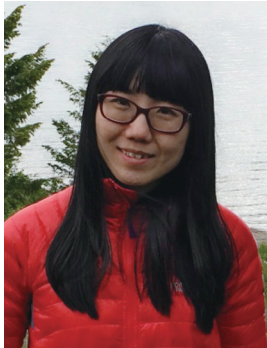


DOI: 10.13376/j.cbls/2015187

文章编号: 1004-0374(2015)11-1345-10



张珞颖, 博士, 博士生导师, 华中科技大学生命科学与技术学院教授。获美国西北大学博士学位; 曾在美国加州大学旧金山分校从事博士后研究。目前受聘国家青年“千人计划”特聘教授。

主要研究方向为睡眠与生物钟的调控机制及功能, 在果蝇生物钟的神经网络、进食对小鼠生物钟的调节机制等领域取得了一系列成果。在 *PNAS*、*Current Biology*、*eLife* 等国际权威期刊共发表学术论文十余篇。目前主持国家自然科学基金项目。

## 果蝇昼夜节律的调控机制

张珞颖\*, 叶晓雪

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

**摘要:** 40多年前的遗传筛选鉴定了第一个果蝇生物钟基因 *period*, 开启了果蝇生物钟调控机制的研究。随着更多生物钟基因被发现, 一个由转录水平的调控及转录后水平的修饰组成的负反馈环路模型逐步形成, 被认为是调控昼夜节律的核心分子机制。生物钟驱动果蝇脑内约 150 个神经元的活动, 这些神经元在不同的环境条件下通过不同的方式互动, 共同调控果蝇的行为节律。昼夜环境变化中最显著的是明暗变化。蓝光受体 cryptochrome 在光对昼夜节律的调控中起重要作用。

**关键词:** 果蝇; 生物钟; 负反馈环路; 昼夜神经元; cryptochrome

**中图分类号:** Q41      **文献标志码:** A

## The regulatory mechanism of *Drosophila* circadian rhythm

ZHANG Luo-Ying\*, YE Xiao-Xue

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Over 40 years ago, a genetic screen identified the first *Drosophila* clock gene, *period*. This initiated research in the regulatory mechanism of fly circadian clock. As additional clock genes were characterized, a model of a negative feedback loop consisting of transcriptional regulations and posttranscriptional modifications was gradually developed. This model is now generally accepted to be the core molecular mechanism driving circadian rhythms in the fly. Circadian clock drives the activities of approximately 150 neurons in the fly brain. These neurons interact with each other to drive behavioral rhythms, and the interactions are different under different environmental conditions. During the daily cycle, the most prominent alteration in environmental conditions is the light-dark cycle. The blue light photoreceptor cryptochrome plays a key role in mediating the effects of light on circadian rhythms.

**Key words:** *Drosophila*; circadian clock; negative feedback loop; circadian neuron; cryptochrome

收稿日期: 2015-07-23

基金项目: 中组部青年“千人计划”以及国家自然科学基金面上项目(31471125)

\*通信作者: E-mail: zhangluoying@hust.edu.cn

包括人类在内的多数生物的日常活动和生理过程都呈现出 24 h 的节律, 即昼夜节律。生物体内源性的生物钟产生并驱动这些昼夜节律。生物钟使得生物可以预判外界环境的日常变化, 从而为这些变化提前做出准备, 最大程度地适应环境。

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 昼夜节律的研究, 对于揭示昼夜节律的分子机制有着重大的影响。1971 年, Konopka 和 Benzer<sup>[1]</sup> 发现了第一个影响昼夜节律的基因突变, 并将该基因命名为 *period* (*per*)。他们发现了 *per* 的 3 个等位基因, *per<sup>S</sup>*、*per<sup>L</sup>* 和 *per<sup>01</sup>*, 分别导致果蝇的活动和羽化节律的周期变为 19 h (*per<sup>S</sup>*)、29 h (*per<sup>L</sup>*) 和无节律 (*per<sup>01</sup>*)。 *per* 的突变可以改变昼夜节律的周期, 这说明 *per* 在生物钟的定时机制中起着关键作用。 *per* 如何给生物钟定时? 关于此问题的研究直到 1984 年 *per* 基因被成功鉴定出来才真正开启<sup>[2-5]</sup>。由 Konopka 和 Benzer 发现的 *per* 突变被定位和分析<sup>[6-7]</sup>。研究表明, *per<sup>S</sup>* 和 *per<sup>L</sup>* 都是点突变, 导致单一氨基酸的替换。 *per<sup>01</sup>* 则引入了一个终止密码子, 导致蛋白质的翻译提前终止。正如 Yu 等<sup>[7]</sup> 指出的, 这是首次在氨基酸序列的层面上发现导致行为变化的突变。因此, 这些研究不仅对昼夜节律的领域非常重要, 对于整个行为遗传学的领域也产生了不小的影响。

随后研究表明, PER 的一个区域, 与果蝇的 SINGLE-MINDED 以及哺乳动物的 Amt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) 的部分区域类似, 因此, 该区域被命名为 Per-Arnt-Sim (PAS) 结构域<sup>[8]</sup>。此结构域在与其他含有 basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS 结构域的转录因子形成二聚物的过程中起重要作用<sup>[9]</sup>, 暗示 PER 的功能为调节转录。另外, 研究显示 PER 主要存在于细胞核内<sup>[10]</sup>, 且 PER 在核内时可能对调控昼夜节律起关键作用<sup>[11-12]</sup>。综上所述, 这些研究结果暗示着这样一个机制: PER 通过与其他转录因子互作来调控昼夜节律, 因为 PER 本身不具有结合 DNA 的结构域<sup>[9]</sup>。

关于昼夜节律分子机制的研究, 其他突破性发现包括: *per* 转录本的生成呈现节律, 其周期约 24 h<sup>[13-14]</sup>; PER 蛋白水平呈现昼夜节律<sup>[15-16]</sup>; PER 的磷酸化状态也呈现昼夜变化<sup>[16]</sup>。过表达 PER 会抑制体内 *per* mRNA 的波动, 并且此抑制作用表现出细胞自主性<sup>[17]</sup>。基于这些现象, 一个关于果蝇生物钟的模型被提出: PER 蛋白或相关产物抑制 *per* mRNA 的生成, 这样一个负反馈环路构成了果蝇的

