

**В. П. Пішак, Р. Є. Булик**

*Буковинський державний медичний університет МОЗ України,  
58002 Чернівці*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФУНКЦІЇ ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЯК БІОЛОГІЧНОГО ГОДИННИКА**

У роботі наводяться результати генетичних досліджень структурних генів, які забезпечують функціонування шишкоподібної залози як біологічного годинника.

**Ключові слова:** шишкоподібна залоза, фотоперіодизм, часові гени.

У 1999 р. дослідження з вивчення молекулярних основ біологічного годинника були визнані Американською асоціацією розвитку науки (AAAS) другими за значимістю після праць фізиків щодо темпів розширення нашого Всесвіту [9].

Центральними органами (пейсмекерами), що забезпечують організм інформацією щодо змін тривалості світлового режиму (фотоперіоду) вважають супрахіазматичні ядра (СХЯ) передньовентральної частки гіпоталамуса і шишкоподібну залозу (ШЗ). Незаперечно, що СХЯ здійснюють переважно нервову регуляцію циркадіанної системи, а гуморальний контроль цієї системи відбувається за участі гормону ШЗ — мелатоніну (МТ). Цей орган у ссавців є основним джерелом МТ.

МТ властива чітка добова ритмічність, акрофаза припадає на 1<sup>00</sup>–3<sup>00</sup> год ночі незалежно від видових особливостей циркадіанного ритму "активність–спокій" [14].

Переважає думка, що ШЗ активно секретує гормони, зокрема МТ тільки вночі, а в світловий проміжок доби її активність неістотна. Такий погляд має право на існування тільки щодо МТ. ШЗ крім нього секретує в кров інші речовини, серед яких високу біологічну активність мають пептиди [6]. Повідомляється про здатність МТ впливати на рівень експресії генів та активність СОД і каталази в печінці, нирках і головному мозку ссавців [1].

Відкриття "часових" генів необхідно визнати самим видатним досягненням у хронобіології минулого десятиліття [2]. У хребетних цир-



кадіанний годинник на молекулярному рівні характеризується системою саморегуляційних, транскрипційних та трансляційних зворотних зв'язків. Гетеродимерний комплекс *dCLOCK-CYC* причетний до стимуляції експресії генів *per* і *tim*. Він зв'язується зі специфічною ділянкою ДНК і забезпечує дерепресію цих генів.

У ссавців шляхом дуплікації гена *Cyc* виникли два гени групи *Bmal* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) (*Bmal1* та *Bmal2*), які кодують протеїни *BMAL1* та *BMAL2*. Зазначені білки є гомологами функціональних продуктів, які зв'язують *CLOCK* з утворенням димерів *CLOCK-BMAL1* та *CLOCK-BMAL2* (останні контролюють певні гени). Цікаво, що експресія гена *Clock* не регулюється жодним із протеїнів циркадіанного годинника, саме тому білок *CLOCK* очевидно виконує пасивну роль у генерації добових ритмів, проте він є невід'ємним елементом біологічного годинника.

Осциляція РНК-транскрипта *BMAL1* відбувається з малою амплітудою. Після транскрибування гена *Bmal1* на полірибосомах утворюється 15 альтернативних сплайс-варіантів, 8 з яких контролюють протеїни; вони причетні до функціонування механізму циркадіанного годинника. Один з них — поліпептид *BMAL1a*, який містить 583 амінокислотних залишка, інший — *BMAL1e*, утворений 626 залишками амінокислот. Вільний протеїн *BMAL1* досить стабільний, не модифікується, має 4 структурні домени: *bHLH*, *PAS1*, *PAS2* та *PAS*.

Підтвердження того, що білки *PER* і *TIM* мають стимулювальний ефект через *d-CLOCK* на експресію генів *per* і *tim*, доведено на культурі клітин. Причому, білки *PER* і *TIM* накопичуються в цитоплазмі, взаємодіють з *d-CLOCK* і/або *d-CLOCK*-вмісним комплексом тільки вночі, але не у світловий період доби [12]. Вони надходять до ядра всередині ночі і гальмують ефект *d-CLOCK* на експресію генів *per* і *tim*. Циркадіанна залежність дії *PER* і *TIM*, а також *PER-TIM*-гетеродимера узгоджується зі зростанням рівня транскрипції *per* і *tim* впродовж дня і зниженням цієї дії вночі.

