ELŻBIETA PYZA, MILENA DAMULEWICZ

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, Kraków
E-mail: elzbieta.pyza@uj.edu.pl
milena.damulewicz@uj.edu.pl

MECHANIZMY REGULACJI SNU U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Sen jest okresem braku intensywnej aktywności motorycznej, podczas którego zachodzą istotne procesy w mózgu, dzięki blokadzie większości bodźców sensorycznych, które docierają do mózgu podczas czuwania. Proces snu jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu, zarówno człowieka, jak i zwierząt, w tym bezkręgowców, i nie może zostać zastąpiony zwykłym odpoczynkiem, czyli stanem bezczynności z zachowaniem świadomości (HENDRICKS i współaut. 2000, HUBER i współaut. 2004). Mechanizm snu został dobrze poznany u wywilżny octówki (*Drosophila melanogaster*), zwanej popularnie muszką owocową, która jest powszechnie wykorzystywanym modelem zwierzęcym w badaniach genetycznych, neurobiologicznych, fizjologicznych, chronobiologicznych i innych.

Sen jest regulowany przez dwa odrębne mechanizmy: zegar okołodobowy (ang. circadian clock) oraz proces homeostatyczny, czyli zapotrzebowanie na sen po okresie dłuższego czuwania (DEBOER 2013). Zegar okołodobowy wyznacza dobowy cykl snu i czuwania oraz jest uniwersalnym mechanizmem regulującym rytmiczne procesy zachodzące na poziomie komórkowym, tkankowym, narządowym i organizmalnym. Regulacja homeostatyczna z kolei reguluje długość snu, zwłaszcza po okresie deprywacji.

RYTMY I ZEGARY OKOŁODOBOWE

Zegar okołodobowy jest zbiorem komórek, tzw. oscylatorów, które charakteryzują

się rytmiczną ekspresją genów zegara. Komórki te można podzielić na (i) zegar nadrzędny - neurony zlokalizowane w mózgu, które generują samopodtrzymujące się oscylacje, oraz (ii) zegary peryferyczne, do których należą niektóre komórki glejowe, neurony w narządach zmysłów oraz komórki zlokalizowane w różnych tkankach i narządach całego ciała. Oscylacje zegarów peryferycznych zanikają, jeżeli nie są podtrzymywane przez zegar nadrzędny albo przez tzw. dawców czasu (niem. Zeitgeber), czyli dobowo zmieniające się czynniki środowiska, z których najważniejszym jest światło. Wszystkie oscylatory charakteryzują się rytmiczną ekspresją genów zegara, które razem z kodowanymi przez nie białkami stanowią molekularny mechanizm okołodobowego zegara biologicznego. Zegar okołodobowy jest jednym z wielu zegarów biologicznych - endogennych oscylatorów, które generują rytmy o różnym okresie. Dla przykładu, zegar okołoroczny synchronizuje procesy zmieniające się w ciągu roku, zwane rytмами sezonowymi, jak np. cykl rozrodu u ssaków. Jednak najczęściej badanymi procesami cyklicznymi są rytmy dobowe w procesach życiowych wszystkich organizmów, które generowane są przez zegar okołodobowy i synchronizowane ze zmianami zachodzącymi w środowisku zewnętrznym w ciągu 24 godz., głównie przez zmiany światła czy temperatury.

Rytmy dobowe procesów biochemicznych, fizjologicznych i behawioralnych są endogenne, jeżeli utrzymują się w stałych warunkach środowiska, co można stwierdzić w

warunkach laboratoryjnych przy zastosowaniu stałej ciemności, temperatury, wilgotności powietrza i innych czynników środowiskowych.

Dobowe rytmy aktywności lokomotorycznej oraz snu i czuwania należą do rytmów generowanych przez zegar okołodobowy. W stałej ciemności (DD) rytmy te „dryfują”, czyli przesuwają się w fazie w kolejnych dobach, dlatego określane są również jako „swobodnie biegnące” (ang. free-running), a ich okres staje się dłuższy lub krótszy od 24 godz. U człowieka rytm snu i czuwania w warunkach DD ma okres dłuższy od 24 godz., średnio ok. 25 godz., a u *D. melanogaster* wynosi 23,8 godz., czyli jest krótszy od 24 godz. Długość okresu rytmu w warunkach stałej ciemności jest cechą gatunkową, przy czym okres rytmu może też zmieniać się w niewielkim stopniu osobniczo. Ponadto, część osobników w każdej populacji może być nierytmiczna, zwłaszcza w warunkach laboratoryjnych co wskazuje, że rytmika procesów na poziomie genów, białek, procesów komórkowych, fizjologicznych i behawioralnych nie jest niezbędna dla przeżycia, ale zapewnia dobrą kondycję, zdrowie i wpływa na długość życia. Dla przykładu brak rytmiki snu i aktywności skutkuje bezsennością i ma poważne konsekwencje zdro-

wotne, a chroniczny brak snu prowadzi do śmierci.

MOLEKULARNY MECHANIZM ZEGARA OKOŁODOBOWEGO *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Zegar molekularny opiera się na ekspresji kilkunastu genów, m.in.: *period (per)*, *timeless (tim)*, *Clock (Clk)*, *cycle (cyc)*, *cryptochrome (cry)*, *PAR domain protein (pdp)*, *vri*, *doubletime (dbt)*, *casein kinase 2 (ck2)*, *jetlag (jet)* i *slimb*. Poziom lub aktywność białek zegara zmienia się cyklicznie w ciągu doby, umożliwiając im działanie na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego. Pierwszymi odkrytymi u zwierząt genami zegara, były opisane u *Drosophila melanogaster* *per* i *tim* (KONOPKA i BENZER 1971, SEHGAL i współaut. 1994.) Geny te mają cykliczną ekspresję w komórkach oscylatorów, ulegają jednak ekspresji również w wielu innych komórkach, gdzie mogą pełnić dodatkowe funkcje, niezwiązane z pracą zegara biologicznego (HARDIN 2005, BENNA 2010). U *D. melanogaster* maksimum ekspresji *per* i *tim* przypada na koniec dnia i na początek nocy (HARDIN i współaut. 1990, ZENG i współaut. 1994), a zależy od dwóch czynników transkrypcyjnych CLOCK (CLK) i CYCLE (CYC), które jako he-

Ryc. 1 Molekularny mechanizm zegara okołodobowego *Drosophila melanogaster*.