生物钟。随后的研究表明, 此转录反馈环路不仅是果蝇生物钟的核心定时机制, 在包括植物、真菌、动物等在内的多种真核生物中也是高度保守。另外 *per* 也是其他动物的生物钟的核心成员 (详情请见其他章节)。

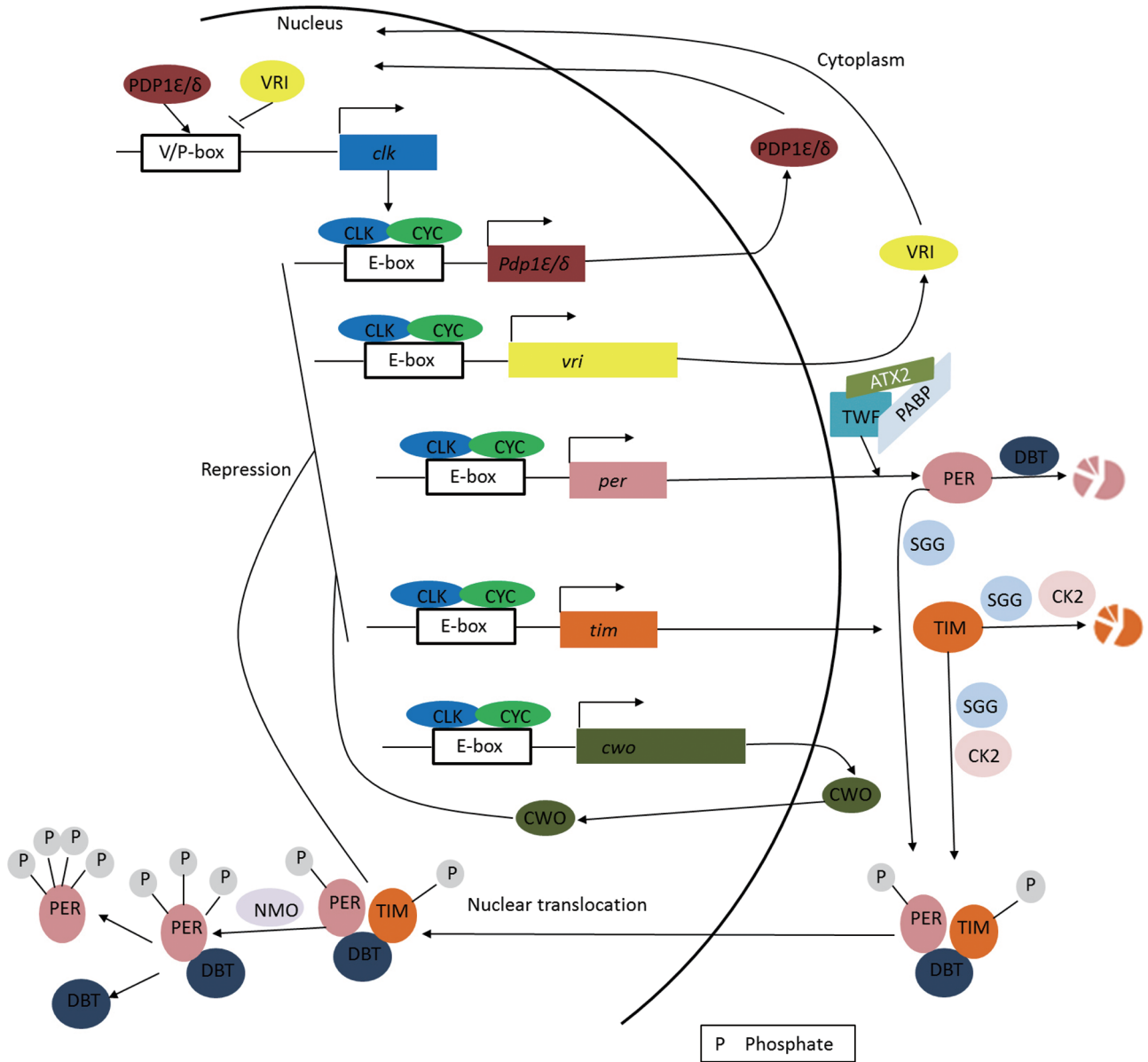
与此同时, 另一个生物钟关键基因 *timeless* (*tim*) 也在果蝇中被发现<sup>[11-12]</sup>。 *tim* 的 mRNA 水平呈现昼夜波动, 其波动周期与相位都与 *per* 一致, 而且此波动依赖于 PER 和 TIM 蛋白的存在<sup>[18]</sup>。这说明 PER 和 TIM 可能通过共同的反馈机制来调节它们自身的表达。进一步研究表明, *tim* 的节律性表达可决定 PER 开始累积并转移至核内的时间<sup>[18]</sup>, 而且 TIM 蛋白的一段可以直接与 PER 的 PAS 结构域结合<sup>[19]</sup>。这些结果证明 TIM 为前文提到的负反馈环路的又一成员, 并与 PER 合作调控生物钟。

研究人员在分析 *per* 的启动子寻找转录调控元件时发现了一个常规的 E-box 元件 (CACGTG), 此元件对于激活 *per* 的转录是必需的<sup>[20]</sup>。随后的研究发现, 这是一个演化上保守的昼夜节律调控元件, 存在于许多动物的基因组内 (详情请见其他章节)。是什么在通过 E-box 调控 *per* 的转录? 在 1998 年, 又有两个基因 *clock* (*clk*) 和 *cycle* (*cyc*) 被发现, 为负反馈环路添加了两个核心成员<sup>[21-24]</sup>。CLK 和 CYC 都是含有 bHLH-PAS 结构域的转录因子, 两者可形成二聚体, 并通过 *per* 和 *tim* 启动子里的 E-box 元件激活 *per* 和 *tim* 的转录<sup>[21,23-24]</sup>。PER 和 TIM 蛋白则阻断 CLK/CYC 在它们的启动子上的转录激活作用<sup>[23]</sup>。这一步骤, 让生物钟的反馈环路得以闭合 (图 1)<sup>[23]</sup>。