За відсутності синтезу цих білків їх рівень в ядрі знижується, тому в пізні ранкові години спостерігається підйом рівня РНК-транскриптів *per* і *tim*. У подальшому відбувається накопичення білків *PER* і *TIM* у цитоплазмі. Так завершується повний оберт циклу. Крім того, *PER* і *TIM* здатні до фосфорилювання залежно від часу доби. Фосфорилювання *TIM* здійснюється у світловий проміжок доби, а фосфорилювання *PER* — за участі *DBT (DOUBLE-TIME)*-кінази [11].

Очевидно, що *PER* взаємодіє з комплексом через спеціальний структурний фрагмент (димер *PAS*) одного або обох компонентів комплексу та інактивує їх транскрипторну активність. Інший білок *TIM* не має свого *PAS*-специфічного фрагмента, але містить ділянку яка здатна розпізнавати білок *PER*. Це дає можливість *TIM* взаємодіяти з *PAS*-вмісними чинниками транскрипції і гальмувати їх активність.

За принципом зворотного зв'язку білки *PER* і *TIM* здатні гальмувати власний синтез шляхом пригнічення активності гетеродимерного комплексу *dCLOCK-CYC*. Крім того, за їх участі відбувається високий



рівень продукції білка і мРНК гена *d-CLOCK* [12]. Вважають, що білки *PER* і *TIM* є основними пускачами циркадіанного осцилятора. Проте вони здатні стимулювати експресію не тільки гена *d-CLOCK*, а і гена *cry*. Якщо відсутній один із пари білків (*PER/TIM*), то рівень РНК-транскрипту гена *cry* різко зменшується. Існує чітка залежність амплітуди РНК-транскрипту *cry* від фотоперіоду. Так, вміст РНК-транскрипту цього гена різко зменшується в умовах постійної темряви у порівнянні з незмінною фотоперіодичністю. Він знаходиться у протифазі щодо РНК-транскриптів генів *per* і *tim*.

У СХЯ гіпоталамуса молекулярні механізми генерації циркадіанних сигналів складаються з транскрипційних та трансляційних позитивно-негативних зворотних зв'язків. Базова модель таких зв'язків будується на роботі авторегуляторних петель зворотного зв'язку, коли білки, що продукуються певними генами негативно регулюють їх власну транскрипцію.

У наших дослідженнях [4, 5] показано, що експресія продукту активності гена *c-fos* — білка *c-Fos* — у пейсмейкерних нейронах СХЯ і кортикотропін-гормонопродукувальних та вазопресин-синтезуювальних суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса має чітку циркадіанну залежність. Зміна активності *c-fos* є показником явищ десинхронозу. Структурну основу цього гена становить 16 тис. п. н., містить 23 екзони. Він причетний до генерації ритмів у периферичних осциляторах, у центральному пейсмейкері виявляє менше значення.

До складу *per2* входить 46 тис. п.н., він містить 23 екзони. Протеїн *PER2*, як і протеїн *PER1* містить *PAS1*-, *PAS2*- та *PAC*-структурно-функціональні домени. Протеїн *PER2* належить до одного із субстратів транскрипційного фактора *CLOCK*, після ацетилювання *PER2* зростає стабільність та взаємодія із протеїнами групи Криптохромів. С-кінцева ділянка *PER2* має близько 100 амінокислотних залишків, відповідає за взаємодію з протеїнами *CRY* та транскрипційним фактором *E4BP4*. Під час його транскрипції утворюється шість альтернативних сплайс-варіантів мРНК, з яких три кодують протеїнові чинники, що задіяні у функціонуванні циркадіанного годинника.

До генів групи *Cryptohrom* відносять *Cry1* та *Cry2*. Після транскрибування на полісомах утворюється протеїн *CRY1*, який здатний до транскрипційної репресії низки інших генів. Циркадіанний фактор *CRY1* містить 586 амінокислотних залишків і може фосфорилуватися деякими протеїнкіназами. Зокрема, протеїнкіназа *MARK* фосфорилує *Ser CRY1* у положенні 247, а тирозинові кінази модифікують цей фактор у положенні 432. Ген *Cry2* експресується з утворенням восьми альтернативних сплайс-варіантів. Ген *Cry2*, як і ген *Cry1*, не здатний до репарації ДНК чи відповідати на світлове подразнення.

Ген *Clock* — один з перших "часових" генів ссавців, клонований *D. King* та співавт. (1997). Він невід'ємний елемент біологічного годинника, містить 23 екзони. Існує 11 транскрипційних варіантів цього гена, з яких 3 кодують протеїни, що складаються з 846 амінокислотних залишків, різняться між собою одиничними амінокислотними замінами.



