїн PER2 – ще один субстрат CLOCK, у якого ацетилювання PER2 підвищує його стабільність та взаємодію із протеїнами групи криптохромів [25].

CLOCK, на відміну від всіх інших головних компонентів циркадіального годинника, не має виражених добових ритмів накопичення

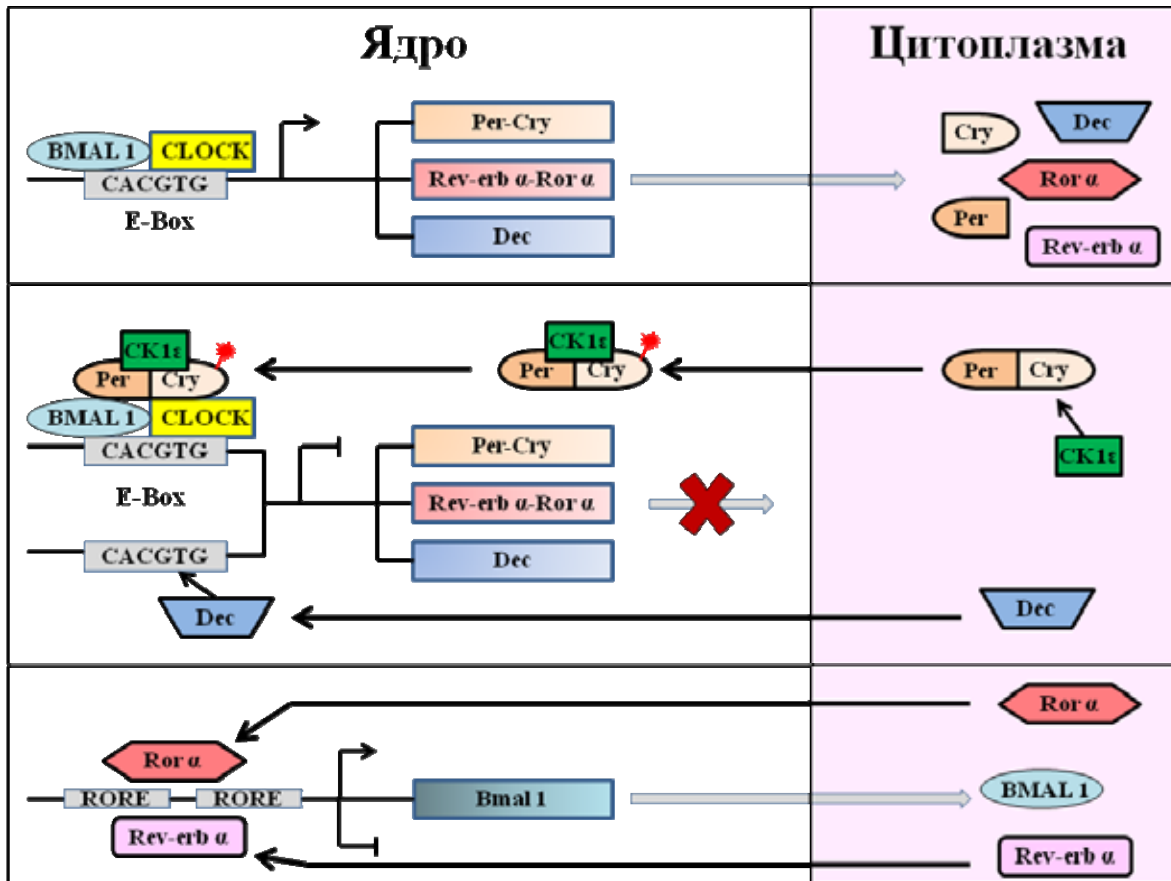


Рис. 1. Схема молекулярних механізмів функціонування циркадального годинника за участю факторів, що контролюють транскрипцію генів, а також взаємопов'язану активність та стабільність цих факторів за механізмами зворотних зв'язків

продуктів транскрипції чи трансляції [26]. Крім того, експресія гена *CLOCK* не регулюється жодним протеїном циркадального годинника, саме тому *CLOCK*, ймовірно, відіграє лише «пасивну» роль у генерації добових ритмів, проте він є невід'ємним елементом цього біологічного годинника. Важливо відзначити, що транскрипційний фактор *CLOCK*, а можливо і інші фактори регуляції добових ритмів, відіграє важливу роль у регуляції інших процесів, зокрема він значною мірою визначає резистентність пухлинних клітин до хіміотерапії [27].

У гені *CLOCK* була виявлена мутація (делеція 51 амінокислотного залишка з домену, що активує транскрипцію), яка призводить до надзвичайно довгого циркадального періоду, причому показано, що мутантний протеїн *CLOCK*, подібно до нормального, здатний формувати із *BMAL1* гетеродимери, що зв'язуються із ДНК, але не можуть ак-

тивувати транскрипцію [28]. У стані такого дефіциту в супрахізматичних ядрах гомозиготних по *CLOCK* нокаутних мишей суттєво вкорочуються періоди коливання рівнів мРНК *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1* та *CRY2*.

Протеїни групи *BMAL*

У хребетних тварин виявлено два гени *BMAL* (*BMAL1* та *BMAL2*), які відповідно кодують протеїнові продукти *BMAL1* та *BMAL2*. Обидва гени виникли шляхом дуплікації гена *CYC* (*BMAL*) безхребетних тварин, і утворили складнішу регуляторну систему. Ці протеїни є функціональними гомологами, які зв'язують *CLOCK*, проте вони по-різному взаємодіють з негативними елементами *PER* та *CRY*, а димери *CLOCK-BMAL1* та *CLOCK-BMAL2* мають деякі відмінності в регулюванні контрольованих ними генів.

Ген *BMAL1* людини транскрибується з утворенням 15 альтернативних сплайс-

варіантів, з яких 8 кодують протеїнові продукти, що задіяні в механізмі циркадіального годинника. Найдовший мРНК транскрипт (2788 пар нуклеотидних залишків) кодує поліпептид BMAL1a, який містить 583 амінокислотні залишки. BMAL1b має найдовший поліпептидний ланцюг, утворений 626 залишками амінокислот [28]. Саме цю форму прийнято вважати «стандартною», оскільки вона містить всі функціональні ділянки, необхідні для взаємодії з PAS-вмісними транскрипційними факторами. Так само як і CLOCK, протеїн BMAL1 має 4 структурні домени: bHLH, PAS 1, PAS 2 та PAC.

Для забезпечення пластичності та можливості швидкої регуляції циркадіального годинника, його компоненти весь час піддаються впливу ензимів посттрансляційних модифікацій. Зокрема, BMAL1 фосфорилується протеїнкіназами MAPK, SKIε, CK2α, GSK3β та ацетилюється протеїном CLOCK [29–34]. BMAL1 містить висококонсервативний залишок Lys²⁵⁹, по якому відбувається убіквітинування і сумоїлювання протеїну, що визначає субклітинну локалізацію, протеасомну деградацію та певні протеїн-протеїнові взаємодії. Таким модифікаціям, у першу чергу, піддається BMAL1 у комплексі із CLOCK, тоді як вільний протеїн не модифікується та є стабільним [35].

Альтернативний сплайс-варіант BMAL1a експресується виключно в мозку, серцево та скелетних м'язах, тоді як BMAL1b експресується у всіх органах. Різні сплайс-форми BMAL1 по різному фосфорилуються і відрізняються наявністю сайтів посттрансляційних модифікацій. Так, BMAL1 (ізоформа 8) має ті ж сайти фосфорилування, що й BMAL1b, проте модифікація по них не відбувається.

В організмі людини виявлено 8 сплайс-варіантів протеїну BMAL2. Основна ізоформа, BMAL2a, складається з 636 амінокислот та має молекулярну вагу 71 кДа. Усі відмінності між сплайс-варіантами стосуються N-кінця молекули (кодуються екзонами 1–5), а ДНК-зв'язувальний мотив, домени bHLH та PAS залишаються незмінними (кодуються екзонами 6–18). Варіабельна N-кінцева область та перші 12 амінокислот екзону 6 визначають клітинну локалізацію BMAL2 [36]. Зазначена ділянка містить дві послідовності, що утворені гідрофобними амінокислотами, які можуть слугувати сигналами ядерної локалізації.

Пригнічення активності комплексів CLOCK-BMAL1 та CLOCK-BMAL2 здійснюється гетеродимером PER-CRY. У цьому

разі існує певна вибірковість зв'язування та інгібування. Наприклад, комплекс CLOCK-BMAL1 ефективніше інгібується протеїном CRY2, а протеїн PER2 сильніше інгібує димер CLOCK-BMAL2 порівняно із CLOCK-BMAL1. Напевно, існує дві групи генів, залежних від циркадіального годинника, транскрипція яких регулюється переважно CLOCK-BMAL1 або CLOCK-BMAL2 [37].

Експресія *BMAL1* та *BMAL2* регулюється ядерними рецепторами ретиноєвої кислоти. Зокрема, *Rora* підсилює, а *Rev-erba* пригнічує експресію зазначених генів. Ці транскрипційні фактори конкурують між собою за зв'язування з послідовностями RORE (від англ. retinoic acid-related orphan receptor response elements – елементи, що реагують на орфанові рецептори ретиноєвої кислоти), які знаходяться в промоторі генів *BMAL* [38, 39]. Експресія *BMAL2* в значній мірі контролюється протеїном BMAL1. Виключення гена *BMAL1* призводить до відсутності як протеїну BMAL1, так і BMAL2, а надекспресія протеїну BMAL2 повністю компенсує відсутність BMAL1 [40, 41].

Протеїни групи Period

У геномі людини існують 3 гени, що кодують регуляторні протеїни групи Period. До них відносяться *PER1*, *PER2* та *PER3* [42, 43]. Усі PER протеїни мають структурну подібність та містять PAS домени. У клітині вони проявляють стійкі циркадіальні осциляції рівня мРНК і протеїну, пік яких досягається через декілька годин від початку світлового дня. Саме PER-протеїни є сенсорами, які сприймають сигнали від зовнішніх чинників та передають їх у систему транскрипційних та трансляційних зв'язків циркадіального годинника. Такими сигналами можуть бути зміни клітинного гомеостазу та світловий режим навколишнього середовища. Протеїни PER не є транскрипційними факторами, але вони здатні впливати на транскрипцію багатьох генів. Їхня дія опосередковується факторами транскрипції, з якими вони зв'язуються. Інгібування транскрипційної активності обумовлене впливом комплексу PER-CRY на гетеродимер CLOCK-BMAL [44]. Встановлено, що деякі представники родини Period, зокрема PER2, активують експресію гена *BMAL1*, молекулярний механізм такого впливу може бути опосередкований взаємодією з ядерними рецепторами [45].

Відомо, що ген *PER1* людини містить 23 екзони та має довжину близько 16 тис. пар

нуклеотидних залишків. Регуляторна частина гена *PER1* містить три Е-бокс-енхансерні ділянки необхідні для активації транскрипції. Також у дистальній частині промотору знаходиться послідовність CRE (cAMP response element) через яку здійснюється регуляція транскрипційним фактором CREB (cAMP response element-binding). Під час транскрипції утворюються три альтернативні сплайс-варіанти *PER1*. Основна форма *PER1* (Rigui 4.7) утворена 1290 амінокислотними залишками та містить 3 структурні домени: PAS 1, PAS 2, PAS, ділянки зв'язування СКІє та протеїнів *CRY*, а також сигнали ядерної локалізації та ядерного експорту. Дві інші сплайс-форми, Rigui 3.0 (містить 859 амінокислотних залишків) та Rigui 6.6 (містить 294 амінокислотних залишків), не мають ділянки зв'язування *CRY*, тому вони не здатні до утворення регуляторних димерів *PER-CRY*. Ізоформа Rigui 6.6 являє собою вкорочений варіант Rigui 4.7, оскільки в них співпадають перші 294 амінокислоти. Ця форма містить лише домен PAS 1. На сьогодні ще не відомо, які функції можуть виконувати додаткові сплайс-варіанти *PER1*, але зважаючи на їхню структуру можна припустити, що вони не задіяні в активації експресії генів через Е-бокс регуляторні ділянки. Фосфорилування *PER1* відбувається переважно в ділянках, що відповідають за зв'язування СКІє (Ser⁷⁰⁴ і Ser⁸¹⁵) та *CRY* (Ser¹²⁶² і Ser¹²⁶³) [46–48].