迄今为止, 有超过 10 个已经鉴定了的生物钟的反馈环路基因。下一部分, 将详细归纳总结生物钟的分子机制, 以及如何产生并维持 24 h 的分子节律。生物钟的反馈环路为 24 h 的节律提供分子基础, 然而, 从系统的角度出发, 生物钟究竟在哪里, 生物钟怎样调控昼夜节律? 为了回答这些问题, 我们将在第 2 部分从解剖学的层面讲述调控果蝇昼夜节律的神经网络。生物钟的存在让生物体可以更好地适应昼夜环境的变化, 而所谓的昼夜变化, 最显著的变化就是光, 即明暗变化。所以在第 3 部分, 将讨论光如何在分子层面, 以及细胞和组织层面调控昼夜节律。

## 1 生物钟产生的分子机理

如前文所述, CLK 和 CYC 与 *per* 和 *tim* 启动



P为磷酸化修饰

图1 生物钟的分子机理模式图

子内的 E-box 元件结合并激活 *per* 和 *tim* 的转录<sup>[21,23-24]</sup>。然而, PER 和 TIM 蛋白却在 *per* 和 *tim* 的 mRNA 生成后 6~8 h 才开始于细胞质中积累。PER 蛋白之所以会有积累上的延迟, 部分是源于 DOUBLETIME (DBT) 的作用(图 1)<sup>[25-27]</sup>。dbt 为哺乳动物的 casein kinase 1ε 在果蝇内的同源基因。DBT 与 PER 结合, 磷酸化 PER 并促使其降解<sup>[25-28]</sup>。而 TIM 可以稳定由 PER-DBT 组成的复合体<sup>[29]</sup>, 使得 DBT-PER-TIM 复合体可以在胞质中积累<sup>[19,30-31]</sup>, 从而拮抗 DBT 的效果。此外, CK2 (casein kinase 2) 也作用于 PER 和 TIM, 促使它们降解和进入核内<sup>[32-36]</sup>。哺乳动物的 GSK-3β (glycogen synthase kinase

3β) 在果蝇内的同源基因 *shaggy* (*sgg*), 可以磷酸化 TIM, 促使 TIM 和 PER 降解以及进入核内<sup>[37]</sup>。SGG 也可以磷酸化 PER, 促使其进入核内但不影响 PER 的稳定性<sup>[38]</sup>。CK2 和 SGG 主要存在于胞质中<sup>[32,39]</sup>, 这为它们作用于 PER 和 TIM, 促使其进入核内提供了空间条件(图 1)。入核后, PER 与 DBT 以及 CLK-CYC 形成复合体, 抑制 CLK-CYC 激活转录(图 1)<sup>[27,40]</sup>。在这个过程中, PER 被 DBT 逐步磷酸化, 直至 PER 的 47 位的丝氨酸(S47)被磷酸化, 形成一个非典型的 F-box 蛋白 SLIMB (即哺乳动物的 β-Trcp 同源基因) 的结合位点<sup>[41]</sup>。SLIMB 与 PER 结合后, PER 被泛素化并随之降解。

然而, DBT 对于 PER 的作用并不是简单的磷酸化而后降解, DBT 作用于不同的位点有不同的效果。2011 年, Chiu 等<sup>[42]</sup> 研究表明, NEMO 激酶磷酸化 PER 的 S596 位点, 从而导致其附近的位点包括 S595、S593 和 S589 被 DBT 磷酸化。这一系列的磷酸化最终延迟 S47 位点的磷酸化, 从而延迟 PER 与 SLIMB 的结合和降解, 起到减慢生物钟的效果。值得一提的是, *per<sup>S</sup>* 正是突变了 S589, 从而导致生物钟加速<sup>[6-7]</sup>。

PER 在磷酸化的同时也可被去磷酸化。研究显示, 蛋白去磷酸化酶 1 (PP1) 和蛋白去磷酸化酶 2A (PP2A) 都可作用于 PER, 延迟其磷酸化和降解<sup>[43-44]</sup>。前者由 TIM 介导, 后者则不依赖于 TIM<sup>[44]</sup>。磷酸化除了影响 PER 的稳定性, 还可增强其抑制转录的能力<sup>[45]</sup>。

磷酸化修饰调节 PER 和 TIM 的稳定性、细胞内定位 (细胞质到细胞核的转移) 以及转录抑制因子的功能, 从而在生物钟的定时机制中起到极其重要的作用。除了磷酸化, PER 还受到翻译水平的调控。在果蝇脑内调控昼夜节律的核心神经中, TWENTY-FOUR (TWF) 与 ATAXIN-2 互作, 并与 PABP (polyadenylate-binding protein) 结合, 激活 PER 的翻译, 最终起到调控昼夜节律的效果 (图 1)<sup>[46-48]</sup>。

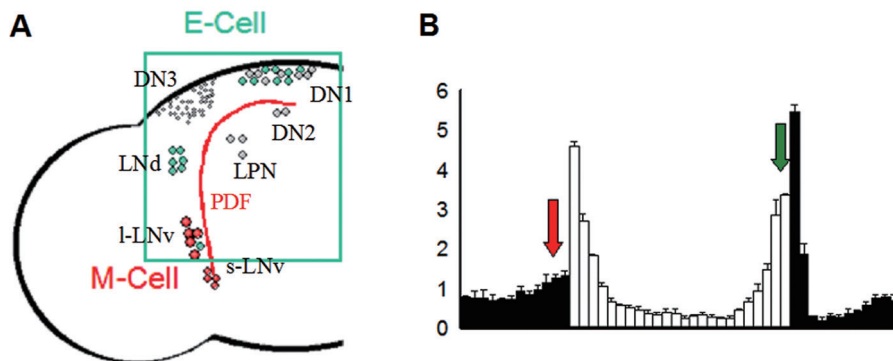
由 PER/TIM 和 CLK/CYC 组成的负反馈环路可以很好地解释 *per* 和 *tim* mRNA 的昼夜节律。然而, *clk* 的 mRNA 也呈现昼夜节律, 且与 *per* 和 *tim* 的波动反相 (即波峰与波谷出现的时间与 *per* 和 *tim* 相差大约 12 h)<sup>[22-23]</sup>。那么, *clk* mRNA 的昼夜节律是如何产生的。直到生物钟的第二条反馈环路被发