Głównymi genami zegara są *per*, *tim*, *Clk* i *cyc*, natomiast DBT i SGG fosforylują białka heterodimerów PER i TIM, uczestnicząc w ich przechodzeniu do jądra komórkowego. Sam mechanizm transportu przez błonę jądrową PER i TIM z udziałem importyn jest nieznan.

terodimery stymulują ich ekspresję, wiążąc się z sekwencją regulatorową, tzw. kaseta E (E-box), w rejonie promotora genu *per* i *tim* (YU i współaut. 2007). Pod koniec nocy w cytoplazmie komórek zegarowych syntetyzowane są białka PER i TIM, które także tworzą heterodimery i transportowane są do jądra komórkowego, gdzie hamując aktywność CLK i CYC, blokują ekspresję własnych genów (LEE i współaut. 1999). W trakcie dnia białka PER i TIM ulegają degradacji, dzięki czemu heterodimery CLK-CYC mogą ponownie przyłączyć się do E-box i aktywować transkrypcję genów. W ten sposób na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego ujemnego regulowana jest rytmiczna ekspresja głównych genów zegara. Cały cykl trwa 24 godz. (YU i współaut. 2006, TAYLOR i HARDIN 2008) (Ryc. 1).

Heterodimery CLK i CYC kontrolują ekspresję nie tylko genów *per* i *tim*, ale także genów kontrolowanych przez zegar okołodobowy (ang. clock-controlled genes, ccg) (YU i współaut. 2006). Oznacza to, że ekspresja tych genów jest cykliczna, poziom ich mRNA zmienia się w ciągu doby, ale nie są one częścią molekularnego mechanizmu zegara.

Zegar molekularny może synchronizować się z zewnętrznymi warunkami światła i ciemności, dzięki obecności białka KRYPTOCHROMU (CRY), które jest fotoreceptorem zegara absorbującym światło niebieskie. CRY pod wpływem światła ulega aktywacji, zmienia swoją konformację i przyłącza się do TIM (BERNDT i współaut. 2007, VANVICKLE-CHAVEZ i VAN GELDER 2007, OZTURK i współaut. 2011), który jest następnie degradowany, podobnie jak sam CRY, w wyniku ubiquitynacji przez JETLAG, element kompleksu ligazy ubiquityny E3 (HUNTER-ENSOR i współaut. 1996, LEE i współaut. 1996, MYERS i współaut. 1996, ZENG i współaut. 1996, CERIANI i współaut. 1999). Obniżony poziom TIM wpływa na stabilność PER, które w formie monomeru jest również degradowane przez ubiquitynację za pośrednictwem ligazy ubiquityny SLIMB. W warunkach stałego światła (LL) zależna od CRY degradacja TIM i PER następuje w sposób ciągły, w efekcie ustają oscylacje poziomu białka i niektóre rytmy, w tym aktywność lokomotoryczna, zanikają. Taki proces obserwowany jest m.in. u *Drosophila melanogaster*, ale nie jest on konserwatywny u wszystkich gatunków.

Oprócz głównej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, jest jeszcze pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego. Heterodimery CLK-CYC regulują transkrypcję represora VRILLE (VRI) i aktywatora PDP1, które współzawodnicząc o miejsce wiązania sekwencji regulatorowej utrzymują rytmiczną ekspresję

mRNA *Clk* (YU i współaut. 2007). W przeciwieństwie do PER i TIM, poziom białek CLK i CYC nie zmienia się w ciągu doby (HOUL i współaut. 2006), więc oscylacje mRNA *Clk* mają prawdopodobnie inne funkcje niż w przypadku mRNA *per* i *tim*. Być może stabilizują molekularny mechanizm zegara.

W skład molekularnego mechanizmu zegara wchodzi również białka kontrolujące procesy potranskrypcyjne i potranslacyjne, m. in. cykliczną fosforylację i defosforylację PER i TIM. PER jest fosforylowany przez kinazę kazeinową I epsilon (CK1ε), DOUBLE-TIME (DBT) i NEMO, które kontrolują jego stabilność (KLOSS i współaut. 1998, PRICE i współaut. 1998), z kolei kinaza kazeinowa II (CKII) i SHAGGY (SGG) fosforylują PER i TIM, biorąc udział w procesie ich przechodzenia do jądra komórkowego (BAE i EDERY 2006). Wykryto jeszcze kilka innych białek, które mogą kontrolować transkrypcję głównych genów zegara, formując dodatkowe pętle, takie jak CLOCKWORK ORANGE (CWO) (KADENER i współaut. 2007, LIM i współaut. 2007, MATSUMOTO i współaut. 2007, RICHIER i współaut. 2008), KAYAK-α (LING i współaut. 2012), czy E75 (KUMAR i współaut. 2014). Z kolei regulatorami translacji PER i TIM są białka TWENTY-FOUR (LIM i współaut. 2011) i ATAXIN-2 (LIM i ALLADA 2013).

Zegar molekularny opisany u *D. melanogaster* może być różny u innych gatunków owadów.