У *PER1* нокаутних мишей зберігається стійкий ритм, який має дещо вкорочений період [49, 50]. У цей час у периферичних органах втрачається ритмічність експресії генів, а в супрахізматичних ядрах зберігаються нормальні осциляції рівнів мРНК *PER2*, *CRY1* та *BMAL1*. Такі результати свідчать про важливу участь *PER1* у генерації ритмів у периферичних осциляторах, проте в центральному пейсмейкері він виявляє менше значення.

Ген *PER2* має довжину 46 тис. п.н. та містить 23 екзони. Під час транскрипції утворюється шість альтернативних сплайс-варіантів, два із яких кодують протеїнові продукти. Основний сплайс-варіант має 1255 амінокислотних залишків та молекулярну масу 136,5 кДа. Вкорочена форма *PER2* має 404 амінокислотних залишки та містить лише PAS 1 та частину PAS 2 домену. Для гена *PER2* характерна така сама ритмічність експресії, як і для *PER1*, проте максимум накопичення протеїнового продукту затримується приблизно на 4 год, порівняно з *PER1*. На відміну від гена *PER1*, експресія *PER2* у супрахізматичних ядрах сильно індукується світловою стимуляцією в першій

половині ночі, але не пізніше [51]. Окрім світла, експресія гена *PER2* може регулюватися також деякими несвітловими сигналами: агоністами серотонінового рецептору 5-НТ1А/7, нейропептидом Y, глюкокортикоїдами, греліном [52–55].

Промоторна ділянка гена *PER2* має сім Е-бокс-елементів, два із яких є необхідними для активації циркадіальної експресії. Іншими важливими регуляторними елементами виявилися D-бокс послідовності (DBP/E4BP4-binding element). Промотор гена *PER2* миші містить два D-бокси: А-сайт (-151) та В-сайт (+197). Встановлено, що E4BP4 репресує ген, діючи переважно через В-сайт [56, 57], а активація експресії гена *PER2* опосередкована рядом сигнальних шляхів, що призводять до зв'язування фосфорильованого CREB з послідовністю CRE в положенні -1831 регуляторної зони гена *PER2* відносно початку транскрипції. Проте, подальші дослідження показали, що CRE (елемент гена *PER2*) є менш чутливим до різних сигнальних впливів, порівняно з таким самим елементом у промоторі гена *PER1* [58].

За будовою протеїн *PER2* дуже подібний до *PER1*, він містить PAS 1, PAS та PAS структурно-функціональні домени. С-кінцева ділянка *PER2* довжиною біля 100 амінокислотних залишків є відповідальною за взаємодію із протеїнами *CRY* та транскрипційним фактором E4BP4, що має мотив лейцинової застібки [59, 60].

У молекулі *PER2* ідентифіковано більше 20 можливих сайтів фосфорилування, один з яких останнім часом привертає найбільше уваги [61]. Встановлено, що пацієнти із вкороченим періодом протікання циркадіального ритму (так званий синдром FASPS) мають мутацію в гені *PER2*, що призводить до заміни амінокислотного залишку Ser на Gly у положенні 662, низького рівня фосфорилування *PER2* та до втрати можливості зв'язування із СКІє і СКІδ. Більше того, дослідження *in vitro* показали, що заміна Ser у положенні 662 на Asp призводить до конститутивного зв'язування СКІδ та надлишкового фосфорилування прилеглих залишків Ser у молекулі *PER2*, підвищення стабільності та накопичення в клітині фосфорильованого протеїну *PER2*, внаслідок чого тривалість циркадіального періоду суттєво збільшується [62]. Відомо, що рівень фактора *PER2* регулюється протеїном β-TrCP (β-transducin repeat-containing protein), який являє собою адапторний протеїн убіквітину, що взаємодіє з фосфорильованим протеїном *PER2*, а поліубіквітування

PER2 слугує сигналом до його протеасомної деградації [63].

Циркадіальний фактор PER2 має ще одну важливу функцію в роботі молекулярного годинника – стабілізацію протеїнів криптохромів. Показано, що формування PER2-CRY захищає протеїни від убіквітин-залежного протеолізу [64]. Крім того, виявлено значне зниження рівня протеїну PER2 двічі нокаутних мишей по криптохромах (*CRY1^{-/-}* та *CRY2^{-/-}*) у порівнянні з нормальними тваринами, але у цьому разі кількість мРНК залишається на досить високому рівні [65]. Було також встановлено, що циркадіальний фактор PER2 може активувати транскрипцію гена *BMAL1* [18].

Менш досліджений ген *PER3*, третій з групи *Period*. Під час його транскрипції утворюються шість альтернативних сплайс-варіантів мРНК, з яких три кодують протеїнові фактори, що задіяні у функціонуванні циркадіального годинника. Основна ізоформа PER3 є PER3_002, що має 1201 амінокислотний залишок. Додаткові сплайс-варіанти PER3_001 та PER3_003 складаються з 1210 та 378 амінокислотних залишків відповідно. PER3_002 містить три структурні домени: PAS 1, PAS 2, PAC, ділянки зв'язування SKIε та протеїнів CRY, а також сигнали ядерної локалізації та ядерного експорту. PER3_001 містить такі ж самі структурні та функціональні послідовності, що й PER3_002 та має ще 9 додаткових амінокислотних залишків, які суттєво не впливають на функціонування даного сплайс-варіанта протеїну PER3. Ізоформа PER3_003 є вкороченим варіантом основної форми, в якій всі амінокислотні залишки співпадають із першими 378 залишками PER3_002. Тому дана форма містить лише структурні домени: PAS 1, PAS 2 та PAC, а ділянки взаємодії з SKIε і CRY у ній відсутні.

Протеїн PER3 не є невід'ємним компонентом циркадіального годинника, оскільки виключення гена *PER3* у мишей суттєво не впливає на добовий ритм. Такі тварини ніколи не втрачають циркадіальний ритм, хоча в постійній темряві період вільнопротікаючого ритму вкорочується, але лише на 0,5 години [49, 66]. Крім того, саме *PER1/PER2* нокаутні миші, але не *PER1/PER3* чи *PER2/PER3* стають абсолютними аритміками.

Надзвичайно важливу роль протеїн PER3 також відіграє у функціонуванні процесів клітинної відповіді на пошкодження в молекулі ДНК. Він взаємодіє із протеїнкіназами ATM та

Chk2, які запускають систему репарації ДНК та зупинку клітинного циклу. Більш того, було встановлено, що надекспресія PER3 стимулює ATM-опосередковану активацію Chk2 навіть за відсутності пошкоджень ДНК [67]. Ці дослідження доводять, що PER3 є критичним регулятором точок переходу клітинного циклу та відіграє важливу роль у процесах клітинної проліферації та апоптозу.

Протеїни групи криптохромів

Савці мають два гени: *CRY1* та *CRY2*. Родина протеїнів криптохромів включає в себе рослинний фоторецепторний протеїн синього світла і фотолізи, у зв'язку з цим криптохроми називають фотоліази-подібними (photolyase-like) [68]. Усі вони характеризуються наявністю ДНК-фотоліазного домену та FAD-зв'язувальної послідовності [69]. Проте ні *CRY1*, ні *CRY2* не мають здатності відновлювати пошкодження в молекулі ДНК чи відповідати на світлове подразнення.

Циркадіальний фактор CRY1 містить 586 амінокислотних залишків і може фосфорилюватися деякими протеїнкіназами. Зокрема, протеїнкіназа MAPK фосфорилує Ser CRY1 у положенні 247, а тирозинові кінази модифікують цей фактор у положенні 432 [70].

Ген *CRY2* експресується з утворенням восьми альтернативних сплайс-варіантів, але в організмі людини протеїн CRY2 представлений переважно трьома сплайс ізоформами. Основна ізоформа має 593 амінокислотних залишків і містить ДНК-фотоліазний структурний домен, FAD-зв'язувальну ділянку та ділянку зв'язування з CLOCK-BMAL1 димером. CRY2 також фосфорилується за допомогою протеїнкінази MAPK.

Циркадіальні фактори CRY1 та CRY2 проявляють стійкі циркадіальні осциляції рівня мРНК і протеїну, пік яких припадає на середину світлового періоду доби. Вони здатні інгібувати транскрипцію власних генів, впливаючи на транскрипцію через CLOCK-BMAL1 гетеродимер [44] і є негативними елементами в системі зворотних зв'язків циркадіального годинника.

Двічі нокаутні миші по генам *CRY1^{-/-}* та *CRY2^{-/-}* втрачають циркадіальну ритмічність за умов постійної темряви [43, 71], але рівень мРНК *PER1* та *PER2* у цих мутантних мишей залишається досить високим [72]. Ці результати свідчать, що CRY1 і CRY2 є невід'ємними компонентами циркадіального годинника. Миші, нокаутовані лише по одному гену: *CRY1^{-/-}* чи *CRY2^{-/-}*, виявляють циркадіальні ритми з

різними періодами (*CRY1*^{-/-} миші мають період 22,5 год, *CRY2*^{-/-} – 24,5 год), тому *CRY1* і *CRY2* ймовірно виконують різні ролі, але, можливо, компенсують один одного. Відомо, що *CRY1* та *CRY2* пригнічують транскрипційну активність *CLOCK-BMAL1* гетеродимеру, проте молекулярний механізм інгібування залишається нез'ясованим. Можливість того, що *CRY* інгібує *CLOCK-BMAL1* шляхом контролю окисно-відновного стану власною FAD групою, не підтвердилась, оскільки мутації у FAD-зв'язуючому домені *CRY* не впливають на його інгібіторну функцію [73].

Додаткові компоненти

Важливими регуляторними елементами молекулярного годинника, які утворюють додаткові петлі в системі зворотних зв'язків, є ядерні сирітські рецептори ретиноевої кислоти *Rev-erba* і *Rora*, транскрипційні фактори *Dec1*, *Dec2*, *Tim* та *E4bp4* [74].

Rev-erba і *Rora* активують транскрипцію *CLOCK* та *BMAL1* та індукують одну з головних петель у механізмі циркадіальних осциляцій [19, 38, 75]. Фактори *Rev-erba* і *Rora* конкурують між собою за зв'язування з послідовностями *RORE*. Було показано, що представники *Ror* (α , β і γ) та *Rev-erb* (α і β) мають здатність регулювати транскрипцію *BMAL1* через *RORE* ділянки [39], причому фактори *Ror* активують транскрипцію *BMAL1* [38, 39], тоді як *Rev-erb* репресують транскрипційні процеси [19]. Відповідно, добові осциляції *BMAL1* позитивно і негативно регулюються ядерними рецепторами ретиноевої кислоти.