现, 这个问题才有了答案。第二条反馈环路鉴定了两个新的转录因子, 即 *vri* (*vri*) 和 *Pdp1ε/δ* (PAR domain protein 1ε、δ)<sup>[49-51]</sup>。CLK/CYC 通过与 E-box 结合, 激活 *vri* 和 *Pdp1ε/δ* 的转录, VRI 和 PDP1ε/δ 的蛋白随之开始积累, 但 PDP1ε/δ 累积到其最高点的时间要比 VRI 晚几个小时<sup>[49,52]</sup>。VRI 和 PDP1ε/δ 与 *clk* 的启动子内的 V/P-boxes (VRI/PDP1-boxes) 结合, VRI 抑制而 PDP1ε/δ 激活 *clk* 的转录<sup>[49-50]</sup>。当 DBT-PER-TIM 复合体作用于 CLK/CYC 抑制其转录激活功能时, *vri* 和 *Pdp1ε/δ* 的生成则被抑制, 其 mRNA 和蛋白水平也随之减少。由于 VRI 和 PDP1ε/δ 的蛋白水平呈现昼夜节律, 它们所调节的 *clk* 也呈现昼夜节律 (图 1)。

继 VRI 和 PDP1ε/δ 之后, 研究人员又发现了第三条负反馈环路, 由 CLK/CYC 和含有 bHLH-orange 结构域的转录抑制因子 CWO (CLOCKWORK ORANGE) 组成<sup>[53-55]</sup>。CLK/CYC 与 E-box 结合, 激活 *cwo* 的转录。CWO 生成后则与 CLK/CYC 竞争 E-box, 从而抑制 CLK/CYC 的转录激活功能 (图 1)。

## 2 昼夜节律的神经网络

生物钟的分子机制解释了 24 h 节律如何产生, 然而, 控制行为节律的生物钟存在哪里? 果蝇的脑内有大约 150 个神经元, 对果蝇的昼夜节律起到重要作用<sup>[56-58]</sup>。根据解剖学相对位置, 这些神经元被分为 7 簇 (图 2A), 分别为: 大型和小型腹外侧神经元 (l- 和 s-LNvs)、背外侧神经元 (LNds)、三组背侧神经元 (DN1s、DN2s 和 DN3s), 以及外后侧神经元 (LPNs)<sup>[57-58]</sup>。持续黑暗条件下, 分子节律可以



A, 图中所示为控制果蝇昼夜节律的神经网络。M-cells (红色)包括PDF (+) l-和s-LNvs。E-cells (绿色)包括PDF (-) s-LNv、LNds、几个DN1s和两个DN3s。B, 已标准化的野生型雄性果蝇群体的活动图。图中为4 d (每天12 h光照, 12 h 黑暗)活动的平均值。光照中的活动由白色柱形表明, 黑暗中的活动由黑色柱形表明。红色和绿色箭头分别指示晨间和夜间行为。

图2 晨细胞和暮细胞分别驱动晨间行为和夜间行为

在这些神经元里持续多日, 这为在黑暗中可以持续多日的行为节律提供了分子基础<sup>[59-60]</sup>。那么, 这些神经元又是如何调控果蝇的昼夜行为?

果蝇的昼夜行为主要表现为两极化的日常活动(图2B), 即发生在日出(实验室里为灯亮前)的晨间活动(morning anticipation)和发生在日落(实验室里为熄灯前)的夜间活动(evening anticipation)。早在1976年, Pittendrigh和Daan<sup>[61]</sup>就提出了一个被广泛接受的模型来解释这种两极化行为的产生。依据这个模型, 在生物体内存在两个不同的昼夜节律振荡器, 分别为晨间振荡器(morning oscillator, MO)和夜间振荡器(evening oscillator, EO)。MO负责晨间行为并被光加快, EO负责夜间行为并被光减慢。两个振荡器相互作用, 形成一个耦合振荡器。

直到近30年后, 果蝇的研究终于为MO和EO的存在提供了强有力的证据。1-LNVs和4个s-LNVs(5<sup>th</sup> s-LNVs除外)都表达一种神经肽PDF(pigment dispersing factor)<sup>[62-63]</sup>。Pdf或Pdf受体(Pdfr)的突变, 或表达PDF的神经元缺失都会导致晨间行为急剧减少, 但是夜间行为不受影响<sup>[64-66]</sup>。另外, 当生物钟仅于PDF(+)的神经元内工作时, 也可以驱动晨间行为<sup>[67]</sup>。因此, 这些PDF(+)细胞被称为晨细胞(morning cells, M-cells)。破坏PDF(-)s-LNV、LNd, 以及部分DN1和DN3会导致夜间行为的缺失, 但不影响晨间行为, 因而这些细胞被称为暮细胞(evening cells, E-cells)<sup>[68]</sup>。M-cells中的1-LNVs还促使果蝇从睡眠中觉醒, 这与其驱动晨间行为的功能是相辅相成的<sup>[69-72]</sup>。

以上只是简化了的昼夜节律神经调控模型, 事实上, M-cells和E-cells并不是各自独立地调控晨间或夜间行为。M-cells可以调节夜间行为, E-cells也可以介导晨间行为<sup>[63,68,73-76]</sup>。Pdf或Pdfr突变, 以及破坏表达PDF的神经元虽然并没有导致夜间行为的减少, 却使得该行为出现的时间提前<sup>[64-66]</sup>。另外, 部分E-cells, 包括LNd和DN1的生物钟也发生了变化, 说明由M-cells分泌的PDF调节E-cells的生物钟<sup>[77-81]</sup>。在Pdfr突变的果蝇中, 只在E-cells表达Pdfr可以挽救由于Pdfr突变导致的晨间和夜间行为的变化, 说明E-cells不仅调控夜间行为, 也同时介导晨间行为<sup>[73,75]</sup>。这一系列的结果或许正体现了MO与EO之间的耦合, 从而再次验证了Pittendrigh和Daan的模型。那么这个耦合存在的意义是什么?