ZEGAR OKOŁODOBOWY *DROSOPHILA MELANOGASTER*

U *D. melanogaster* zegar nadrzędny składa się ze 150 neuronów zlokalizowanych w mózgu w kilku grupach. Pomiędzy płatem wzrokowym a środkową częścią mózgu występują dwie grupy neuronów, tzw. małe (5 neuronów o małych ciałach komórkowych) i duże (4 neurony o dużych ciałach komórkowych) neurony brzuszno-boczne (ang. small s-LNV and large l-LNV). Neurony te, z wyjątkiem jednego, tzw. piątego s-LNV, syntetyzują neuropeptyd – czynnik rozpraszający pigment (ang. pigment-dispersing factor, PDF), który jest głównym neuroprzekaźnikiem zegara. Pozostałe neurony zegara to grupa neuronów brzuszno-bocznych grzbietowych (LNd), neurony boczne tylnie (LPN) oraz trzy grupy neuronów grzbietowych (DN1, DN2 i DN3) (Ryc. 2). Wszystkie te grupy neuronów są ze sobą połączone siecią wypustek, a ich wzajemne interakcje odpowiadają za charakterystyczne cechy rytμών. Neurony s-LNV uważa się za komórki odpowiadające za poranny szczyt aktywności lokomotorycznej *D. melanogaster*, a neurony LNd, 5-ty s-LNV oraz

Ryc. 2 Siedem grup neuronów zegara wchodzących w skład zegara nadrzędnego, który łącznie składa się ze 150 neuronów.

RE – retina, LA – lamina, ME – medulla (układ wzrokowy).

DN1 za szczyt wieczorny (GRIMA i współaut. 2004, STOLERU i współaut. 2004). Te dwa szczyty charakteryzują dobowy wzór aktywności *D. melanogaster* w warunkach zmiennego oświetlenia 12 godz. światła i 12 godz. ciemności (LD12:12). Poranne zwiększenie aktywności rozpoczyna się zanim jeszcze pojawi się światło w środowisku, co określa się mianem antycypacji zmiany warunków oświetlenia i jest dowodem na obecność zegara okołodobowego (SHEEBA i współaut. 2010).

Neurony s-LNV wydają się mieć kluczowe znaczenie w regulacji dobowej rytmiki aktywności lokomotorycznej, gdyż usunięcie tej grupy komórek powoduje zanik rytmicznego behawioru. Z kolei neurony grzbietowe DN1, które mają połączenie synaptyczne z s-LNV, mogą być wyjściem z zegara do neuronów, które nie wchodzą w jego skład, ale mają wpływ na rytmikę dobową wielu procesów, m.in. snu (CAVANAUGH i współaut. 2014).

Neurony s-LNV wykazują zmiany morfologiczne w ciągu doby. Ich zakończenia aksonalne cyklicznie zmieniają wielkość i stopień rozgałęzienia wskazując, że w ciągu doby może się zmieniać liczba synaps i neuronów postsynaptycznych, z którymi kontaktują się s-LNV (FERNANDEZ i współaut. 2008, GOROSTIZA i współaut. 2014). Dobowa plastyczność synaps i morfologii neuronów występuje też w innych rejonach mózgu i dotyczy neuronów innych niż zegarowe. Po raz pierwszy okołodobową plastyczność neuronalną stwierdzono w układzie wzrokowym *Drosophila* i innych muchówek, co wskazuje na reorganizację strukturalną mózgu w ciągu doby (PYZA 2013, KRZĘPTOWSKI i współaut. 2018).

CHARAKTERYSTYKA SNU U *DROSOPHILA*

Sen u *Drosophila* został scharakteryzowany dopiero w 2000 r. (HENDRICKS i współaut. 2000, SHAW i współaut. 2000). W badaniach tych stwierdzono, że w ciągu doby muszki pozostają dłuższy czas w bezruchu i okres ten spełnia kryteria snu, ponieważ charakteryzuje się wyższym progiem pobudzenia, charakterystyczną postawą ciała oraz kompensacją po deprywacji. Pora snu regulowana jest przez zegar okołodobowy i u mutantów genów zegara, np. u mutantów *per⁰* sen ulega fragmentacji. Sen jest także regulowany homeostatycznie i po jego deprywacji niedobory snu wyrównywane są przez dłuższy sen w kolejnych dobach.

Chociaż u *Drosophila* nie występują fale mózgowe typowe dla stanu snu jak u ssaków, jednak zaobserwowano lokalne potencjały polowe w środkowej części mózgu (protocerebrum) oraz obniżenie aktywności neuronów w tzw. ciałach grzybkowatych, które są ośrodkami pamięci węchowej, ale zaangażowane są także w regulację snu (NITZ i współaut. 2002, BUSHEY i współaut. 2015). W wyniku deprywacji snu, u *Drosophila*, podobnie jak u ssaków, obserwuje się obniżenie zdolności do uczenia się i zapamiętywania. Na sen mają też wpływ czynniki środowiskowe, socjalne, a także stan fizjologiczny organizmu, infekcje i stres.

Sen u *Drosophila* definiowany jest jako okres bezruchu trwający przynajmniej 5 min i dzieli się na sen nocny, który występuje w środku nocy, oraz sen dzienny, zwany drzemką albo sjestą, który występuje w trakcie dnia i jest dłuższy u samców niż u samic (HUBER i współaut. 2004). Sen, podobnie jak aktywność lokomotoryczną, mierzy się przy użyciu systemu monitorującego DAMS (ang. *Drosophila* Activity Monitoring System). Aktywność owadów jest rejestrowana indywidualnie dla każdego owada, który, poruszając się w szklanej rurce, przecina wiązkę podczerwieni. Każde takie przejście jest komputerowo rejestrowane i przedstawiane w postaci aktogramów. Na podstawie uzyskanych danych można określić okresy aktywności, bezruchu, poziom aktywności, długość sjesty i snu w nocy oraz rytmikę dobową snu i aktywności. Stosuje się również rejestrację za pomocą kamery video, dzięki czemu można precyzyjnie zaobserwować zmiany w zachowaniu owada w ciągu doby.