Встановлено, що протеїни *Dec1* та *Dec2* є базальними транскрипційними факторами, які пригнічують *CLOCK-BMAL1* індуковану транскрипцію гена *PER1* миші [40]. Їхній вплив може здійснюватися як шляхом безпосередньої взаємодії із протеїном *BMAL1*, так і за рахунок конкуренції за E-бокс послідовності [11]. Експресуються *Dec1* та *Dec2* у супрахіазматичних ядрах із циркадіальною ритмічністю. Пік накопичення їхньої мРНК у клітині припадає на середину суб'єктивного дня. Короткочасний світловий імпульс індукує експресію *Dec1*, але не *Dec2* у супрахіазматичних ядрах. Обидва протеїни *Dec1* та *Dec2* ідентифіковані як сильні негативні регулятори центральної петлі молекулярного годинника [20]. Аналіз делецій *Dec1* показав, що N – кінцевий регіон, в якому міститься bHLH домен, необхідний як для зв'язування з E-боксом, так і для взаємодії із *BMAL1*, тому, що у разі його відсутності *Dec1* не проявляв інгібуючих властивостей [76].

Оскільки експресія *Dec* протеїнів регулюється *CLOCK-BMAL1* гетеродимером, то вони можуть бути важливими компонентами додаткової петлі зворотних зв'язків циркадіального осцилятора, яка тісно переплітається з центральною петлею [20].

Ще одним важливим циркадіальним геном є *E4BP4*, що кодує транскрипційний фактор bZIP. Рівень експресії *e4bp4* у клітинах шишковидного тіла залежить від тривалості світлової експозиції [77]. *E4BP4*, під час формування димерів, зв'язується з *E4BP4*-зв'язуючими ділянками промотору *PER2* і репресує його транскрипцію. Синтез *PER2* розпочинається лише через 4 год після початку освітлення. За цей час відбувається фосфорилування *E4BP4* за допомогою SKIε і його деградація [78]. Крім того, промотор гена *E4BP4* містить ще *RORE* – елемент, що робить його транскрипцію чутливою до наявності *Ror* та *Rev-erb* протеїнів [79].

Протеїн *TIM* у ссавців був ідентифікований завдяки подібності амінокислотної послідовності до *Tim* протеїну дрозофіли [80]. Наявні в літературі дані є досить суперечливими відносно ритмічності експресії гена *TIM*, а також взаємодії протеїну *TIM* з іншими протеїнами молекулярного годинника та його ролі у регуляції циркадіальної експресії генів [81, 82]. Існують певні труднощі у вивченні функціонального значення протеїну *TIM in vivo*, оскільки нокаутні по гену *TIM* миші гинуть протягом ембріонального періоду [83]. Така рання і важлива роль протеїну *Tim* свідчить про те, що він задіяний в більш критичних для життя процесах ніж механізм молекулярного годинника. Циркадіальний годинник функціонує на пізнішому етапі індивідуального розвитку і не є життєво важливим [84].

Механізм регуляції циркадіального годинника

Встановлено, що автономний циркадіальний годинник здатний генерувати та підтримувати 24-х годинний період протягом тривалого часу навіть в умовах постійної темряви. Проте незначні щоденні відхилення поступово призводять до суттєвої синхронізації біохімічних та фізіологічних процесів із факторами зовнішнього світу. У зв'язку з цим, головною властивістю циркадіального годинника є його здатність узгоджуватися з часовими чинниками навколишнього середовища. Зовнішній світловий сигнал сприймається гангліонарними клітинами сітківки і

передається моносинаптичним ретино-гіпоталамічним трактом до супрахіазматичних ядер [85]. Медіаторами, задіяними у передачі світлового сигналу, слугують глутамат, аспартат та PACAP (гіпофізарний поліпептид, що активує аденілатциклазу) [86, 87]. Основним нейромедіатором є глутамат, оскільки він виділяється з ретино-гіпоталамічним трактом під дією електричних стимулів. Крім того, блокування рецепторів глутамату нівелює вплив світлової стимуляції на сітківку ока [88].

Світловий сигнал сприймається гангліонарними клітинами, аксони яких формують ретино-гіпоталамічний тракт та мають синаптичні пухирці на своїх кінцях. Квант світла викликає локальну деполяризацію плазматичної мембрани гангліонарної клітини та зумовлює виникнення потенціалу дії, який розповсюджується по аксону доки не досягає синапсу, утвореного спільно з нервовими клітинами супрахіазматичних ядер. Потенціал дії обумовлює відкриття потенціал-чутливих каналів і надходження кальцію всередину клітини. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації йонів кальцію сприяє злиттю синаптичних везикул із пресинаптичною мембраною та вивільненню нейромедіатора глутамату. Глутамат, який потрапляє в синаптичну щілину, взаємодіє з рецепторами, розміщеними на постсинаптичній мембрані, що викликає відповідні зміни у клітинах супрахіазматичних ядер.

Існує два типи рецепторів, лігандом яких є глутамат. До першого типу відносяться іонотропні рецептори-канали: AMPA та NMDA. AMPA-рецептори (агоніст – аміногідрокси-метил-ізоксазол-пропіонова кислота) відкриваються після зв'язування молекули глутамату. Через відкриті рецепторні канали у клітину спрямовується потік позитивно заряджених іонів натрію, що спричинює часткову деполяризацію постсинаптичної мембрани. Рецептори NMDA – потенціал-чутливі неселективні кальцієві канали, які одержали цю назву від специфічного агоніста (N-метил-D-аспартат). За структурою NMDA-рецептор являє собою гетеротетрамер, утворений двома субодинацями: NR1 та NR2. У неактивному стані канал рецептора закритий іоном магнію, який видаляється тільки після деполяризації постсинаптичної мембрани, що забезпечується AMPA-рецепторами. Одночасно із NMDA-рецептором має зв'язатися молекула глутамату. Такі події зумовлюють конформаційні зміни та відкриття неселективного катіонного каналу, що зумовлює надходження у клітину

іонів натрію та кальцію, а також виходу калію із клітини. Кальцій, який надходить у цитоплазму, слугує вторинним месенджером, що запускає ряд сигнальних реакцій. Зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію сприймаються кальційзв'язувальним протеїном – кальмодуліном, який є інтегральною субодинацею кальцій/кальмодулінзалежної протеїнкінази II (CaMKII). CaMKII фосфорилує протеїнкіназу, що активує мітоген (MAPK) і здійснює фосфорилування транскрипційного фактору CREB (cAMP response element-binding protein), внаслідок чого він активується та регулює експресію контрольованих ним генів [89].

Підвищення цитоплазматичної концентрації кальцію в нейронах супрахіазматичних ядер зумовлює активацію аденілатциклази, яка здійснює утворення іншого вторинного месенджеру – циклічного аденозинмонофосфату (сАМР) (зазвичай аденілатциклаза активується стимуляторною субодинацею G-протеїну (G_{as}), проте в мозку існує ізоформа аденілатциклази, що модулюється кальцієм). сАМР алостерично активує сАМР-залежну протеїнкіназу (РКА). РКА складається із двох регуляторних та двох каталітичних субодинаць. Кожна регуляторна субодинаця зв'язує по дві молекули сАМР. Активована РКА безпосередньо здійснює фосфорилування транскрипційного фактора CREB, який зв'язується із CRE послідовністю у промоторній частині генів *PER1* та *PER2*.

Ще одним ферментом, що регулюється за допомогою CaMKII, виявилась нейрональна форма NO-синтази (nNOS). nNOS забезпечує утворення активної форми оксиду азоту (NO) з амінокислоти L-аргініну, яка здійснює регуляцію розчинної ізоформи гуанілатциклази шляхом зв'язування з гемовою групою гуанілатциклази та активації утворення циклічного гуанозинмонофосфату (сGMP) [90]. Дія сGMP опосередковується сGMP-залежною протеїнкіназою, яку називають протеїнкіназою G, або PKG [91, 92]. PKG може фосфорилувати як регуляторний протеїн CREB, так і РКА, яка потім активує CREB. Оксид азоту також діє як міжклітинний месенджер у супрахіазматичних ядрах *in vivo*, що сприяє інтеграції між різними ділянками супрахіазматичних ядер [93].

До другого типу рецепторів глутамінової кислоти відносяться метаботропні рецептори, які належать до класу рецепторів, спряжених із G-протеїном (GPCR – G protein-coupled receptors). Приєднання глутамату до GPCR сприяє відділенню ГТФ-зв'язувальної

субодиниці G-протеїну ($G_{\alpha q/11}$), яка активує мембранозв'язану фосфоліпазу C (PLC). PLC специфічно гідролізує мембранний ліпід – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат, з утворенням двох ефективних вторинних месенджерів: діацилгліцеролу (ДАГ) та інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3). Водорозчинний IP_3 дифундує від цитоплазматичної мембрани до ендоплазматичного ретикулума, де зв'язується зі специфічними IP_3 -рецепторами і відкриває кальцієві канали в ендоплазматичному ретикулумі. Внаслідок цього цитозольна концентрація іонів кальцію зростає. Це суттєво підсилює дію NMDA-рецепторів, оскільки у внутрішньоклітинних депо міститься значно більше кальцію ніж у позаклітинному просторі. Одним з ефектів такого зростання концентрації кальцію є активування протеїнкінази C (PKC) [94]. Одночасно PKC активує і ДАГ, який також діє як вторинний посередник. PKC фосфорилує залишки Ser та Thr у молекулі CREB.

Отже, описаний вище механізм забезпечує синхронізацію центрального пейсмейкера циркадального годинника з умовами навколишнього середовища. Проте супрахіазматичні ядра весь час повинні узгоджувати роботу периферичних осциляторів. Супрахіазматичні ядра регулюють ритміку периферичних осциляторів за допомогою ряду гормонів та нейромедіаторів: серотоніну, мелатоніну, нейропептиду Y, глюкокортикоїдів. Найбільш важливе значення в цьому процесі відіграє гормон мелатонін, який синтезується в шишковидному тілі епіфіза та секретується в кров і спинномозкову рідину. Контрольовані клітини мають рецептори мелатоніна та його функціонального антагоніста – серотоніна. Мелатонінові рецептори представлені як мембранними, так і ядерними формами. У ссавців виявлено два типи мембранних рецепторів: MTNR1A та MTNR1B. MTNR1A експресується на поверхні клітин передньої долі гіпофіза, гіпоталамуса, а також більшості периферичних органів. MTNR1B експонований на клітинах інших частин мозку, сітківки та легень. Рецептори мелатоніна відносяться до класу серпентинових рецепторів, дія яких опосередковується інгібуючими G-протеїнами. Активація рецептора призводить до дисоціації регуляторної субодиниці $G_{\alpha i}$, яка пригнічує дію аденілатциклази [95]. Тому в клітині знижується рівень cAMP, внаслідок чого інактивується PKA і не здійснюється фосфорилування CREB. Сигнал від мелатоніну може також сприйматися ядерними сирітськими ре-

цепторами, серед яких – Ror, який активує експресію циркадального фактора BMAL1. Серотонін, що є функціональним антагоністом мелатоніну стимулює фосфорилування CREB та експресію генів *PER*. Метаботропні серотонінові рецептори діляться на декілька підтипів. Одні активують, а інші інгібують аденілатциклазу. Деякі рецептори діють через PLC і впливають на вміст ДАГ та IP_3 .

Посттрансляційні модифікації протеїнів циркадального годинника

Циркадальний годинник є динамічною системою, яка постійно змінюється, адаптується до умов навколишнього середовища та задає ритм біохімічним та фізіологічним процесам організму. Лабільність системи вимагає постійного і чіткого контролю за складовими компонентами циркадального годинника. Важливу роль у процесі регуляції циркадальних протеїнів відіграють протеїнкінази, які специфічно фосфорилують протеїни-мішені. Фосфорилування протеїнів визначає їхню функціональну активність, а також може слугувати сигналом до подальшої протеасомної деградації.