果蝇的晨间和夜间行为会随着季节性的日照长

度(又称光周期)的变化而变化。M-cells与E-cells之间的互作也随光周期的变化而变化(图3)。光周期短时(如冬季), 调控昼夜节律的神经网络由M-cells控制。M-cells决定晨间和夜间行为发生的时间<sup>[82]</sup>。在持续黑暗(DD)中, M-cells可以在一定范围内调控其他昼夜神经元的生物钟, 同时也调控果蝇活动节律的周期<sup>[83-84]</sup>。光周期长时(如夏季), 昼夜神经网络由E-cells控制。E-cells决定晨间和夜间行为发生的时间<sup>[82]</sup>。在持续光照(LL)中, E-cells驱动果蝇的活动节律<sup>[85-86]</sup>。更为复杂的是, 不仅是光周期, 光强和温度也可能会影响M-cells与E-cells的互作<sup>[76]</sup>。当生物钟仅于部分DN1s内工作时, 强光时只驱动晨间行为, 而弱光时则驱动晨间和夜间行为。强光时, 低温会抑制晨间行为却促进夜间行为。

2014年, Chiu等<sup>[42]</sup>研究发现, s-LNVs与DN1s形成突触连接, DN1s则与脑内PI(pars intercerebralis)区域的细胞形成突触连接, 构成一个果蝇活动的神经输出网络。果蝇脑内的PI区域被认为功能上类似哺乳动物的下丘脑。部分PI神经元表达脑内促肾上腺皮质激素释放因子的同源基因DH44。正常的昼夜节律活动需要DH44, 激活或破坏表达DH44的PI神经元会导致节律丧失。

### 3 光调控昼夜节律的机制

环境的昼夜变化可以调控生物钟, 从而调控行为和生理过程的昼夜节律, 使生物体得以适应环境。环境因素中, 昼夜变化是最显著的, 对生物体产生最大影响的就是光的明暗变化。光对果蝇昼夜节律的调控在很大程度上呈现细胞自主性。离体培养的果蝇组织, 包括翅膀、触角、喙等, 其生物钟都可被光调控<sup>[87]</sup>。那么这种细胞自主性是如何产生的?

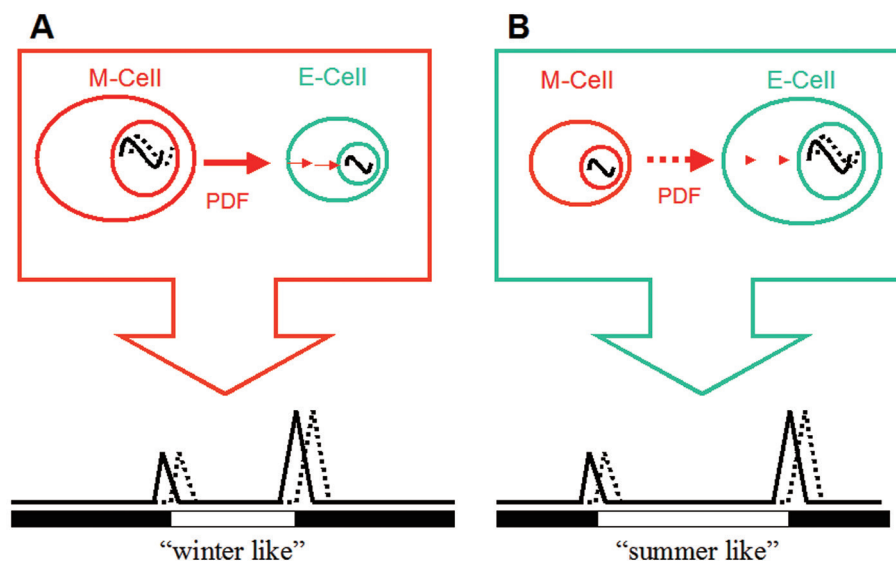
*cry* (cryptochrome)的发现为这个问题提供了答案<sup>[88-89]</sup>。果蝇的*cry*为植物蓝光受体*cryptochrome*的直向同源基因<sup>[90-91]</sup>。较短时间的光照(比如长度为10 min的光脉冲)可以导致果蝇昼夜节律的变化, 而这种光脉冲引起的变化必须依靠CRY介导<sup>[89]</sup>。另外, 持续光照(LL)会破坏正常果蝇的昼夜节律<sup>[92]</sup>, 而*cry*突变的果蝇则不受影响<sup>[93]</sup>。分子水平的研究显示, 光照导致CRY构象改变而与TIM结合, 然后TIM于蛋白酶体中降解<sup>[94-97]</sup>。光照也导致CRY在蛋白酶体中降解, 但是这个过程比TIM的降解缓慢<sup>[96-98]</sup>。这是因为CRY和TIM的降解都由F-box蛋白JETLAG(JET)介导<sup>[99-101]</sup>, 而

JET 对于 TIM 的亲密度比 CRY 高, 所以 TIM 在 CRY 之前降解<sup>[101]</sup>。光照引发的 TIM 降解需要 COP9 信号小体<sup>[102]</sup>。COP9 作用于 JET 的下游来促进 TIM 的降解。*jet* 或 *COP9* 突变的果蝇与 *cry* 突变的果蝇一样, 在 LL 的情况下其昼夜节律不受影响<sup>[93,99-100,102]</sup>, 进一步证明这些基因可能作用于相同的通路来介导光对生物钟的影响。

不难理解, 光照引发 TIM 的降解, 从而改变生物钟, 最终改变行为节律<sup>[103-105]</sup>。然而, 光照引发 TIM 的降解发生在一天中不同的时间, 对于生物钟会产生不同的效果。当光照发生于夜间较早的时候会减慢生物钟, 因为, 此时 *tim* mRNA 较多, 而新生成的 TIM 蛋白可于几个小时内补偿降解的 TIM。相反, 当光照发生于夜间较晚时会加快生物钟, 因为此时 *tim* mRNA 较少, 所以, 光照会提前使生物钟变成日出 (实验室里为灯亮) 时的状态。白天时光照对于生物钟的影响基本可以忽略, 因为这个时候 TIM 很少, 无法进一步减少。

CRY 信号通路可以很好地解释光对昼夜节律的调控所呈现出的细胞自主性, 那么 CRY 在哪里作用来调控昼夜节律? 在 *cry* 突变的果蝇里, 只在调控昼夜节律的神经元内表达 CRY, 可以挽救由