Badania snu na *Drosophila* mają tę korzyść, że rejestrację snu i jego analizę można przeprowadzić u licznych mutantów i szczepów transgenicznych, które są dostępne, lub które można wygenerować. Użycie

specyficznych szczepów transgenicznych pozwala znakować fluorescencyjnie wybrane neurony [wprowadzenie do genomu genów innych organizmów kodujących białka fluorescencyjne, jak np. białko zielonej fluorescencji (GFP) meduzy *Aequorea victoria*], specyficznie je aktywować lub hamować (metoda optogenetyczna) czy usuwać (indukcja apoptozy), a także wywoływać wzrost ekspresji lub wyciszenie konkretnego genu (metoda UAS-GAL4). Dzięki zastosowaniu tych metod zidentyfikowano geny, których mutacja wpływa na długość snu lub na inne jego parametry. Na przykład, gen kodujący kanał potasowy *Shaker* (CIRELLI i współaut. 2005, BUSHEY i współaut. 2007) i jego modulator *sleepless* (KOH i współaut. 2008) odpowiedzialne są za skrócenie snu w nocy. Ponieważ *Shaker* koduje napięciowo zależny kanał potasowy, który powszechnie występuje w mózgu, ma on wpływ na regulację wielu procesów. W przypadku obu genów stwierdzono, że mogą wpływać na aktywność neuronów i metabolizm neuroprzekaźników, m.in. acetylocholiny i GABA. Inne neuroprzekaźniki zaangażowane w regulację snu i aktywności to histamina, która, razem z dopaminą i oktopaminą odpowiada za aktywność, oraz serotonina, które razem z GABA promują sen. Z kolei glutaminian ma podwójną funkcję w regulacji snu, aktywującą i hamującą.

OŚRODKI SNU U *DROSOPHILA*

W mózgu *Drosophila* wyróżniono rejony, które mają znaczenie w regulacji snu, tzw. ośrodki snu. Są one zlokalizowane w centralnej i grzbietowej części mózgu. Do najważniejszych struktur zaangażowanych w regulację snu należą: ciała grzybkowate (z ang. mushroom bodies, MB) oraz kompleks centralny (ang. central complex, CC), złożony z ciała elipsoidalnego (ang. ellipsoid body, EB) i ciała wachlarzowatego (ang. fan-shaped body, FB) (Ryc. 3).

Ciała grzybkowate tworzą płaty zawierające zarówno neurony promujące sen, jak i aktywność (JOINER i współaut. 2006, SITARAMAN i współaut. 2015, ARTIUSHIN i SEHGAL 2017). MB otrzymuje sygnały hamujące aktywność za pośrednictwem GABA i serotoniny (HAYNES i współaut. 2015, YUAN i współaut. 2006). Z kolei kompleks centralny otrzymuje hamujące sygnały z komórek dopaminergicznych, które promują aktywność (LIU i współaut. 2012, UENO i współaut. 2012, KAYSER i współaut. 2014, PIMENTEL i współaut. 2016, NI i współaut. 2019) oraz aktywujące z komórek zegara LPN (NI i współaut. 2019). Sygnały hamujące i aktywujące są precyzyjnie integrowane i w efek-

Ryc. 3 Główne ośrodki snu w mózgu *Drosophila melanogaster*.

cie aktywny CC za pośrednictwem GABA hamuje neurony oktopaminergiczne, promując sen (NI i współaut. 2019).

Głównym neurotransmiterem regulującym sen i promującym aktywność *Drosophila* jest dopamina. Mutanty genu *fumin*, kodującego transporter dopaminy, charakteryzują się bardzo krótkim snem, prawdopodobnie w wyniku wzrostu poziomu dopaminy w całym mózgu (KUME i współaut. 2005). Metamfetamina, która jest psychostymulantem u ssaków aktywującym układ dopaminergiczny, u *Drosophila* także działa pobudzająco (ANDRETIC i współaut. 2005). O roli kompleksu centralnego w regulacji snu świadczą też eksperymenty, w których aktywowano neurony w jego części zwanej ciałem wachlarzowatym. Ta stymulacja wydłużała sen u badanych owadów, a ponieważ deprivacja snu wpływała na aktywność tych neuronów, można wnioskować, że CC odpowiada za homeostatyczną regulację snu (DONLEA i współaut. 2011). Kompleks centralny, a zwłaszcza grzbietowa część ciała wachlarzowatego, może więc pełnić centralną funkcję w regulacji snu jako integrator informacji dochodzących z różnych rejonów mózgu, m.in. z różnych grup neuronów dopaminergicznych, jak również struktury przesyłającej informacje do ośrodków docelowych, w odpowiedzi na różne bodźce regulujące sen.

Komórki produkujące drugi z kluczowych neuroprzekaźników promujących aktywność – oktopamina, oprócz projekcji do ciał grzybkowatych, wysyła również zakończenia aksonalne do części kompleksu centralnego, protocerebrum, płatów wzrokowych oraz części neuroendokrynowej mózgu zwanej pars intercerebralis (PI), do neuronów produkujących peptyd insulinopodobny. PI jest owadziowym odpowiednikiem podwzgórza. Aktywacja neuronów oktopaminergicznych wywołuje wyjątkowo silny efekt hamujący sen, który nie jest kompensowany homeostatycznie.

Dodatkowo, w PI występują neurony produkujące inny neuropeptyd – SIFamid, który promuje sen (FOLTENYI i współaut. 2007, PARK i współaut. 2014).

W regulacji snu ważną rolę odgrywa również inna neuroendokrynowa struktura mózgu zwana *pars lateralis*, gdyż obniżenie aktywności regulatorów cyklu komórkowego w neuronach tej struktury wpływało na długość snu, silnie go skracając (ROGULJA i YOUNG 2012).

Z kolei neurony histaminergiczne u *Drosophila*, podobnie jak u ssaków, odpowiadają za pobudzenie (OH i współaut. 2013). Projekcje z tych neuronów dochodzą do rejonów brzuszno i bocznego protocerebrum mózgu *Drosophila* (NASSEL 1999), a antagonisty receptorów histaminowych, hydroksyzyna, opóźnia sen (SHAW i współaut. 2000), jednak efekt ten zależy tylko od jednego z receptorów – podjednostki kanałów chlorowych bramkowanych histaminą (HisCL1), nie jest natomiast zależny od receptorów Ort (OH i współaut. 2013). Histamina ma znaczenie w regulacji snu w dzień, gdyż obniżenie aktywności dekarboksylazy histydyny, głównego enzymu w metabolizmie histaminy wydłuża sjęstę.