Фосфорилування протеїнів групи *PER* протеїнкіназами SKIε та SKIδ відіграє головну роль у визначенні швидкості годинника, тобто тривалості фази добового ритму. SKIε регулює субклітинну локалізацію протеїнів *PER*, впливає на здатність інгібувати транскрипцію та сприяє їхньому розчепленню протеасомним шляхом, залежним від β-трансдукцінвмісних протеїнів β-TrCP1 і β-TrCP2 [63, 96]. Дослідження на культурі людських фібробластів показали, що пригнічення активності β-TrCP1, додавання інгібітора SKI (IC261) та протеасомних інгібіторів (лактацистин і MG132) призводить до суттєвого подовження циркадального періоду [63, 97]. F-бокс вмісний протеїн FBXL3 (F-box/LRR-repeat protein 3) відіграє ключову роль в регуляції стабільності CRY1. Мутації, що інактивують цей ген, також викликають подовження циркадального періоду [98, 99]. Саме тому тривалість репресійного впливу гетерокомплексу *PER-CRY* регулюється в першу чергу за рахунок стабільності та деградації цих протеїнів [100].

Мутація в гені *SKIε* золотого сирійського хом'ячка проявляється у вигляді вкороченого циркадального періоду. Біохімічно ця мутація (*SKIε^{tau}*, заміна Thr на Cys у положенні 178) по-різному впливає на активність кінази. Вона зменшує загальну кіназну активність, але

підвищує активність певних амінокислотних залишків PER2 протеїну [101, 102]. Наслідком такого посиленого фосфорилування є зниження стабільності PER2 [103]. У людей мутація в СКІε-фосфорилуючому сайті PER2 призводить до зменшення періоду в циклі «сон-бадьорість» (синдром FASPS) [104]. У культурі клітин СКІε зв'язує та фосфорилує всі три протеїни PER, що призводить до їхньої транслокації в ядро. СКІε може також здійснювати ядерний експорт PER1 [105].

На сьогодні більшість молекулярних досліджень направлені на визначення функціональної ролі саме СКІε, тоді як даних щодо СКІδ існує небагато. Відомо, що СКІδ фосфорилує ті ж субстрати, що й СКІε, проте сайти їхнього фосфорилування суттєво відрізняються, хоча й частково перекриваються. Функціональна нестача СКІε повністю компенсується ензимом СКІδ, тому у разі мутацій в гені *СКІε* не спостерігаються зміни у тривалості добового ритму [103]. У той же час, мутації в гені, що кодує СКІδ, призводять до значних порушень динаміки накопичення циркадальних протеїнів [62].

Встановлено, що мішенями СКІε та СКІδ є, головним чином, протеїни PER. Транскрипційні фактори CRY1, CRY2 та BMAL1 також фосфорилуються даними кіназами. BMAL1, подібно до PER1 чи PER2, безпосередньо модифікується СКІε, тоді як для фосфорилування CRY1, CRY2 та PER3 необхідною є наявність в комплексі протеїнів PER1 чи PER2 [32].

МАРК також бере участь у функціонуванні циркадального годинника. Активація МАР-кінази у супрахіазматичних ядрах індукується світловим імпульсом під час суб'єктивної ночі. МАР-кіназа може здійснювати фосфорилування BMAL1 внаслідок світлової стимуляції сітківки, і таким чином корегувати роботу годинника [106, 30]. SCOP (SCN circadian oscillatory protein), який є ще одним протеїном, пов'язаним з біологічним годинником, проявляє циркадальну експресію в супрахіазматичних ядрах і залучається до механізму циркадального годинника шляхом інгібування активності МАР-кінази [107].

Дефосфорилування попередньо фосфорильованих протеїнів здійснюється за рахунок фосфатаз. Доведено, що серин/треонінова фосфатаза PP1 (протеїн фосфатаза 1) відіграє ключову роль у стабілізації PER2 шляхом його дефосфорилування [108]. Мутантна форма PP1^{D95N} (має заміну Asp на Asn у положенні 95) взаємодіє із протеїном PER2, проте мутація призводить до зменшення рівня PER2. Фос-

фатаза PP1^{D95N} вкорочує період напівжиття PER2 до 3 годин, тоді як у контролі (наявність нормальної PP1) він складає 6 годин. Отже, баланс активностей між кіназами та фосфатазами визначає стабільність регуляторних елементів циркадального годинника.

Фосфорилування зумовлює направлену протеїнову деградацію, яка складається із двох етапів: ковалентного приєднання ланцюжка низькомолекулярного протеїну убіквітину та подальшого гідролізу міченого протеїну в протеасомі. Посттрансляційне приєднання убіквітину здійснюється за допомогою убіквітин-лігаз шляхом утворення ковалентного зв'язку з боковими аміногрупами протеїну-мішені. Встановлено декілька убіквітин-лігаз, що контролюють ряд ключових елементів годинника. Зокрема, β-TrCP1 і β-TrCP2 відповідають за убіквітинування протеїнів PER1 та PER2 [96, 97], FBXL3 регулює стабільність CRY протеїнів [98], дві E3 лігази, ARF-BP1 (ADP ribosylation factor binding protein 1) та Muc-BP2 (muc-binding protein 2), задіяні в модифікації ядерного рецептора Rev-erbα [109], Hex3/Slx8 убіквітинують BMAL1 [110].

Ще одним механізмом посттрансляційної модифікації є приєднання протеїнів SUMO (small ubiquitin-like modifier). Сумоїлювання задіяне в різних клітинних процесах, таких як ядерний транспорт, регуляція транскрипції, апоптоз, відповідь на стрес і протікання клітинного циклу. Протеїни SUMO функціональноподібні до убіквітину, а сумоїлювання слугує початком ензимного каскаду, аналогічного процесу, що починається з убіквітинування. Протеїном, що модифікується подібним чином, виявився циркадальний фактор BMAL1. Початкове приєднання SUMO слугує сигналом ядерного накопичення та підвищеної транскрипційної активності гетеродимеру CLOCK-BMAL1 [35]. Проте наявність протеїнів SUMO на поверхні BMAL1 зумовлює початок швидкого убіквітинзалежного протеолізу, що призводить до повної деградації протеїну BMAL1, локалізованого в ядрі.

Зв'язок між циркадальним годинником, клітинним циклом та канцерогенезом

Циркадальний годинник та клітинний цикл мають ряд принципів подібностей у функціонуванні власних молекулярних механізмів [111]. Зокрема, вони мають періодичність близько 24 год та є ендогенними для більшості клітин. Крім того,

обидва базуються на послідовних стадіях транскрипції, трансляції, модифікації та деградації протеїнів. Циркадіальний годинник контролює експресію генів клітинного циклу, тоді як сам може функціонувати незалежно від клітинного циклу [112].

Клітинний цикл еукариотичної клітини складається з чотирьох чітко визначених стадій: пресинтетичної (G1-фаза), синтетичної (S-фаза), постсинтетичної (G2-фаза), мітотичної (M-фаза). У S-фазі відбувається реплікація ДНК і утворюються копії для обох дочірніх клітин. У фазі G2 інтенсивно синтезуються нові протеїни і клітина суттєво збільшується в розмірі. У M-фазі руйнується материнська ядерна оболонка, подвоєні хромосоми розходяться до протилежних полюсів клітини, кожний набір дочірніх хромосом оточує новостворена ядерна оболонка, після чого внаслідок цитокінезу клітина ділиться навпіл і утворюються дві дочірні клітини. У G1-фазі відбувається інтенсивний синтез РНК та протеїнів. У тканинах, що активно проліферують, кожна з новоутворених клітин після проходження G1-фази ділиться знову. У культурі клітин тривалість клітинного циклу становить близько 24 год. Після проходження фази мітозу та вступу у фазу G1, клітина або продовжує новий цикл поділу, або ж припиняє його і переходить у фазу спокою (G0), яка може тривати години, дні або весь період існування клітини. В еукариотичних клітинах перебіг клітинного циклу жорстко регулюється. Основними регуляторами клітинного циклу є циклінозалежні кінази (CDK – cyclin-dependent kinases) та їхні регуляторні субодиниці – цикліни. Комплекси CDK-циклінів впливають на клітинний цикл в, так званих, точках переходу (checkpoints) циклу. Проходження через точку переходу можливе лише за умов нормального завершення попередніх етапів та відсутності помилок. Розрізняють щонайменше чотири такі точки: точка в G1, точка в S, точка в G2 та точка «перевірки веретена поділу» в мітозі, але найбільш критичними є переходи між фазами G1-S та G2-M [113, 114]. Перебіг клітинного циклу досягається шляхом послідовної активації та інактивації різних комплексів CDK-циклінів. Дія комплексів CDK-циклінів полягає в фосфорилуванні низки протеїнів-мішеней у відповідності з фазою клітинного циклу, в якій активним може бути той чи інший комплекс. Наприклад CDK2-циклін E активний в пізній G1 фазі та фосфорилує протеїни, що необхідні для здійснення G1-S переходу. CDK2-циклін A

проявляє активність в S і G2 фазах і забезпечує проходження S фази та вступ клітини в мітоз. Порушення регуляторних механізмів клітинного циклу, як правило, спричинює злоякісне перетворення клітини.

Молекулярно-біологічні дослідження підтвердили, що ключові елементи клітинного циклу, такі як цикліни: D1, B1, E, A, а також p53, Wee1, c-myc, Mdm2 (murine double minute) та Gadd45a (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45a) мають циркадіальну ритміку експресії.

Гетеродимер CLOCK-BMAL, під час взаємодії з E-боксом енансерними послідовностями деяких генів клітинного циклу, безпосередньо активує їхню транскрипцію. До таких генів належать *wee1* [112] та *c-myc* [115]. Ядерні сирітські рецептори ретиноевої кислоти Rora та Rev-erba регулюють експресію p21 (CDK інгібітор 1A, CDKN1A, Cip1 або Waf1), промотор якого містить подвійну RORE послідовність. СК1ε фосфорилує цикліни B1 та A2.

Перехід між фазами G2 та M. Головну роль у точці переходу G2-M та початку мітотичної фази відіграє циклінозалежна кіназа CDK1, а також ензими, що регулюють її активність. До таких ензимів відносяться кіназа, що активує CDK1 (CAK – CDK-activating kinase), Wee1 кіназа, яка інгібує CDK1 та фосфатаза Cdc25. У клітині наприкінці G2 фази відбувається поступове накопичення комплексу CDK2-циклін B1 та його інактивація шляхом фосфорилування Thr¹⁵ кіназою Wee1, для активації комплекс CDK1-циклін B1 повинен бути фосфорильований CAK у положенні Thr¹⁶¹ та дефосфорильований в положенні Thr¹⁵ фосфатазою Cdc25 [116]. Момент активації комплексу CDK2-циклін B1, а відтак і початок мітозу, в значній мірі залежить від балансу між протинаправленою дією Wee1 та Cdc25.

Промоторна частина гена антимиотичної тирозинової кінази Wee1 містить три регуляторні E-боксы послідовності, з якими взаємодіє комплекс CLOCK-BMAL1, що стимулює експресію цього гена. У нокаутних по гену *CRY* мишей значно підвищується рівень Wee1-кінази, тому після часткової гепатектомії (видалення частини печінки) у таких тварин суттєво знижується здатність до регенеративного відновлення печінки [112]. Підвищення рівня Wee1 у *cry* нокаутованих мишей пов'язане з відсутністю інгібування протеїном CRY експресії, активованої CLOCK-BMAL1 [117]. Наявність пошкоджень у молекулі ДНК активує Wee1-кіназу, яка

фосфорилує комплекс CDK1-циклін B1, що призводить до його інактивації та затримки мітозу або припинення клітинного циклу в точці G2-M переходу [118, 119]. З іншої сторони, у CLOCK дефіцитних мишей, рівень мРНК – протеїнкінази Wee1 знижується до ледве помітного рівня, тому навіть за наявності значних пошкоджень у молекулі ДНК клітина все одно вступає у стадію мітозу та проходить поділ, що в подальшому неодмінно завершується утворенням пухлин.