*cry* 突变导致的行为节律的改变<sup>[106]</sup>, 说明 CRY 于昼夜神经元内介导光对行为节律的作用。更深入的研究表明, 发生在夜间较晚时候, 可加速生物钟和行为节律的光照会导致 LNvs、LNds 和 DNs 内的 TIM 降解, 而发生在夜间较早时候, 可减慢生物钟和行为节律的光照则只导致 LNds 和 DNs 内的 TIM 降解, LNvs 内的 TIM 不受影响<sup>[107]</sup>。光对行为节律的减慢作用, 与 LNvs 内 TIM 的降解无关, 但是光对行为节律的改变却需要 LNvs 内的 CRY。研究人员对于这个现象的解释为, 发生在夜间较早时候, 可减慢生物钟和行为节律的光照可能作用于 LNds 和 DNs, 这些神经元再传递信号至 LNvs, 最终减慢行为节律。这些复杂的结果说明, 虽然在单个细胞层面光可以以一种细胞自主性的方式调控生物钟, 但是在系统水平上, 光对于行为节律的调控却要依赖于细胞与细胞之间的信号传递。另外, CRY 还参与调节 M-cells 与 E-cells 之间的互作<sup>[81]</sup>。如第 2 部分所述, 当处于长光周期时, E-cells 控制昼夜神经网络, 改变 M-cells 的生物钟只改变晨间行为发生的时间, 不影响夜间行为发生的时间<sup>[82]</sup>。然而, 在 *cry* 突变的果蝇里, 当光周期长时, 改变 M-cells 的生物钟可以改变晨间和夜间行为发生的时间<sup>[81]</sup>。



A, 在较短的光周期中, M-cells (红色) 主宰调控昼夜节律的神经网络。改变 M-cells 的分子时钟 (由虚线构成的曲线) 导致晨间和夜间行为发生的时间都随之改变 (由虚线构成的折线)。B, 在较长的光周期中, E-cells (绿色) 主宰昼夜神经网络。改变 E-cells 的分子时钟 (由虚线构成的曲线) 导致晨间和夜间行为发生的时间都随之改变 (由虚线构成的折线)。黑色和白色的矩形分别表明黑暗和光照的时间。黑色的曲线代表分子时钟的波动, 而由虚线构成的曲线则代表发生了改变 (即被加快或减慢) 的分子时钟。黑色的折线代表果蝇的活动, 包括晨间和夜间行为, 而由虚线构成的折线则代表发生时间有所改变 (提前或推迟发生) 的晨间和夜间行为。带箭头的红色或绿色方框代表昼夜神经网络的输出分别由 M-cells 或 E-cells 决定。

图3 不同光周期下 M-cells 和 E-cells 的功能组织模式图

这说明 *cry* 的缺乏导致即便在长光周期中, M-cells 也可以控制昼夜神经网络。

当果蝇缺乏 *cry* 时, 较短的光照不能影响昼夜节律, 但较长时间的光照 (比如光的昼夜变化) 仍然可以调控昼夜节律<sup>[89]</sup>。这是由果蝇的视觉系统介导的, 包括复眼、单眼和视网膜下的 Hofbauer-Buchner (H-B) 单眼<sup>[108]</sup>。除此之外, 部分 DN1s 以及尚未发现的感光色素可能也具有光受体功能<sup>[60,108-109]</sup>。

#### 4 总结

果蝇的生物钟由一系列反馈环路组成, 并且存在在转录、翻译及翻译后水平的调控。多层次的调控导致生物钟的核心成员在 mRNA 和蛋白质水平的昼夜波动, 为 24 h 的节律提供了分子基础。果蝇生物钟由脑内约 150 个表达昼夜节律蛋白的神经元控制。这些昼夜神经元通过信号传递相互作用, 共同调控果蝇的行为节律。昼夜神经元通过 CRY 和视觉系统感受环境中光的变化, 而光通过调控昼夜神经元内的生物钟, 以及神经元之间的信号传递, 最终调控行为节律。

生物钟存在于几乎所有的物种中, 从细菌、植物到人类, 且参与调控的基因和分子机制具有高度的相似性。在演化上如此保守, 说明生物钟对于物种生存的重要性。那么生物钟存在的意义是什么, 一个显而易见的功能是为了让生物更好地适应外界环境的变化。对于植物和野外的动物, 不能及时适应环境的日常变化, 其结果可能是毁灭性的。而对于人类, 不能很好地适应环境的日常变化, 会导致社会生活上诸多不便。更重要的是, 这会使身体处于一种亚健康状态, 从而增加罹患多种疾病的风险, 如精神疾病、新陈代谢类疾病等<sup>[110-112]</sup>。鉴于果蝇与人生物钟的高度相似性, 用果蝇来研究环境如何调控生物钟, 以及生物钟如何调控生理过程, 尤其是与疾病有关的生理过程, 将有助于开发药物和疗法来改善我们的生物钟, 使之更适应环境, 从而让我们处于整体上更健康的状态。

正如前文第 2 和第 3 部分所述, 节律性的行为和生理过程并不是简单地由生物钟驱动。生物钟存在于生物体内许多组织和细胞中。生物钟驱动细胞的节律性活动, 而不同的细胞和组织之间又可以通过信号传导影响对方的生物钟。我们所观察到的行为和生理过程的节律是诸多组织细胞的生物钟共同作用的结果。不同组织细胞里的生物钟互作失调会危害我们的健康。最常见的生物钟互作失调的影响

就是飞行时差导致的多种不适, 这些不适多为短期的。而对于长期上夜班或倒班的人群, 这种不适则会是长期的。长期的时钟互作失调会增加罹患多种疾病的风险<sup>[110-111]</sup>。果蝇因其相对简单的组织结构, 以及极其丰富的遗传学工具, 为研究不同组织细胞之间如何作用并共同调控行为提供了得天独厚的条件。了解不同组织细胞的生物钟互作机制, 将会为治疗失调以及由此引发的问题提供理论基础。

**致谢:** 感谢张勇博士给本文提出的修改意见和建议。

#### [参 考 文 献]

- [1] Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68(9): 2112-6
- [2] Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(7): 2142-6
- [3] Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. Nature, 1984, 312(5996): 752-4
- [4] Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. Cell, 1984, 38(3): 701-10
- [5] Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. Cell, 1984, 39(2 Pt 1): 369-76
- [6] Baylies MK, Bargiello TA, Jackson FR, et al. Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. Nature, 1987, 326(6111): 390-2
- [7] Yu Q, Jacquier AC, Citri Y, et al. Molecular mapping of point mutations in the period gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(3): 784-8
- [8] Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, et al. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. Cell, 1991, 67(6): 1157-67
- [9] Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. Nature, 1993, 364(6434): 259-62
- [10] Liu X, Zwiebel LJ, Hinton D, et al. The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. J Neurosci, 1992, 12(7): 2735-44
- [11] Sehgal A, Price JL, Man B, et al. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. Science, 1994, 263(5153): 1603-6
- [12] Vossell LB, Price JL, Sehgal A, et al. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. Science, 1994, 263(5153): 1606-9