Serotonina, która występuje prawie we wszystkich rejonach mózgu, promuje sen, gdyż podawanie jej prekursora, 5-hydroksytryptofanu, wydłuża sen u *Drosophila* i odpowiada za kompensację snu po jego deprywacji (YUAN i współaut. 2006). Również GABA promuje sen, a neurony produkujące GABA unerwiają wiele neuronów w całym mózgu. Podawanie agonistów receptora GABA-A wydłuża sen (DISSEL i współaut. 2015), a ponadto GABA odpowiedzialny jest za rozpoczęcie snu, co wskazuje na związek z regulacją snu przez zegar okołodobowy. Receptory GABA-A wykryto w neuronach zegara (PARISKY i współaut. 2008), a dodatkowo wykazano, że GABA hamuje aktywność l-LNV. Ponadto, GABA uwalniany z neuronów grzbietowej części mózgu (parzyste środkowe neurony grzbietowe, DPM) hamuje ciała grzybkowate, wydłużając sen.

W regulacji snu bierze udział też glutaminian i acetylocholina. Oba te neuroprzekazniki mają wpływ zarówno na aktywność, jak i na sen.

Na sen wpływają też czynniki środowiskowe i socjalne. Głód, czy inny stres silnie hamują sen i mechanizm tego zjawiska zależy od szlaków regulujących metabolizm. Ostatnio zidentyfikowano gen *translin*, którego wysoką ekspresję zaobserwowano po głodzeniu muszek, natomiast jego wyciszenie przeciwdziałało hamowaniu snu przez głód (MURAKAMI i współaut. 2016). Podobny efekt zaobserwowano po obniżeniu poziomu

leukokinin, peptydu syntetyzowanego przez niektóre neurony PI. Istnieje również ścisły związek pomiędzy snem a układem immunologicznym, który u *Drosophila* jest układem odporności wrodzonej. Brak snu powoduje wzrost poziomu czynników odpowiedzialnych za odporność, np. czynnika transkrypcyjnego RELISH (homolog NFκB u ssaków), którego poziom rośnie po deprywacji snu i który promuje sen (WILLIAMS i współaut. 2007).

REGULACJA SNU PRZEZ ZEGAR

Zegar okołodobowy wyznacza zarówno porę sjęsty, jak i snu w nocy. W tej regulacji snu przez zegar kluczowe znaczenie mają neurony zegara l-LNV, gdyż ich aktywność elektryczna zmienia się w ciągu doby, a manipulacje wywołujące zmiany aktywności, zwłaszcza w nocy, wpływają na sen i aktywność (CAO i NITABACH 2008; PARISKY i współaut. 2008; SHANG i współaut. 2008; SHEEBA i współaut. 2008a, b; LIU i ZHAO 2014). Ważną rolę w regulacji snu odgrywa neuropeptyd PDF, gdyż owady z mutacją *Pdf^o* i mutacją receptora *Pdfr* wykazywały zwiększony poziom snu w trakcie dnia (CHUNG i współaut. 2009), natomiast nadekspresja *Pdfr* skracala sjęstę (POTDAR i SHEEBA 2018). Neurony s-LNV regulują sen za pomocą PDF, który stymuluje aktywność neuronów w protocerebrum, wydzielających neuropeptyd allostatyne A (CHEN i współaut. 2016) oraz za pomocą sNPF (ang. short Neuropeptide F), który reguluje pracę l-LNV i odpowiada za stymulację snu w trakcie nocy (SHANG i współaut. 2013). Neurony DN1 z kolei dzielą się na populację promującą sen (a-DN1p) i promującą aktywność (vs-DN1p) (GUO i współaut. 2018, LAMAZE i współaut. 2018).

Geny zegara, które są aktywne o różnych porach doby; *per* i *tim* na końcu dnia i na początku nocy, a *Clk* i *cyc* na początku dnia, wpływają bezpośrednio na sen, ponieważ zaobserwowano, że u mutantów *Clk* i *cyc* sen wydłużał się, natomiast u mutantów *per* i *tim* skracał (LIU i wsp. 2014).

ROLA KOMÓREK GLEJOWYCH W REGULACJI SNU

Komórki glejowe przez długi czas były traktowane jako dodatkowe elementy układu nerwowego wspomagające neurony, zarówno w czasie rozwoju układu nerwowego, jak również w dorosłym mózgu, jako komórki odżywiające neurony i usuwające zbędne produkty. Obecnie wiadomo, że komórki glejowe pełnią kluczową rolę w wielu procesach w układzie nerwowym, a ich liczba w mózgu rośnie w rozwoju ewolucyjnym układu nerwowego wraz ze stopniem komplikacji

mózgu. U *D. melanogaster* jest ich mniej niż neuronów w mózgu, ale u ssaków ich liczba przewyższa liczbę neuronów. Wśród komórek glejowych, zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców, można wyróżnić kilka typów wyspecjalizowanych w różnych funkcjach. Mają one również swój udział w regulacji rytmów okołodobowych, a te które zaangażowane są w ten proces, wykazują cykliczną ekspresję genów zegara i zwane są oscylatorami glejowymi. Po zablokowaniu funkcji wszystkich neuronów zegara, oscylatory glejowe mogą utrzymać słaby rytm aktywności lokomotorycznej (EWER i współaut. 1992).