Перехід між фазами G1 та S. У PER2 мутантних мишей (PER2^{m/m}) підвищується експресія протеїну c-Мус, який приймає участь у процесах клітинної проліферації та апоптозу. Водночас пригнічується експресія протеїну p53, який відіграє критичну роль на стадії G1-S переходу. Також спостерігаються загальні порушення клітинного циклу, оскільки виникає збій в регуляції генів клітинного поділу та пухлинної супресії: циклін D1, циклін A, Mdm-2, Gadd45a. Внаслідок чого такі тварини стають більш уразливими до спонтанних та індукованих пухлин і мають підвищений рівень смертності від іонізуючого опромінення [120]. Зв'язування димеру CLOCK-BMAL1 з E-бокс послідовностями промоторної частини призводить до інактивації гена *c-MYC*. Зростання рівня мРНК *c-MYC* у PER2 мутантів пов'язане зі зниженням рівня протеїну BMAL1, оскільки PER2 крім інгібування гетеродимеру CLOCK-BMAL1 також стимулює транскрипцію гена *BMAL1* [65, 121]. Клітини з гіперекспресією *c-MYC* після радіаційного опромінення мають значно нижчу здатність до припинення клітинного циклу на стадії G1 порівняно з нормальними опроміненними клітинами [122, 123]. Таким чином, гіперекспресія *c-MYC* підтримує клітинний цикл навіть за наявності великої кількості пошкоджень в молекулі ДНК, що призводить до виникнення пухлинних новоутворень. Це узгоджується з даними Taniguchi et al. [124], які показали, що епігенетична інактивація циркадального гена *BMAL1* причетна до малігнізації. Крім того, було показано, що BMAL1 може утворювати комплекси не лише із CLOCK, а й з HIF-1 α [125].

Циклін D1 також знаходиться під регуляторним контролем циркадального годинника [120]. Експресія цикліну D1 суттєво посилюється у PER2 мутантних мишей, що призводить до скорочення клітинного циклу та прискорення клітинної проліферації. В той час як надекспресія циркадального протеїну PER1 у клітинах аденокарциноми передміхурової за-

лози призводить до вираженого пригнічення росту та апоптозу [126]. Таким чином, PER1 та PER2 опосередковано контролюють експресію цикліну D1 шляхом інгібування транскрипції *c-myc* і є ключовими регуляторами малігнізації клітин [127, 128]. Також на культурі клітин було показано, що гіперекспресія PER2 спричинює зупинку клітинного циклу [129]. Не менш важливу роль в утворенні пухлин та їхньої проліферації відіграє фактор PER3, зокрема в естрогензалежних пухлинах грудної залози [130], оскільки Per3 є протеїном, що контролює клітинний цикл в точках переходу, проліферацію клітин та апоптоз [67]. Одержано переконливі дані про значний вклад експресії фактора CRY1 у механізми контролю проліферації циркадальними факторами та прогресії В-клітинної хронічної лейкемії [131, 132]. Порушення експресії різних генів біологічного годинника виявляються у різних злоякісних пухлинах [133, 134], але більшість досліджень стосується генів групи Period [135–137].

Ще одним протеїном, що пов'язаний із клітинним циклом та регулюється циркадальним годинником виявився протеїн p21 (CDKN1A), який входить до групи Waf1/Cip1 інгібіторів циклінзалежних кіназ, що негативно регулюють перебіг клітинного циклу шляхом інгібування активності комплексу CDK2-циклін E протягом G1 фази. Він є також головною мішенню протеїну p53, що активується після пошкодження ДНК та відіграє важливу роль у процесі клітинної диференціації [138, 139]. Промоторна ділянка гена *CDKN1A* містить два консервативні RORE елементи. Ритмічна експресія цього гена є результатом альтернативної активації чи репресії, зумовлених відповідним зв'язуванням Ro α та Rev-erb α [140]. Циркадальна експресія *p21* у *BMAL1* нокаутуваних тварин суттєво зростає. Таке зростання може бути результатом втрати експресії Rev-erb α і Rev-erb β та підвищення рівня Ro γ .

Клітинна відповідь на пошкодження ДНК. Під дією зовнішніх фізичних та хімічних чинників у молекулі ДНК можуть виникати пошкодження, які є несумісними з нормальним функціонуванням клітини. Тому на всі такі пошкодження клітина повинна реагувати своєчасно та адекватно. Існує два шляхи клітинної відповіді. Перший з них полягає в активації системи репарації, яка призначена для усунення помилок та відновлення нативної структури ДНК. Другий шлях – зупинка клітинного циклу та запуск апоптозу. Система репарації здатна відновити одноланцюгові

точкові пошкодження, проте у разі виникнення великої кількості дволанцюгових розривів ДНК клітина вже не може повернутися до нормального стану. Головним завданням в такому випадку є зупинка подальшого поділу клітини.

Ключову роль в інтеграції сигналів від пошкодженої ДНК та їхньої подальшої передачі до різноманітних ефекторів відіграють специфічні протеїнкінази: ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3 related), NBS1, CHK1 та CHK2 (кінази точок переходу 1, 2). Більшість сенсорних протеїнів відносяться до родини Rad: Rad1, Rad9, Rad17. Вони володіють високою гомологічною подібністю із протеїнами реплікативного комплексу, зокрема, з фактором процесивності ДНК-полімерази δ (PCNA – proliferating cell nuclear antigen). Сенсорні протеїни збираються в комплекс у формі кільця, який оточує молекулу ДНК та рухається по ній.

Центральне положення в системі контролю пошкоджень ДНК займають кінази ATM та ATR. Обидва протеїни схожі між собою за будовою та функціями і відносяться до класу IP_3K -подібних протеїнів. Ці ензими активуються в місцях пошкоджень і фосфорилують протеїни хроматину (наприклад, гістон H2A) або протеїни-сенсори порушень структури ДНК. Водночас ATM активується у відповідь на виникнення дволанцюгових розривів ДНК, викликаних γ -опроміненням чи інгібіторами топоізомераз, тоді як інші порушення структури ДНК (зокрема, поперечні зшивання основ, що зумовлені УФ-опроміненням) спричинюють функціональну активацію протеїну ATR. Мішенями для ATM та ATR слугують p53, NBS1, CHK1, CHK2 та інші. ATM фосфорилує CHK2, а ATR – CHK1. Активовані CHK1 та CHK2, в свою чергу, фосфорилують та інактивують CDK фосфатази CDC25A і CDC25C, що викликає пригнічення активності регульованих ними циклінзалежних кіназ та швидко зупинку клітинного циклу на стадії G1 (якщо CDC25A не активує CDK2) або G2 (коли CDC25C не активує CDK1).

Важливу роль у функціонуванні процесів клітинної відповіді на пошкодження ДНК приймають компоненти циркадіального годинника. PER1 безпосередньо взаємодіє з кіназами ATM та CHK2. Фосфорилування CHK2, що здійснюється протеїнкіназою ATM, в значній мірі послаблюється в клітинах з направленим інгібуванням експресії гена *PER1* [141].

Показано, що циркадіальний протеїн Tim взаємодіє з кіназами точок переходу клітинного циклу: ATR, CHK1 та ATRIP (ATR-interacting protein) [142]. Пригнічення експресії гена *tim*

призводить до зниження фосфорилування CHK1 кіназою ATR, що супроводжується аномальним перебігом клітинного циклу. Такі взаємодії додатково стимулюються пошкодженнями ДНК, а протеїни PER1 та Tim виявляються посередниками між сенсорними та ефекторними протеїнами [143].

Протеїн PER2 також задіяний у процесах пригнічення пухлинного росту. PER2-мутантні миші мають підвищену схильність до утворення радіаційноіндукованих пухлин, у зв'язку з частковим послабленням p53-опосередкованого апоптозу [120].

Таким чином, наведені дані свідчать, що циркадіальний годинник активно задіяний у процесах клітинної проліферації та канцерогенезу, а протеїни PER1, PER2, CLOCK, BMAL1 та CRY функціонують у клітині як пухлинні супресори.

Зміни в експресії циркадіальних генів за дії метил-третбутилового ефіру та наночастинок срібла

Враховуючи широке використання метил-третбутилового ефіру та його токсичну і канцерогенну дію на організм [144], а у зв'язку з цим і екологічну небезпеку, були проведені дослідження його впливу на експресію циркадіальних генів, які контролюють процеси утворення злоякісних пухлин та їхньої проліферації (як було показано вище). Було встановлено, що під впливом тривалої дії різних доз метил-третбутилового ефіру (від 0,5 до 500 мг на кг маси тіла щурів протягом 1–2 місяців) значно порушується експресія генів *Per2*, *Clock*, казеїнкінази-1 ϵ та протеїнкінази SNARK у печінці, легенях та міокарді піддослідних тварин (рис. 2 та 3) і що це може спричинювати розлади у функціонуванні сигнальних каскадів, що контролюються циркадіальними факторами, та розвиток патологічних станів, у тому числі злоякісних новоутворень [145–147]. Виражена дія метил-третбутилового ефіру на важливі ключові механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії циркадіальних генів може бути чутливим показником шкідливої дії на організм цієї екологічно небезпечної сполуки та можливо і інших хімічних забруднювачів довкілля.

У зв'язку з високою чутливістю експресії циркадіальних генів до дії на організм метил-третбутилового ефіру були проведені аналогічні дослідження і з наночастинками срібла, які знаходять широке застосування, в тому числі і в медицині, але є також ток-

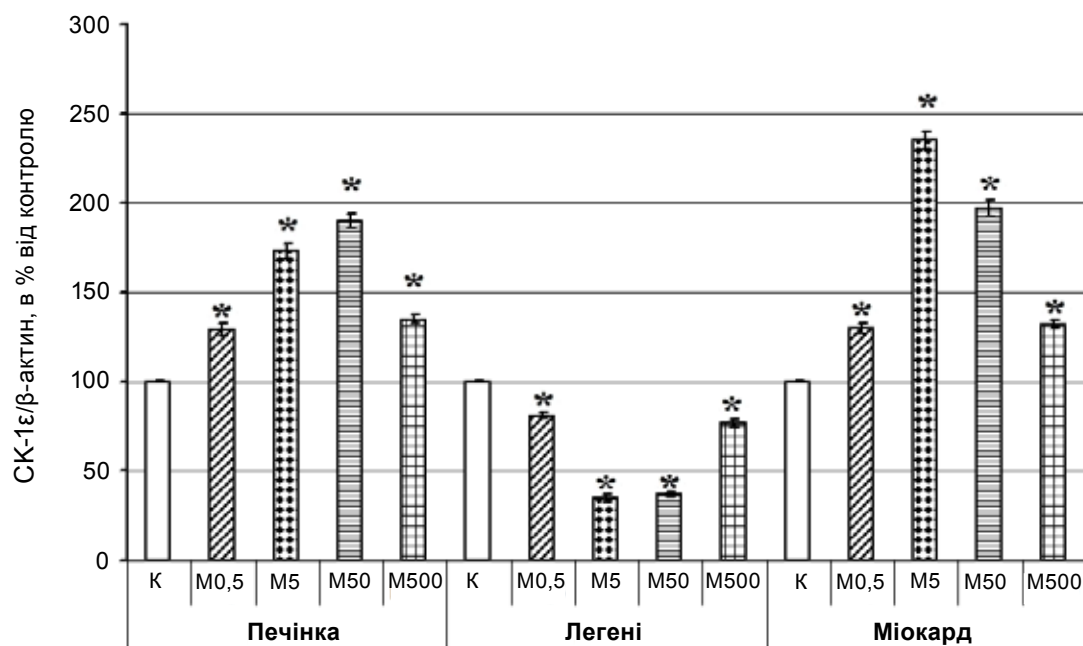


Рис. 2. Вплив метил-третбутилового ефіру [0,5 (M0,5); 5 (M5); 50 (M50) та 500 (M500) мг/кг маси тіла один раз на день, п'ять разів на тиждень протягом двох місяців] на експресію мРНК казеїнкінази-1ε (СК-1ε) у печінці, легенях та міокарді щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. К – контрольні тварини. Експресію мРНК казеїнкінази-1ε нормалізували по β-актину і виражали в процентах від контролю, прийнятого за 100% [146]