- [13] Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 1990, 343(6258): 536-40
- [14] Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(24): 11711-5
- [15] Zerr DM, Hall JC, Rosbash M, et al. Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J Neurosci*, 1990, 10(8): 2749-62
- [16] Edery I, Zwiebel LJ, Dembinska ME, et al. Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2260-64
- [17] Zeng H, Hardin PE, Rosbash M. Constitutive overexpression of the *Drosophila* period protein inhibits period mRNA cycling. *EMBO J*, 1994, 13(15): 3590-8
- [18] Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, et al. Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science*, 1995, 270(5237): 808-10
- [19] Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, et al. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*, 1995, 270(5237): 811-5
- [20] Hao H, Allen DL, Hardin PE. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7): 3687-93
- [21] Allada R, White NE, So WV, et al. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, 1998, 93: 791-804
- [22] Bae K, Lee C, Sidote D, et al. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(10): 6142-51
- [23] Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, et al. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science*, 1998, 280(5369): 1599-603
- [24] Rutila JE, Suri V, Le M, et al. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell*, 1998, 93: 805-14
- [25] Kloss B, Price JL, Saez L, et al. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein kinase closely related to human casein kinase I $\epsilon$ . *Cell*, 1998, 94: 97-107
- [26] Price JL, Blau J, Rothenfluh A, et al. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, 1998, 94: 83-95
- [27] Kloss B, Rothenfluh A, Young MW, et al. Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron*, 2001, 30(3): 699-706
- [28] Kim EY, Ko HW, Yu W, et al. A DOUBLETIME kinase binding domain on the *Drosophila* PERIOD protein is essential for its hyperphosphorylation, transcriptional repression and circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13): 5014-28
- [29] Price JL, Dembinska ME, Young MW, et al. Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation *timeless*. *EMBO J*, 1995, 14: 4044-9
- [30] Curtin KD, Huang ZJ, Rosbash M. Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila period* protein contributes to the circadian clock. *Neuron*, 1995, 14: 365-72
- [31] Zeng H, Qian Z, Myers MP, et al. A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 1996, 380: 129-35
- [32] Lin JM, Kilman VL, Keegan K, et al. A role for casein kinase 2 $\alpha$  in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 2002, 420(6917): 816-20
- [33] Akten B, Jauch E, Genova GK, et al. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci*, 2003, 6(3): 251-7
- [34] Lin JM, Schroeder A, Allada R. *In vivo* circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila* PERIOD. *J Neurosci*, 2005, 25(48): 11175-83
- [35] Smith EM, Lin JL, Meissner RA, et al. Dominant-negative CK2 $\alpha$  induces potent effects on circadian rhythmicity. *PLoS Genetics*, 2008, 4: 99-109
- [36] Meissner RA, Kilman VL, Lin JM, et al. TIMELESS is an important mediator of CK2 effects on circadian clock function *in vivo*. *J Neurosci*, 2008, 28(39): 9732-40
- [37] Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, et al. A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 2001, 105: 769-79
- [38] Ko HW, Kim EY, Chiu J, et al. A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of PERIOD nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3 $\beta$ /SGG in circadian clocks. *Neurosci*, 2010, 30(38): 12664-75
- [39] Yuan Q, Lin F, Zheng X, et al. Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron*, 2005, 47(1): 115-27
- [40] Lee C, Bae K, Edery I. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5316-25
- [41] Chiu JC, Vanselow JT, Kramer A, et al. The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. *Genes Dev*, 2008, 22(13): 1758-72
- [42] Chiu JC, Ko HW, Edery I. NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed. *Cell*, 2011, 145(3): 357-70
- [43] Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R, et al. Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell*, 2004, 116(4): 603-15
- [44] Fang Y, Sathyanarayanan S, Sehgal A. Post-translational regulation of the *Drosophila* circadian clock requires protein phosphatase 1 (PP1). *Genes Dev*, 2007, 21: 1506-18
- [45] Nawathean P, Rosbash M. The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate *Drosophila* PER transcriptional repressor activity. *Mol Cell*, 2004, 13(2): 213-23