Експресія цього гена не регулюється жодним протеїном циркадіанного годинника. Він має внутрішню гістонацетилтрансферазну активність [8]. При активації *Clock*-гена в СХЯ впродовж циркадіанного дня накопичується *m*РНК *Per*- і *Cry*-генів із відтермінованим, із запізненным, синтезом їх білків.

До регуляторних елементів біологічного годинника відносять сирітські рецептори ретиноевої кислоти (*Rev-erb $\alpha$* , *Ror $\alpha$* ) і транскрипційні чинники (*Dec1*, *Dec2*, *Tim* та *E4bp4*). Транскрипційний фактор *Rev-erb* перебуває у двох формах *Rev-erb $\alpha$*  та *Rev-erb $\beta$* . Вони здатні регулювати транскрипцію *BMAL1* через *RORE* ділянки, зокрема репресують транскрипційні процеси. Транскрипційний фактор *Ror* має конкурентні властивості щодо *Rev-erb $\alpha$* : якщо *Rev-erb* репресує транскрипцію, то *Ror $\alpha$*  навпаки, активує транскрипцію *BMAL1*. Таким чином, ядерні рецептори ретиноевої кислоти позитивно і негативно регулюють добові осциляції *BMAL1*. *Rev-erb $\alpha$*  та *Ror $\alpha$*  активують транскрипцію *CLOCK* і *BMAL1* та індукують одну з головних петель у механізмі циркадіанних осциляцій.

У короткому підсумку узагальнимо, що на початку циркадіанної доби у нейронах СХЯ впродовж декількох годин експресуються гени родини *Per* і *Cry*. Цей процес індукується активуючим впливом гетеродимерних комплексів протеїнів *CLOCK* і *BMAL1* на регуляторній E-box послідовності промоутерних ділянок мішеневих *Per* і *Cry*-генів. Протеїни *PER* і *CRY*, що накопичуються, взаємодіють з гетеродимерами *CLOCK/BMAL1*, гальмують (репресують) їх транскрипційну активність і, таким чином, пригнічують транскрипцію своїх власних генів.

Доведена участь окремих пептидів у забезпеченні амплітуди та синхронності функціонування ядерного компонента циркадіанного годинника ШЗ за допомогою *VIP* (вазоактивного кишкового пептиду) та його рецепторів (*VPAC2*). Характерно, що термінова індукція світлом *mPer* не визначається станом *VIP/VPAC2*-сигнальної системи [3]. Інший нейропептид *AVP*, який продукують аргінін-вазопресин- (*AVP*) позитивні нейрони оболонки СХЯ, має чітку циркадіанну ритміку в ядрах та спинно-мозковій рідині.

Завдяки ліпофільності МТ проникає у клітину, зокрема в ядро, і реалізує свої ефекти на рівні генома [13]. Взаємодія МТ із так званими часовими генами (*Per*, *Clock*, *Bmal*, *Cry* та ін.) визначає фотоперіодичний контроль циркадіанних і сезонних змін фізіологічних функцій організму [15]. Імовірно, що концентрація МТ в ядрі клітини впливає на цикл репресії-дерепресії низки генів, які регулюють переважно шляхи спрямування метаболізму ("за денним" або "за нічним" ритмом).

Виявлено істотний вплив МТ на експресію деяких мітохондріальних генів, зокрема стимулювання генів, що кодують 16S рибосомальну РНК (*mt-Rnr2*), субодиниці I і III цитохром C оксидази (*mt-c1*, *mt-c3*), *NADH*-дегідрогенази I (*mt-Nd1*), а активність субодиниці 6 АТФ-синтази, навпаки, гальмування. МТ ефективно синхронізує ритм синтезу білка в наномолярних дозах (В. Я. Бродский и соавт., 2008, 2009). Причому першим етапом сигнальної дії у цій синхронізації є вплив на цитоплазматичний кальцій.



У ШЗ виявлена експресія генів, що кодують синтез МТ: зокрема, ген *Aa-nat*, який причетний щодо добового ритму синтезу арилалкіламін-N-ацетилтрансферази (*AA-NAT*), ген *Hiomt* — до синтезу гідроксиіндол-О-метилтрансферази (*HIOMT*), а ген *Trh* кодує синтез триптофангідроксилази (*TPH*). Доведено, що *Hiomt* та *Aa-nat* експресуються у тканині нирок, скелетних м'язів, кишечника, спинному мозку, сім'яниках. Поза сумніву, що у цих та інших органах здійснюється продукування МТ. Однак у кількісному вимірі концентрація МТ у різних тканинах неоднакова. Так, у лімфоїдних органах рівень експресії *Hiomt* низький, а синтез МТ, відповідно, має обмежене значення.