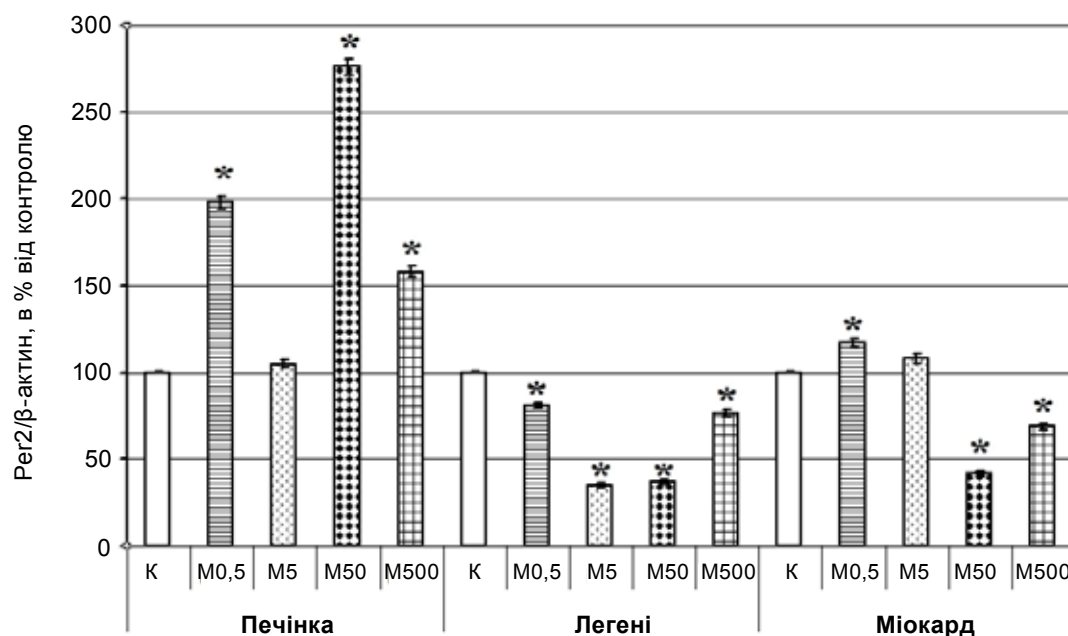


Рис. 3. Вплив метил-третбутилового ефіру на експресію мРНК Per2 у печінці, легенях та міокарді щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. К – контрольні тварини. Експресію мРНК Per2 нормалізували по β-актину і виражали в процентах від контролю [147]

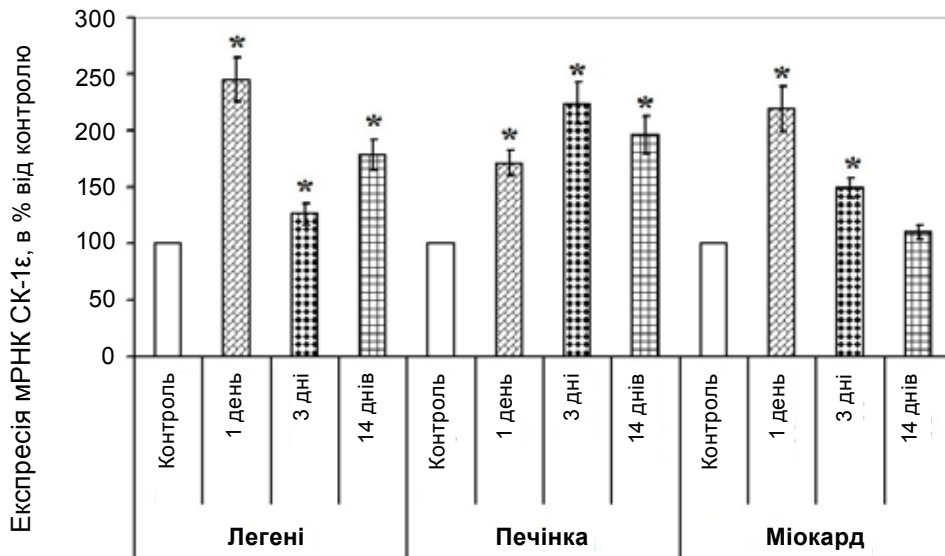


Рис. 4. Вплив наночастинок срібла протягом 1, 3 та 14 днів на експресію мРНК казеїнкінази (СК-1ε) у легенях, печінці та головному мозку щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК СК-1ε нормалізували по β-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100%. $n = 4$; * $P < 0,05$ [158]

сичними. Відомо, що наночастинок срібла більш токсичні, порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що можливо пов'язано з їхньою здатністю безперешкодно проникати крізь біологічні бар'єри організму [148–152]. Наночастинок срібла, що проникають в організм різними шляхами, в тому числі і крізь легені, накопичуються у життєво важливих органах, у тому числі і в головному мозку, хоча механізми подолання наночастинок срібла повітряно-кров'яного бар'єру в легенях до цього часу ще нез'ясовані [153, 154]. Встановлено, що наночастинок срібла індують експресію гена протеїну теплового шоку, апоптоз та оксидативний стрес, крім того вони можуть діяти як нейротоксини розвитку, порушувати розвиток ембріонів і збільшувати частоту загибелі ембріонів [155, 156]. Встановлено, що під впливом наночастинок срібла також суттєво змінюється експресія циркадальних генів *PER1*, *PER2*, *CLOCK* та *BMAL1*, казеїнкінази-1ε та протеїнкінази SNARK у таких життєво важливих органах як легені, головний мозок, серце, сім'яники, печінка та нирки вже через 1 та 3 дні (після одноразового інтратрахеального введення щурам) і зберігаються зміненими 14 днів у більшості органів [157–159]. Саме порушення експресії циркадальних генів може спричинювати розлади у функціонуванні важливих регуляторних механізмів, що контролюються циркадальними факторами та ініціювати

розвиток різноманітних патологічних станів, у тому числі таких метаболічних захворювань як серцево-судинні захворювання, ожиріння та цукровий діабет [160, 161].

Роль циркадального годинника в регуляції метаболізму

Біологічний годинник «диригує» організацією багатьох аспектів метаболізму та поведінки організмів, що пов'язані з 24-годинним циклом обертання Землі. Циркадальна система, як і система метаболізму, представляє собою складну сітку взаємопов'язаних процесів, що включає також взаємодію центральної нервової системи та периферичних органів. Циркадальна регуляція тісно пов'язана з метаболічним гомеостазом і порушення циркадального ритму вносить свій внесок у розвиток захворювань, зокрема серцево-судинних, ожиріння та цукрового діабету [160, 161]. З іншого боку, метаболічні сигнали також впливають на функцію біологічного годинника, що змінює експресію циркадальних генів та поведінку організмів.

Під контролем біологічного годинника знаходиться і метаболізм глюкози від її транспорту до гліколізу, глюконеогенезу, а також процеси ліполізу, адіпогенезу та мітохондріального окисного фосфорилування, що регулюється складною сіткою взаємопов'язаних транскрипційних процесів, які є чутливими до часових сигналів. Протя-

гом доби змінюється активність різних органів та систем і саме тому локальні годинники мають постійно синхронізуватися з центральним кожного дня, а різке порушення ритмічності різних процесів в організмі може змінювати нормальну роботу циркадіального годинника і зумовлювати появу різних захворювань, таких як порушення сну, діабет та ожиріння [162].

Можна сподіватися, що краще розуміння взаємопов'язаності системи циркадіальних генів з балансом поживних речовин, що надходять до організму, на молекулярному, клітинному та системному рівнях дозволить пролити світло на асоціацію між цукровим діабетом, ожирінням, порушеннями сну і змінами циркадіального ритму [163].

Роль локального біологічного годинника в контролюванні життєво важливих процесів є надзвичайно важливою для збереження здоров'я, а порушення циркадіального ритму із-за сучасного робочого розкладу стає важливим фактором у розвитку більшості системних захворювань [164]. Більше того, відкриття молекулярних компонентів системи біологічного годинника відкриває нові шляхи для розробки нових терапевтичних підходів до лікування захворювань.

Таким чином, модель циркадіального годинника передбачає, що його центральна ланка генерується двома позитивними транскрипційними факторами: CLOCK і BMAL1. Після транскрипції і трансляції CLOCK та BMAL1 формують гетеродимер, який транслокується в ядро, де зв'язуючись з E-боксом енансерними послідовностями *PER* і *CRY* промоторів, регулює їхню транскрипцію. Протеїни *PER* і *CRY* формують комплекс із SKI і переміщуються в ядро та інгібують транскрипційну активність комплексу CLOCK-BMAL, який відповідає за активацію транскрипції генів *REV-ERB* і *ROR*, а їхні продукти взаємодіють з RORE ділянками і регулюють експресію гена *BMAL1*.

Існує дві додаткові негативні петлі, які тісно переплітаються з основною. Перша з них генерується транскрипцією генів *DEC* та *DEC2*. Петля позитивно контролюється CLOCK-BMAL гетеродимером, а негативно — власними продуктами. Протеїн DEC1 взаємодіє з E-боксом, внаслідок чого супресується транскрипція генів *PER* та *CRY*. Другу додаткову петлю формує ген *E4BP4*, фосфорильовані продукти якого утворюючи димери та інгібують експресію генів *PER* і *CRY*. Тоді як сам *E4BP4* регулюється протеїнами

REV-ERB та *ROR*. Гени, які знаходяться під контролем циркадіального годинника, містять E-бокск послідовності та безпосередньо регулюються комплексом транскрипційних факторів CLOCK-BMAL. Невід'ємними компонентами циркадіального годинника є також ензими посттрансляційних модифікацій, оскільки саме вони задають темп його роботи та визначають тривалість добового ритму, від якого залежить функціональний стан всього організму.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИРКАДИАЛЬНЫХ ЧАСОВ

Л. Л. Карбовский¹, Д. А. Минченко^{1,2},
Я. А. Гармаш¹, А. Г. Минченко¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: ominchenko@yahoo.com;

²Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

Большинство физиологических процессов всех живых организмов являются ритмичными с периодом около 24 часов и генерируются эндогенными биологическими часами, которые находятся во всех клетках организма. Однако, есть также центральные часы (пейсмейкер), локализованные в супрахиазматических ядрах гипоталамуса у млекопитающих. Молекулярными компонентами этих биологических часов являются факторы групп Period (*PER1*, *PER2* и *PER3*), *BMAL* (*BMAL1* и *BMAL2*), *Cryptochromes* (*CRY1* и *CRY2*), а также ряд других. Часть этих генов содержит E-бокск последовательности и их экспрессия непосредственно регулируется комплексом транскрипционных факторов CLOCK-BMAL1. Энзимы, ответственные за посттрансляционные модификации продуктов циркадиальных генов, также являются неотъемлемыми компонентами системы циркадиальных часов, поскольку именно они задают темп их работы и определяют продолжительность суточного ритма, от которого зависит функциональное состояние всего организма. Наиболее важными из них являются казеинкиназы-1ε и -1δ. В обзоре анализируются данные о взаимосвязи между циркадиальными часами, клеточным циклом и канцерогенезом, а также об изменении экспрессии циркадиальных генов при действии на организм токсических веществ и наноматериалов.