- [46] Lim C, Lee J, Choi C, et al. The novel gene twenty-four defines a critical translational step in the *Drosophila* clock. *Nature*, 2011, 470(7334): 399-403
- [47] Lim C, Allada R. ATAXIN-2 activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in *Drosophila*. *Science*, 2013, 340(6134): 875-9
- [48] Zhang Y, Ling J, Yuan C, et al. A role for *Drosophila* ATX2 in activation of PER translation and circadian behavior. *Science*, 2013, 340(6134): 879-82
- [49] Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, et al. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 2003, 112: 329-341
- [50] Glossop NR, Houl JH, Zheng H, et al. VRILLE feeds back to control circadian transcription of clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*, 2003, 37(2): 249-61
- [51] Zheng X, Koh K, Sowcik M, et al. An isoform-specific mutant reveals a role of PDP1  $\epsilon$  in the circadian oscillator. *J Neurosci*, 2009, 29(35): 10920-7
- [52] Blau J, Young MW. Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, 1999, 99(6): 661-71
- [53] Kadener S, Stoleru D, McDonald M, et al. Clockwork orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev*, 2007, 21(13): 1675-86
- [54] Lim C, Chung BY, Pitman JL, et al. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2007, 17(12): 108-9
- [55] Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, et al. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev*, 2007, 21(13): 1687-700
- [56] Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, et al. Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci*, 1992, 12(9): 3321-49
- [57] Helfrich-Forster C. The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech*, 2003, 62(2): 94-102
- [58] Shafer OT, Helfrich-Forster C, Renn SC, et al. Reevaluation of *Drosophila melanogaster's* neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol*, 2006, 498(2): 180-93
- [59] Peng Y, Stoleru D, Levine JD, et al. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol*, 2003, 1(1): E13
- [60] Veleri S, Brandes C, Helfrich-Forster C, et al. A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr Biol*, 2003, 13(20): 1758-67
- [61] Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian paemaker in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. *J Compar Physiol A*, 1976, 106: 291-331
- [62] Kaneko M, Helfrich-Forster C, Hall JC. Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J Neurosci*, 1997, 17(17): 6745-60
- [63] Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, et al. Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci*, 2006, 26: 2531-43
- [64] Renn SC, Park JH, Rosbash M, et al. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 1999, 99(7): 791-802
- [65] Hyun S, Lee Y, Hong ST, et al. *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron*, 2005, 48(2): 267-78
- [66] Lear BC, Merrill CE, Lin JM, et al. A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron*, 2005, 48(2): 221-7
- [67] Grima B, Chelot E, Xia R, et al. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 2004, 431(7010): 869-73
- [68] Stoleru D, Peng Y, Agosto J, et al. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 2004, 431(7010): 862-8
- [69] Parisky KM, Agosto J, Pulver SR, et al. PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron*, 2008, 60(4): 672-82
- [70] Shang Y, Griffith LC, Rosbash M. Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19587-94
- [71] Sheeba V, Fogle KJ, Kaneko M, et al. Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2008, 18(20): 1537-45
- [72] Chung BY, Kilman VL, Keath JR, et al. The GABA(A) receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2009, 19(5): 386-90
- [73] Lear BC, Zhang L, Allada R. The neuropeptide PDF acts directly on evening pacemaker neurons to regulate multiple features of circadian behavior. *PLoS Biol*, 2009, 7(7): e1000154
- [74] Rieger D, Wulbeck C, Rouyer F, et al. Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *J Biol Rhythms*, 2009, 24(4): 271-82
- [75] Zhang L, Chung BY, Lear BC, et al. DN1(p) circadian neurons coordinate acute light and PDF inputs to produce robust daily behavior in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2010, 20(7): 591-9
- [76] Zhang Y, Liu Y, Bilodeau-Wentworth D, et al. Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Curr Biol*, 2010, 20(7): 600-5
- [77] Klarsfeld A, Malpel S, Michard-Vanhee C, et al. Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci*, 2004, 24(6): 1468-77
- [78] Lin Y, Stormo GD, Taghert PH. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker

- interactions in the *Drosophila* circadian system. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7951-7
- [79] Yoshii T, Wulbeck C, Sehadova H, et al. The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *J Neurosci*, 2009, 29(8): 2597-610
- [80] Cusumano P, Klarsfeld A, Chelot E, et al. PDF-modulated visual inputs and cryptochrome define diurnal behavior in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, 2009, 12(11): 1431-7
- [81] Zhang L, Lear BC, Seluzicki A, et al. CRYPTOCHROME photoreceptor gates PDF neuropeptide signaling to set circadian network hierarchy in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2009, 19: 1-6
- [82] Stoleru D, Nawathean P, de la Paz Fernandez M, et al. The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell*, 2007, 129(1): 207-19
- [83] Stoleru D, Peng Y, Nawathean P, et al. A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*, 2005, 438(7065): 238-42
- [84] Yao Z, Shafer OT. The *Drosophila* circadian clock is a variably coupled network of multiple peptidergic units. *Science*, 2014, 343(6178): 1516-20
- [85] Murad A, Emery-Le M, Emery P. A subset of dorsal neurons modulates circadian behavior and light responses in *Drosophila*. *Neuron*, 2007, 53(5): 689-701
- [86] Picot M, Cusumano P, Klarsfeld A, et al. Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol*, 2007, 5(11): e315
- [87] Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, et al. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 1997, 278(5343): 1632-5
- [88] Emery P, So WV, Kaneko M, et al. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 1998, 95(5): 669-79
- [89] Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, et al. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 1998, 95(5): 681-92
- [90] Ahmad M, Cashmore AR. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 1993, 366(6451): 162-6
- [91] Lin C, Yang H, Guo H, et al. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2686-90
- [92] Konopka RJ, Pittendrigh C, Orr D. Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J Neurogenet*, 1989, 6(1): 1-10
- [93] Emery P, Stanewsky R, Hall JC, et al. A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature*, 2000, 404(6777): 456-7
- [94] Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, et al. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, 1999, 285(5427): 553-6
- [95] Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, et al. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science*, 1999, 285(5434): 1737-41
- [96] Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, et al. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science*, 2004, 304(5676): 1503-6
- [97] Dissel S, Codd V, Fedic R, et al. A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci*, 2004, 7(8): 834-40
- [98] Lin FJ, Song W, Meyer-Bernstein E, et al. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(21): 7287-94
- [99] Koh K, Zheng X, Sehgal A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, 2006, 312(5781): 1809-12
- [100] Peschel N, Veleri S, Stanewsky R. Veela defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17313-8
- [101] Peschel N, Chen KF, Szabo G, et al. Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Curr Biol*, 2009, 19(3): 241-7
- [102] Knowles A, Koh K, Wu JT, et al. The COP9 signalosome is required for light-dependent timeless degradation and *Drosophila* clock resetting. *J Neurosci*, 2009, 29(4): 1152-62
- [103] Hunter-Ensor M, Ousley A, Sehgal A. Regulation of the *Drosophila* protein Timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell*, 1996, 84(5): 677-85
- [104] Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, et al. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science*, 1996, 271(5256): 1736-40
- [105] Zeng H, Qian Z, Myers MP, et al. A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 1996, 380(6570): 129-35
- [106] Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Forster C, et al. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, 2000, 26(2): 493-504
- [107] Tang CH, Hinteregger E, Shang Y, et al. Light-mediated TIM degradation within *Drosophila* pacemaker neurons (s-LNVs) is neither necessary nor sufficient for delay zone phase shifts. *Neuron*, 2010, 66(3): 378-85
- [108] Helfrich-Forster C, Winter C, Hofbauer A, et al. The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, 2001, 30(1): 249-61
- [109] Dolezelova E, Dolezel D, Hall JC. Rhythm defects caused by newly engineered null mutations in *Drosophila*'s cryptochrome gene. *Genetics*, 2007, 177(1): 329-45
- [110] Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occupat Environ Med*, 2001, 58(11): 747-52
- [111] Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C, et al. Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. *Inter J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(11): 1353-8
- [112] Katz G. Jet lag and psychotic disorders. *Curr Psychiatr Rep*, 2011, 13(3): 187-92