Nasze badania wykazały, że komórki glejowe aktywne są w nocy i mogą regulować aktywność neuronów w całym mózgu, również odpowiedzialnych za różne funkcje, m.in. sen (PYZA i GÓRSKA-ANDRZEJAK 2004, WALKOWICZ i współaut. 2017). Kluczową rolę w tym procesie odgrywają oscylatory glejowe, które synchronizowane są przez zegar nadrzędny oraz dobowe zmiany światła. W komórkach glejowych, podobnie jak w neuronach, występuje rytmika ekspresji wielu genów, a także dobowe zmiany poziomu białek, np. podjednostki regulatorowej a pompy sodowo-potasowej, czy enzymów odpowiedzialnych za metabolizm neuroprzekazników (GÓRSKA-ANDRZEJAK i współaut. 2009; DAMULEWICZ i współaut. 2013, 2015).

Komórki glejowe w mózgu *Drosophila* dzielą się na kilka głównych typów: 1) glej powierzchniowy (perineurium i subperineurium), który otacza mózg i stanowi barierę hemolimfa-mózg, 2) glej korowy, 3) glej neuropilu, w którego skład wchodzi komórki podobne do astrocytów (ang. astrocyte-like glial cells, AIGL) i komórki występujące na powierzchni neuropilu (ang. ensheathing glia, EnGl) oraz 4) glej peryferyjny okrywający aksony neuronów sensorycznych i motorycznych. Oprócz pełnienia różnych funkcji, komórki glejowe - oscylatory wykazują też różny poziom białka PER. Najwyższy poziom zaobserwowano w komórkach glejowych sąsiadujących z zakończeniami neuronów zegara l-LNv w układzie wzrokowym (KRZEPITOWSKI i współaut. 2018).

W komórkach glejowych w mózgu wykryto wysoki poziom czynnika neurotroficznego zwanego śródmózgowym czynnikiem wzrostu astrocytów (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF), który jest homologiem MANF obecnego w mózgu ssaków. MANF w mózgu ssaków odpowiedzialny jest m.in. za hamowanie degeneracji neuronów dopaminergicznych (LINDHOLM i SARMA 2010, PALGI i współaut. 2009). MANF u *D. melanogaster* (DmMANF) występuje w niewielkiej ilości w neuronach (w ciałach komórkowych), natomiast jego wysoki po-

ziom utrzymuje się w komórkach glejowych, zwłaszcza w AIGL i EnGL. Obniżenie lub podwyższenie poziomu DmMANF w tych komórkach glejowych zaburza sen w dzień i w nocy (WALKOWICZ i współaut. 2017). Z kolei obniżenie poziomu DmMANF we wszystkich komórkach glejowych nie tylko skraca sen w nocy, ale także długość życia muszek (WALKOWICZ i współaut. 2017). Obniżenie poziomu innych białek kluczowych dla funkcjonowania komórek glejowych również powoduje zaburzenia długości snu. Dla przykładu, wyciszenie ekspresji genu *Appl*, kodującego białko Amyloid Precursor Protein Like (APPL) w komórkach gleju astrocytarnego, wydłuża czas snu w nocy przez wpływ na szlak regulujący sygnalizację glutaminergiczną (FARCA LUNA i współaut. 2017). Również obniżenie poziomu białka Eiger (EGR), będącego odpowiednikiem ssaczego TNF α , oraz jego receptora, Wengen, powoduje skrócenie czasu snu (VANDERHEYDEN i współaut. 2018).

PODSUMOWANIE

Sen u *D. melanogaster* wykazuje wiele podobieństw do snu ssaków, nie tylko posiada cechy typowe dla tego stanu (z wyjątkiem fal mózgowych), jak wyższa konsolidacja snu w nocy, wyższy próg pobudzenia w czasie snu, ale również podobne mechanizmy regulacji przez neuroprzekazniki i ich receptory. Również substancje chemiczne promujące sen lub czuwanie działają podobnie u ssaków i *Drosophila* i dotyczy to nie tylko metamfetaminy, ale również kofeiny i modafinilu. Podobna jest też funkcja snu, gdyż jego brak wywołuje zaburzenia pamięci i uczenia się. Dlatego też badania snu u muszki *D. melanogaster* mogą przynieść nowe odkrycia dotyczące regulacji i funkcji snu na poziomie komórkowym w układzie nerwowym oraz połączeń synaptycznych pomiędzy neuronami, przy udziale komórek glejowych.

Streszczenie

Sen zarówno u *Drosophila*, jak i u ssaków jest regulowany przez zegar okołodobowy i procesy homeostaticzne, szczególnie po okresie jego deprywacji. Funkcja snu jest podobna u różnych organizmów, jego brak wpływa na uczenie się i pamięć, a także na procesy metaboliczne i rozwój. Główny oscylator zegara okołodobowego u muszki owocowej zlokalizowany jest w mózgu i składa się ze 150 neuronów, a niektóre z nich kontaktują się z neuronami tworzącymi ośrodki snu w ciałach grzybkowatych i kompleksie centralnym mózgu. W regulacji procesu snu i czuwania kluczową rolę odgrywają neurotransmitery, takie jak dopamina, oktopamina, serotonina, GABA i acetylocholina. W procesach regulacji snu dużą rolę odgrywają również komórki glejowe, szczególnie te, w których zlokalizowane są oscylatory peryferyczne.