Ключевые слова: циркадиальные часы, гены, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, CRY1, казеинкиназа-1ε.

MOLECULAR MECHANISMS OF CIRCADIAN CLOCK FUNCTIONING

L. L. Karbovskiy¹, D. O. Minchenko^{1,2},
Y. A. Harmash¹, O. H. Minchenko¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ominchenko@yahoo.com;

²Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Summary

Most physiological processes of all organisms are rhythmic with a period of about 24 h and are generated by an endogenous biological CLOCK present in all cells. However, there is also a central CLOCK – the primary circadian pacemaker which is localized in the suprachiasmatic nuclei of the mammalian hypothalamus. Factors of groups Period (PER1, PER2 and PER3), BMAL (BMAL1 and BMAL2), CRYptochromes (CRY1 and CRY2) as well as some other factors are the components of this circadian CLOCK system. Some of these genes contain E-box sequences and their expression is regulated by a transcription factor complex CLOCK-BMAL1. The enzymes responsible for the post-translational modification of circadian gene products are also the components of circadian CLOCK system. These enzymes define CLOCK's work and determine the duration of circadian biorhythm and functional state of the whole organism. The most important of these enzymes are casein kinase-1ε and -1δ. We have analysed data about the interconnection between the circadian CLOCK system, cell cycle, and cancerogenesis as well as about the sensitivity of circadian gene expression to the action of toxic agents and nanomaterials.

Key words: circadian CLOCK, genes, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, CRY1, casein kinase-1ε.

- Gonze D., Goldbeter A. // *Chaos*. – 2006. – **16**, N 2. – P. 1–11.
- Hastings M. H., Maywood E. S., Reddy A. B. // *J. Neuroendocrinol.* – 2008. – **20**, N 6. – P. 812–819.
- Kovac J., Husse J., Oster H. // *Mol. Cell*. – 2009. – **28**, N 2. – P. 75–80.
- Chen R., Schirmer A., Lee Y. et al. // *Ibid.* – 2009. – **36**, N 3. – P. 417–430.
- Sasaki M., Yoshitane H., Du N. H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 37. – P. 25149–25159.
- Pfeffer M., Muller C. M., Mordel J. et al. // *J. Neurosci.* – 2009. – **29**, N 19. – P. 6114–6123.
- Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C., Menaker M. // *Science*. – 1990. – **247**, N 4945. – P. 975–978.
- Yamazaki S., Numano R., Abe M. et al. // *Ibid.* – 2000. – **288**, N 5466. – P. 682–685.
- Yagita K., Tamanini F., van der Horst G., Okamura H. // *Ibid.* – 2001. – **292**, N 5515. – P. 278–281.
- Loros J. J., Dunlap J. C. // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – **63**. – P. 757–794.
- Panda S., Hogenesch J. B., Kay S. A. // *Nature*. – 2002. – **417**, N 6886. – P. 329–335.
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H. B. et al. // *Science*. – 1998. – **280**, N 5369. – P. 1564–1569.
- Rudic R. D., McNamara P., Curtis A. M. et al. // *PLOS Biology*. – 2004. – **2**, N 11. – P. E377.
- Kume K., Zylka M. J., Sriram S. et al. // *Cell*. – 1999. – **98**, N 2. – P. 193–205.
- Yang Y., Cheng P., Liu Y. // *Genes. Dev.* – 2002. – **16**, N 8. – P. 994–1006.
- Martinek S., Inonog S., Manoukian A. S., Young M. W. // *Cell*. – 2001. – **105**, N 6. – P. 769–779.
- Eide E. J., Virshup D. M. // *Chronobiol. Int.* – 2001. – **18**, N 3. – P. 389–398.
- Yu W., Nomura M., Ikeda M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **290**, N 3. – P. 933–941.
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L. et al. // *Cell*. – 2002. – **110**, N 2. – P. 251–260.
- Honma S., Kawamoto T., Takagi Y. et al. // *Nature*. – 2002. – **419**, N 6909. – P. 841–844.
- Heibeck T. H., Ding S. J., Opresko L. K. et al. // *J. Proteome. Res.* – 2009. – **8**, N 8. – P. 3852–3861.
- Zhao S., Xu W., Jiang W. et al. // *Science*. – 2010. – **327**, N 5968. – P. 964–965.
- Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. // *Cell*. – 2006. – **125**, N 3. – P. 497–508.
- Hirayama J., Sahar S., Grimaldi B. et al. // *Nature*. – 2007. – **450**, N 7172. – P. 1086–1090.
- Asher G., Gatfield D., Stratmann M. et al. // *Cell*. – 2008. – **134**, N 2. – P. 317–328.
- Lee C., Etchegaray J. P., Cagampang F. R. et al. // *Ibid.* – 2001. – **107**, N 7. – P. 855–867.
- Igarashi T., Izumi H., Uchiumi T. et al. // *Oncogene*. – 2007. – **26**, N 33. – P. 4749–4760.

28. Ikeda M., Nomura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **233**, N 1. – P. 258–264.
29. Sahar S., Zocchi L., Kinoshita C. et al. // *PLoS ONE.* – 2010. – **5**, N 1. – P. 1–9.
30. Sanada K., Okano T., Fukada Y. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 1. – P. 267–271.
31. Tamaru T., Hirayama J., Isojima Y. et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – **16**, N 4. – P. 446–448.
32. Eide E. J., Vielhaber E. L., Hinz W. A., Virshup D. M. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 19. – P. 17248–17254.
33. Grimaldi B., Nakahata Y., Sahar S. et al. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 2007. – **72**. – P. 105–112.
34. Lee H., Chen R., Lee Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – **106**, N 50. – P. 21359–21364.
35. Lee J., Lee Y., Lee M. J. et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – **28**, N 19. – P. 6056–6065.
36. Ikeda M., Yu W., Hirai M. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **275**, N 2. – P. 493–502.
37. Sasaki M., Yoshitane H., Du N. H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 37. – P. 25149–25159.
38. Sato T. K., Panda S., Miraglia L. J. et al. // *Neuron.* – 2004. – **43**, N 4. – P. 527–537.
39. Guillaumond F., Dardente H., Giguere V., Cermakian N. // *J. Biol. Rhythms.* – 2005. – **20**, N 5. – P. 391–403.
40. Reppert S. M., Wever D. R. // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – **63**. – P. 647–676.
41. Shi S., Hida A., McGuinness O. P. et al. // *Curr. Biol.* – 2010. – **20**, N 4. – P. 316–321.
42. Albrecht U., Sun Z. S., Eichele G., Lee C. C. // *Cell.* – 1997. – **91**, N 7. – P. 1055–1064.
43. van der Horst G. T., Muijtjens M., Kobayashi K. et al. // *Nature.* – 1999. – **398**, N 6828. – P. 627–630.
44. Bunger M. K., Wilsbacher L. D., Moran S. M. et al. // *Cell.* – 2000. – **103**, N 7. – P. 1009–1017.
45. Schmutz I., Ripperger J. A., Baeriswyl-Aebischer S., Albrecht U. // *Genes. Dev.* – 2010. – **24**, N 4. – P. 345–357.
46. Dephore N., Zhou C., Villen J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – **105**, N 31. – P. 10762–10767.
47. Gauci S., Helbig A. O., Slijper M. et al. // *Anal. Chem.* – 2009. – **81**, N 11. – P. 4493–4501.
48. Mayya V., Lundgren D. H., Hwang S. I. et al. // *Sci. Signal.* – 2009. – **2**, N 84. – P. 546–552.
49. Bae K., Jin X., Maywood E. S. et al. // *Neuron.* – 2001. – **30**, N 2. – P. 525–536.
50. Cermakian N., Monaco L., Pando M. P. et al. // *EMBO J.* – 2001. – **20**, N 15. – P. 3967–3974.
51. Yan L., Silver R. // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – **16**, N 8. – P. 1531–1540.
52. Horikawa K., Yokota S., Fuji K. et al. // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**, N 15. – P. 5867–5876.
53. Fukuhara C., Brewer J. M., Dirden J. C. et al. // *J. Neurosci. Lett.* – 2001. – **314**, N 3. – P. 119–122.
54. Segall L. A., Perrin J. S., Walker C. D. et al. // *J. Neurosci.* – 2006. – **140**, N 3. – P. 753–761.
55. Yannielli P. C., Molyneux P. C., Harrington M. E., Golombek D. A. // *J. Neurosci.* – 2007. – **27**, N 11. – P. 2890–2895.
56. Ueda H. R., Hayashi S., Chen W. et al. // *Nat. Genet.* – 2005. – **37**, N 2. – P. 187–201.
57. Ohno T., Onishi Y., Ishida N. // *Nucl. Acids Res.* – 2007. – **35**, N 2. – P. 648–655.
58. Travnickova-Bendova Z., Cermakian N., Reppert S. M., Sassone-Corsi P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**, N 11. – P. 7728–7733.
59. Miyazaki K., Mesaki M., Ishida N. // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – **21**, N 19. – P. 6651–6659.
60. Ohno T., Onishi Y., Ishida N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **354**, N 4. – P. 1010–1015.
61. Vanselow K., Vanselow J. T., Westermarck P. O. et al. // *Genes. Dev.* – 2006. – **20**, N 19. – P. 2660–2672.
62. Xu Y., Toh K. L., Jones C. R. et al. // *Cell.* – 2007. – **128**, N 1. – P. 59–70.
63. Eide E. J., Woolf M. F., Kang H. et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – **25**, N 7. – P. 2795–2807.
64. Yagita K., Tamanini F., Yasuda M. et al. // *EMBO J.* – 2002. – **21**, N 6. – P. 1301–1314.
65. Shearman L. P., Sriam S., Weaver D. R. et al. // *Science.* – 2000. – **288**, N 5468. – P. 1013–1019.
66. Shearman L. P., Jin X., Lee C. et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – **20**, N 17. – P. 6269–6275.
67. Im J., Jung B., Kim S. et al. // *FEBS Lett.* – 2010. – **584**, N 23. – P. 4731–4734.
68. Kopp M. D., Schomerus C., Dehghani F. et al. // *J. Neurosci.* – 1999. – **19**, N 1. – P. 206–219.
69. Sancar A. // *Chem. Rev.* – 2003. – **103**, N 6. – P. 2203–2237.
70. Rikova K., Guo A., Zeng Q. et al. // *Cell.* – 2007. – **131**, N 6. – P. 1190–1203.
71. Vitaterna M. H., Selby C. P., Todo T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**, N 21. – P. 12114–12119.
72. Okamura H., Miyake S., Sumi Y. et al. // *Science.* – 1999. – **286**, N 5449. – P. 2531–2534.
73. Froy O., Chang D. C., Reppert S. M. // *Curr. Biol.* – 2002. – **12**, N 2. – P. 147–152.
74. Takahashi J. S. // *J. Biol. Rhythms.* – 2004. – **19**, N 5. – P. 339–347.