Мелатонінові циркадні осцилятори за ефектом різняться. Так, експресія генів *Trh*, *Aa-nat*, *Hiomt* у ШЗ відбувається за участі ендогенних циркадіанних осциляторів, а в сітківці ока експресія гена *Hiomt* здійснюється тільки тривалістю світлового дня [7].

Крім зазначених існує низка інших чинників, спроможних до регуляції експресії генів. Ген *Hiomt* може зазнавати інгібування дибутирил-цАМФ (*db-cAMP*) і бутиратом або пригнічується дефіцитом вітаміну А [10], і гальмується синтез МТ [16].

Таким чином, молекулярний механізм генерації циркадіанних сигналів ритмоводія, який складається із циклів транскрипції і трансляції генів біологічного годинника та їх білкових продуктів, досить повно з'ясовано. Разом з тим залишається чимало питань залучення нейромедіаторних систем до ампліфікації та передачі ритмів, що генерується до клітин гіпоталамуса, продукції нейромедіаторів супрахіазматичними ядрами та функціонування пінеалоцитів шишкоподібної залози.

### Список використаної літератури

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2-х томах. — 2-е изд. перераб. и доп. — СПб.: Наука, 2008. — Т. 1. — 418 с.
2. Арушанян Э. Б. Значение супрахиазматических ядер гипоталамуса и часовых генов для хронотропной активности психотропных средств // Эксперим. и клин. фармакол. — 2011. — 74, № 3. — С. 37–44.
3. Арушанян Э. Б., Попов Ф. В. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций // Успехи физиол. наук. — 2011. — 42, № 4. — С. 39–58.
4. Булик Р. Е. Ультраструктура нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса за умов світлової депривації // Вісник наук. досліджень. — 2008. — № 1. — С. 78–80.
5. Булик Р. Е., Пішак В. П. Характеристика ефектів мелатоніну й епіталону на стан *c-fos* у нейросекреторних ядрах гіпоталамуса щурів, стресованих світлом // Бук. мед. вісник. — 2009. — 13, № 4. — С. 45–49.
6. Хавинсон В. Х., Малинин В. В., Ванюшин Б. Ф. Роль пептидов в епігенетической регуляції активності генів в онтогенезі // Бюл. експерим. биол. мед. — 2011. — 152, № 10. — С. 452–457.
7. Bernard M., Guerlotti J., Gruve P. et al. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina // *Reprod. Nutr. Dev.* — 1999. — 39. — P. 325–334.



8. *Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P.* Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase // *Cell*. — 2006. — **125**. — P. 497–508.
9. *Edey I.* Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila* // *Chronobiol. Internat.* — 1999. — **16**, № 4. — P. 377–414.
10. *Fu Z., Kato H., Kotera N.* et al. Regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // *Biophys. Biotechnol. Biochem.* — 2001. — **65**. — P. 2504–2511.
11. *Kloss B., Price J. L., Saer L.* et al. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase 1 $\epsilon$  // *Cell*. — 1998. — **94**. — P. 97–107.
12. *Lee C., Bae R., Edey I.* The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interactions with PER-TIM complex // *Neuron*. — 1998. — **21**. — P. 857–867.
13. *Leon-Blanco M. M., Guerrero J. M., Reiter R. J.* et al. RNA expression of human telomerase subunits TR and TERT is differentially affected by melatonin receptor agonists in the MCF-7 tumor cell line // *Cancer Lett.* — 2004. — **216**, № 1. — P. 73–80.
14. *Miles A.* Melatonin: Perspectives in the life sciences // *Life Sci.* — 1989. — **44**. — P. 375–386.
15. *Wiechmann A. F.* Regulation of gene expression by melatonin: a microarray survey of the rat retina // *J. Pineal Res.* — 2002. — **33**. — P. 178–185.
16. *Wiechmann A. F., Burden M. A.* Regulation of AA-NAT and HIOMT gene expression by butyrate and cyclic AMP in Y79 human retinoblastoma cells // *J. Pineal Res.* — 1999. — **27**. — P. 116–121.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧАСОВ

В. П. Пишак, Р. Е. Булик

Буковинский государственный медицинский университет  
МЗ Украины, 58002 Черновцы

В работе приведены результаты генетических исследований структурных генов, обеспечивающих функционирование шишковидной железы как биологических часов.

### MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF REGULATION OF PINEAL GLAND FUNCTION AS A BIOLOGICAL CLOCK

V. P. Pishak, R. Ye. Bulyk

Bukovyna State Medical University MoH Ukraine, 58002  
Chernivtsi

Presented are the results of genetic studies of structural genes, which support functioning of the pineal gland as a biological clock.