75. Triqueneaux G., Thenot S., Kakizawa T. et al. // *J. Mol. Endocrinol.* – 2004. – **33**, N 3. – P. 585–608.
76. Mitsui S., Yamaguchi S., Matsuo T. et al. // *Genes. Dev.* – 2001. – **15**, N 8. – P. 995–1006.
77. Grechez-Cassiau A., Panda S., Lacoche S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 2. – P. 1141–1150.
78. Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T., Nishida E. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – **22**, N 6. – P. 1693–1703.
79. Ueda H. R., Chen W., Adachi A. et al. // *Nature.* – 2002. – **418**, N 6897. – P. 534–539.
80. Takumi T., Nagamine Y., Miyake S. et al. // *Genes Cells.* – 1999. – **4**, N 1. – P. 67–75.
81. Field M. D., Maywood E. S., O'Brien J. A. et al. // *Neuron.* – 2000. – **25**, N 2. – P. 437–447.
82. Barnes J. W., Tischkau S. A., Barnes J. A. et al. // *Science.* – 2003. – **302**, N 5644. – P. 439–442.
83. Gotter A. L., Manganaro T., Weaver D. R. et al. // *Nat. Neurosci.* – 2000. – **3**, N 8. – P. 755–756.
84. Reppert S. M., Weaver D. R. // *Nature.* – 2002. – **418**, N 6901. – P. 935–941.
85. Morse D., Sassone-Corsi P. // *Trends. Neurosci.* – 2002. – **25**, N 12. – P. 632–637.
86. Fahrenkrug J. // *Chronobiol. Int.* – 2006. – **23**, N 1. – P. 53–61.
87. Golombek D. A., Ferreyra G. A., Agostino P. V. et al. // *Front. Biosci.* – 2003. – **8**. – P. 285–293.
88. Paul K. N., Fukuhara C., Karom M. et al. // *Brain. Res.* – 2005. – **139**, N 1. – P. 129–136.
89. Golombek D. A., Ralph M. R. // *Neurosci. Lett.* – 1995. – **192**, N 2. – P. 101–104.
90. Golombek D. A., Agostino P. V., Plano S. A. et al. // *Neurochem. Int.* – 2004. – **45**, N 6. – P. 929–936.
91. Langmesser S., Franken P., Feil S. et al. // *PLoS. One.* – 2009. – **4**, N 1. – P. 4238–4246.
92. Tischkau S. A., Mitchell J. W., Pace L. A. et al. // *Neuron.* – 2004. – **43**, N 4. – P. 539–549.
93. Plano S. A., Agostino P. V., Golombek D. A. // *FEBS Lett.* – 2007. – **581**, N 28. – P. 5500–5504.
94. Shim H. S., Kim H., Lee J. et al. // *EMBO Rep.* – 2007. – **8**, N 4. – P. 366–371.
95. Dubocovich M. L., Riviera-Bermudez M. A., Gerdin M. J. et al. // *Front. Biosci.* – 2003. – **8**. – P. 1093–1098.
96. Shirogane T., Jin J., Ang X. L., Harper J. W. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, N 29. – P. 26863–26872.
97. Reischl S., Vanselow K., Westermarck P. O. et al. // *J. Biol. Rhythms.* – 2007. – **22**, N 5. – P. 375–386.
98. Busino L., Bassermann F., Maiolica A. et al. // *Science.* – 2007. – **316**, N 5826. – P. 900–904.
99. Godinho S. I., Maywood E. S., Shaw L. // *Ibid.* – P. 897–900.
100. Gatfield D., Schibler U. // *Science.* – 2007. – **316**, N 5826. – P. 1135–1136.
101. Gallego M., Eide E. J., Woolf M. F. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, N 28. – P. 10618–10623.
102. Lowrey P. L., Shimomura K., Antoch M. P. et al. // *Science.* – 2000. – **288**, N 5465. – P. 483–492.
103. Meng Q. J., Logunova E. S., Maywood M. et al. // *Neuron.* – 2008. – **58**, N 1. – P. 78–88.
104. Toh K. L., Jones C. R., He Y. et al. // *Science.* – 2001. – **291**, N 5506. – P. 1040–1043.
105. Vielhaber E. L., Duricka D., Ullman K. S., Virshup D. M. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 49. – P. 45921–45927.
106. Coogan A. N., Piggins H. D. // *J. Neurochem.* – 2004. – **90**, N 4. – P. 769–775.
107. Shimizu K., Okada M., Nagai K., Fukada Y. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 17. – P. 14920–14925.
108. Gallego M., Kang H., Virshup D. M. // *Biochem. J.* – 2006. – **399**, N 1. – P. 169–175.
109. Yin L., Joshi S., Wu N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**, N 25. – P. 11614–11619.
110. Xie Y., Kerscher O., Kroetz M. B. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, N 47. – P. 34176–34184.
111. Hunt T., Sassone-Corsi P. // *Cell.* – 2007. – **129**, N 3. – P. 461–464.
112. Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S. et al. // *Science.* – 2003. – **302**, N 5643. – P. 255–259.
113. Sherr C. J. // *Ibid.* – 1996. – **274**, N 5293. – P. 1672–1677.
114. Murakami H., Okayama H. // *Exp. Mol. Med.* – 1997. – **29**. – P. 1–11.
115. Fu L., Pelicano H., Liu J. et al. // *Cell.* – 2002. – **111**, N 1. – P. 41–50.
116. Fesquet D. // *EMBO J.* – 1993. – **12**, N 8. – P. 3111–3121.
117. Oishi K., Miyazaki K., Kadota K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 42. – P. 41519–41527.
118. Nyberg K. A., Michelson R. J., Putnam C. W., Weinert T. A. // *Annu. Rev. Genet.* – 2002. – **36**. – P. 617–656.
119. Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K., Linn S. // *Ibid.* – 2004. – **73**. – P. 39–85.
120. Fu L., Patel M. S., Bradley A. // *Cell.* – 2005. – **122**, N 5. – P. 803–815.
121. Hogenesch J. B., Panda S., Kay S., Takahashi J. S. // *Novartis. Found. Symp.* – 2003. – **253**. – P. 171–180.
122. Sheen J. H., Dickson R. B. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – **22**, N 6. – P. 1819–1833.

123. *Vafa O., Wade M., Kern S. et al.* // *Ibid.* – 9, N 5. – P. 1031–1044.
124. *Taniguchi H., Fernandez A. F., Setien F. et al.* // *Cancer Res.* – 2009. – 69, N 21. – P. 8447–8454.
125. *Takahata S., Sogawa K., Kobayashi A. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – 248, N 3. – P. 789–794.
126. *Cao Q., Gery S., Dashti A. et al.* // *Cancer Res.* – 2009. – 69, N 19. – P. 7619–7625.
127. *Perez-Roger I., Kim S. H., Griffiths B.* // *EMBO J.* – 1999. – 18, N 19. – P. 5310–5320.
128. *Zhu Y., Stevens R. G., Hoffman A. E. et al.* // *Cancer Res.* – 2009. – 69, N 24. – P. 9315–9322.
129. *Hua H., Wang Y., Wan C. et al.* // *Cancer. Sci.* – 2006. – 97, N 7. – P. 589–596.
130. *Climent J., Perez-Losada J., Quigley D. A. et al.* // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – 28, N 23. – P. 3770–3778.
131. *Eisele L., Prinz R., Klein-Hitpass L. et al.* // *Eur. J. Haematol.* – 2009. – 83, N 4. – P. 320–327.
132. *Lewintre E. J., Martin C. R., Ballesteros C. G. et al.* // *Haematologica.* – 2009. – 94, N 2. – P. 280–284.
133. *Tsinkalovsky O., Smaaland R., Rosenlund B. et al.* // *J. Biol. Rhythms.* – 2007. – 22, N 2. – P. 140–150.
134. *You S., Wood P. A., Xiong Y. et al.* // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – 91, N 1. – P. 47–60.
135. *Chen S. T., Choo K. B., Hou M. F. et al.* // *Carcinogenesis.* – 2005. – 26, N 7. – P. 1241–1246.
136. *Winter S. L., Bosnoyan-Collins L., Pinnaduwage D., Andrulis I. L.* // *Neoplasia.* – 2007. – 9, N 10. – P. 797–800.
137. *Lee C. C.* // *Methods Enzymol.* – 2005. – 393. – P. 852–861.
138. *Dotto G. P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – 1471, N 1. – P. 43–56.
139. *Pei X. H., Xiong Y.* // *Oncogene.* – 2005. – 24, N 17. – P. 2787–2795.
140. *Grechez-Cassiau A., Rayet B., Guillaumond F. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2008. – 283, N 8. – P. 4535–4542.
141. *Gery S., Komatsu N., Baldjyan L. et al.* // *Mol. Cell.* – 2006. – 22, N 3. – P. 375–382.
142. *Kondratov R. V., Antoch M. P.* // *Trends. Cell. Biol.* – 2007. – 17, N 7. – P. 311–317.
143. *Unsal-Kacmaz K., Mullen T. E., Kaufmann W. K., Sancar A.* // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – 25, N 8. – P. 3109–3116.
144. *McGregor D.* // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2007. – 37, N 4. – P. 287–312.
145. *Мінченко Д. О., Яворовський О. П., Завгородній І. В. та ін.* // *Укр. журн. з проблем медицини праці.* – 2008. – № 3 (15). – С. 20–26.
146. *Мінченко О. Г., Мінченко Д. О., Яворовський О. П. та ін.* // *Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця.* – 2008. – № 2. – С. 21–27.
147. *Мінченко О. Г., Мінченко Д. О., Яворовський О. П. та ін.* // *Здоров'я та довкілля.* – 2010. – № 3 (54). – С. 16–21.
148. *Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J.* // *Nanomedicine.* – 2007. – 3, N 1. – P. 20–31.
149. *Benn T.M., Westerhoff P.* // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – 42, N 11. – P. 4133–4139.
150. *Lubick N.* // *Ibid.* – 2008. – 42, N 23. – P. 8617.
151. *Chen D., Xi T., Bai J.* // *Biomed. Mater.* – 2007. – 2, N 3. – P. S126–S128.
152. *Griffitt R. J., Hyndman K., Denslow N. D., Barber D. S.* // *Toxicol. Sci.* – 2009. – 107, N 2. – P. 404–415.
153. *Tang J., Xiong L., Wang S. et al.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2009. – 9, N 8. – P. 4924–4932.
154. *Shimada A., Kawamura N., Okajima M. et al.* // *Toxicol. Pathol.* – 2006. – 34, N 7. – P. 949–957.
155. *Ahamed M., Posgai R., Gorey T. J. et al.* // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – 242, N 3. – P. 263–269.
156. *Powers C. M., Wrench N., Ryde I. T. et al.* // *Environ. Health Perspect.* – 2010. – 118, N 1. – P. 73–79.
157. *Мінченко Д. О., Божко І. В., Зінченко Т. О. та ін.* // *Біотехнологія.* – 2010. – № 3. – С. 42–49.
158. *Minchenko D., Bozhko I., Zinchenko T. et al.* // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik.* – 2011. – 42, N 2. – P. 21–25.
159. *Мінченко Д. О., Божко І. В., Зінченко Т. О. та ін.* // *Біологічні студії / Studia Biologica.* – 2010. – 4, № 1. – С. 5–14.
160. *Green C. B., Takahashi J. S., Bass J.* // *Cell.* – 2008. – 134, N 5. – P. 728–742.
161. *Turek F. W., Dugovic C., Zee P. C.* // *Arch. Neurol.* – 2001. – 58, N 11. – P. 1781–1787.
162. *Kohsaka A., Bass J.* // *Trends. Endocrinol. Metab.* – 2007. – 18, N 1. – P. 4–11.
163. *Ramsey K. M., MarcheVA B., Kohsaka A., Bass J.* // *Annu. Rev. Nutr.* – 2007. – 27. – P. 219–240.
164. *Hastings M., O'Neill J. S., Maywood E. S.* // *J. Endocrinol.* – 2007. – 195, N 2. – P. 187–198.

Отримано 27.04.2011