LITERATURA

- ANDRETIC R., VAN SWINDEREN B., GREENSPAN R. J., 2005. *Dopaminergic modulation of arousal in Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1165-1175.
- ARTIUSHIN G., SEHGAL A., 2017. *The Drosophila circuitry of sleep-wake regulation*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 44, 243-250.
- BAE K., EDERY I., 2006. *Regulating a circadian clock's period, phase and amplitude by phosphorylation: Insights from Drosophila*. *J. Biochem.* 140, 609-617.
- BENNA C., BONACCORSI S., WULBECK C., HELFRICH-FORSTER C., GATTI M., KYRIACOU C. P., COSTA R., SANDRELLI F., 2010. *Drosophila timeless2 is required for chromosome stability and circadian photoreception*. *Curr. Biol.* 20, 346-352.
- BERNDT A., KOTTKE T., BREITKREUZ H., DVORSKY R., HENNIG S., ALEXANDER M., WOLF E., 2007. *A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor Drosophila cryptochrome*. *J. Biol. Chem.* 282, 13011-13021.
- BUSHEY D., HUBER R., TONONI G., CIRELLI C., 2007. *Drosophila Hyperkinetic mutants have reduced sleep and impaired memory*. *J. Neurosci.* 27, 5384-5393.
- BUSHEY D., TONONI G., CIRELLI C., 2015. *Sleep- and wake-dependent changes in neuronal activity and reactivity demonstrated in fly neurons using in vivo calcium imaging*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 4785-4790.
- CAO G., NITABACH M. N., 2008. *Circadian control of membrane excitability in Drosophila melanogaster lateral ventral clock neurons*. *J. Neurosci.* 28, 6493-6501.
- CAVANAUGH D.J., GERATOWSKI J.D., WOOLTORTON J. R. A., SPAETHLING J.M., HECTOR C. E., ZHENG X., JOHNSON E. C., EBERWINE J. H., SEHGAL A., 2014. *Identification of a circadian output circuit for rest:activity rhythms in Drosophila*. *Cell* 157, 689-701.
- CERIANI M. F., DARLINGTON T. K., STAKNIS D., MAS P., PETTI A. A., WEITZ C. J., KAY S. A., 1999. *Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME*. *Science* 285, 553-556.
- CHEN J., REIHER W., HERMANN-LUIBL C., SELAMI A., COGNIGNI P., KONDO S., HELFRICH-FORSTER C., VEENSTRA J. A., WEGENER C., 2016. *Allatostatin a signalling in Drosophila regulates feeding and sleep and is modulated by PDF*. *PLoS Genet.*, doi:10.1371/journal.pgen.1006346
- CHUNG B. Y., KILMAN V. L., KEATH J. R., PITMAN J. L., ALLADA R., 2009. *The GABAA receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in Drosophila*. *Curr. Biol.* 19, 386-390.
- CIRELLI C., BUSHEY D., HILL S., HUBER R., KREBER R., GANETZKY B., TONONI G., 2005. *Reduced sleep in Drosophila Shaker mutants*. *Nature* 434, 1087-1092.
- DAMULEWICZ M., ROSATO E., PYZA E., 2013. *Circadian regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit in the visual system is mediated by the pacemaker and by retina photoreceptors in Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 8, e73690.
- DAMULEWICZ M., ŁOBODA A., BUKOVSKA-STRAKOVA K., JÓZKOWICZ A., DULAK J., PYZA E., 2015. *Clock and clock-controlled genes are differentially expressed in the retina, lamina and in selected cells of the visual system of Drosophila melanogaster*. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 353.
- DEBOER T., 2013. *Behavioral and electrophysiological correlates of sleep and sleep homeostasis*. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 25, 1-24.
- DISSEL S., ANGADI V., KIRSZENBLAT L., SUZUKI Y., DONLEA J., KLOSE M., KOCH Z., ENGLISH D., WINSKY-SOMMERER R., VAN SWINDEREN B., SHAW P. J., 2015. *Sleep restores behavioral plasticity to drosophila mutants*. *Curr. Biol.* 25, 1270-1281.
- DONLEA J. M., THIMGAN M. S., SUZUKI Y., GOTTSCHALK L., SHAW P. J., 2011. *Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in Drosophila*. *Science* 332, 1571-1576.
- EWER J., FRISCH B., HAMBLIN-COYLE M. J., ROSBASH M., HALL J. C., 1992. *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.* 12, 3321-3349.
- FARCA LUNA A. J., PERIER M., SEUGNET L., 2017. *Amyloid precursor protein in Drosophila glia regulates sleep and genes involved in glutamate recycling*. *J. Neurosci.* 37, 4289-4300.
- FERNANDEZ M. P., BERNI J., CERIANI M. F., 2008. *Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior*. *PLoS Biol.* 6, 0518-0524.
- FOLTENYI K., GREENSPAN R. J., NEWPORT J. W., 2007. *Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 10, 1160-1167.
- GOROSTIZA E. A., DEPETRIS-CHAUVIN A., FRENKEL L., PIREZ N., CERIANI M. F., 2014. *Circadian pacemaker neurons change synaptic contacts across the day*. *Curr. Biol.* 24, 2161-2167.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., SALVATERRA P. M., MEINERTZHAGEN I. A., KRZEPROWSKI W., GÖRLICH A., PYZA E., 2009. *Cyclical expression of Na⁺/K⁺-ATPase in the visual system of Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 55, 459-468.
- GRIMA B., CHELOT E., XIA R., ROUYER F., 2004. *Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain*. *Nature* 431, 869-873.
- GUO F., HOLLA M., DIAZ M. M., ROSBASH M., 2018. *A circadian output circuit controls sleep-wake arousal in Drosophila*. *Neuron* 100, 624-635.
- HARDIN P. E., 2005. *The circadian timekeeping system of Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, R714-R722.
- HARDIN P. E., HALL J. C., ROSBASH M., 1990. *Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels*. *Nature* 116, 5721-5726.
- HAYNES P. R., CHRISTMANN B. L., GRIFFITH L. C., 2015. *A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in Drosophila melanogaster*. *eLife*. doi:10.7554/eLife.03868.
- HENDRICKS J. C., FINN S. M., PANCKERI K. A., CHAVKIN J., WILLIAMS J. A., SEHGAL A., PACK A. I., 2000. *Rest in Drosophila is a sleep-like state*. *Neuron* 25, 129-138.
- HOUL J. H., YU W., DUDEK S. M., HARDIN P. E., 2006. *Drosophila CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells*. *J. Biol. Rhythms* 21, 93-103.
- HUBER R., HILL S. L., HOLLADAY C., BIESIADECKI M., TONONI G., CIRELLI C., 2004. *Sleep homeostasis in Drosophila melanogaster*. *Sleep* 27, 628-639.
- HUNTER-ENSOR M., OUSLEY A., SEHGAL A., 1996. *Regulation of the Drosophila protein timeless*

- suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 84, 677-685.
- JOINER W. J., CROCKER A., WHITE B. H., SEHGAL A., 2006. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature*. 441, 757-760.
- KADENER S., STOLERU D., MCDONALD M., NAWATHEAN P., ROSBASH M., 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Develop.* 21, 1675-1686.
- KAYSER M. S., YUE Z., SEHGAL A., 2014. A critical period of sleep for development of courtship circuitry and behavior in *Drosophila*. *Science* 344, 269-274.
- KLOSS B., PRICE J. L., SAEZ L., BLAU J., ROTHENFLUH A., WESLEY C. S., YOUNG M. W., 1998. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase 1 ϵ . *Cell* 94, 97-107.
- KOH K., JOINER W. J., WU M. N., YUE Z., SMITH C. J., SEHGAL A., 2008. Identification of SLEEPLESS, a Sleep-Promoting Factor. *Science* 321, 372-376.
- KONOPKA R. J., BENZER S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2112-2116.
- KRZEPTOWSKI W., WALKOWICZ L., PLONCZYNSKA A., GORSKA-ANDRZEJAK J., 2018. Different levels of expression of the clock protein PER and the glial marker REPO in ensheathing and astrocyte-like glia of the distal medulla of *drosophila* optic lobe. *Front. Physiol.*, doi:10.3389/fphys.2018.00361.
- KUMAR S., CHEN D., JANG C., NALL A., ZHENG X., SEHGAL A., 2014. An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila*. *Nat. Comm.*, doi:10.1038/ncomms6697
- KUME K., KUME S., PARK S. K., HIRSH J., JACKSON F. R., 2005. Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J. Neurosci.* 25, 7377-7384.
- LAMAZE A., KRATSCHMER P., CHEN K. F., LOWE S., JEPSON J. E. C., 2018. A wake-promoting circadian output circuit in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 28, 3098-3105.
- LEE C., PARIKH V., ITSUKAICHI T., BAE K., EDERY I., 1996. Resetting the *drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science* 271, 1740-1744.
- LEE C., BAE K., EDERY I., 1999. 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.* 19, 5316-5325.
- LIM C., AALLADA R., 2013. ATAXIN-2 activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in *Drosophila*. *Science* 66, 129-140.
- LIM C., CHUNG B. Y., PITMAN J. L., MCGILL J. J., PRADHAN S., LEE J., KEEGAN K. P., CHOE J., ALLADA R., 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology*. 17, 1082-1089.
- LIM C., LEE J., CHOI C., KILMAN V. L., KIM J., PARK S. M., JANG S. K., ALLADA R., CHOE J., 2011. The novel gene twenty-four defines a critical translational step in the *Drosophila* clock. *Nature* 470, 399-403.
- LINDHOLM P., SAARMA M., 2010. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Develop. Neurobiol.* 70, 360-371.
- LING J., DUBRUILLE R., EMERY P., 2012. KAYAK-a modulates circadian transcriptional feedback loops in *Drosophila* pacemaker neurons. *J. Neurosci.* 32, 16959-16970.
- LIU Q., LIU S., KODAMA L., DRISCOLL M. R., WU M. N., 2012. Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 22, 2114-2123.
- LIU Z., ZHAO Z., 2014. Effects of light interruption on sleep and viability of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0105678.
- MATSUMOTO A., UKAI-TADENUMA M., YAMADA R. G., HOUL J., UNO K. D., KASUKAWA T., DAUWALDER B., ITOH T. Q., TAKAHASHI K., UEDA R., HARDIN P. E., TANIMURA T., UEDA H. R., 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Develop.* 21, 1687-1700.
- MURAKAMI K., YURGEL M. E., STAHL B.A., MASEK P., MEHTA A., HEIDKER R., BOLLINGER W., GINGRAS R. M., KIM Y. J., JA W. W., SUTER B., DIANGELO J. R., KEENE A. C., 2016. Translin is required for metabolic regulation of sleep. *Curr. Biol.* 26, 972-980.
- MYERS M. P., WAGER-SMITH K., ROTHENFLUH-HILFIKER A., YOUNG M. W., 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 271, 1736-1740.
- NASSEL D. R., 1999. Histamine in the brain of insects: A review. *Microsc. Res. Tech.* 44, 121-136.
- NI J. D., GURAV A. S., LIU W., OGUNMOWO T. H., HACKBART H., ELSHEIKH A., VERDEGAAL A. A., MONTELL C., 2019. Differential regulation of the *drosophila* sleep homeostat by circadian and arousal inputs. *eLife*, doi:10.7554/eLife.40487.
- NITZ D. A., VAN SWINDEREN B., TONONI G., GREENSPAN R. J., 2002. Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 12, 1934-1940.
- OH Y., JANG D., SONN J. Y., CHOE J., 2013. Histamine-HisCl1 Receptor Axis Regulates Wake-Promoting Signals in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0068269.
- OZTURK N., SELBY C. P., ANNAYEV Y., ZHONG D., SANCAR A., 2011. Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 516-521.
- PALGI M., LINDSTROM R., PERANEN J., PIEPPONEN T. P., SAARMA M., HEINO T. I., 2009. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2429-2434.
- PARISKY K. M., AGOSTO J., PULVER S. R., SHANG Y., KUKLIN E., HODGE J. J. L., KANG K., LIU X., GARRITY P. A., ROSBASH M., GRIFFITH L. C., 2008. PDF Cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* 60, 672-682.
- PARK S., ALFA R. W., TOPPER S. M., KIM G. E. S., KOCKEL L., KIM S. K., 2014. A genetic strategy to measure circulating *Drosophila* insulin reveals genes regulating insulin production and secretion. *PLoS Genet.*, doi:10.1371/journal.pgen.1004555.
- PIMENTEL D., DONLEA J. M., TALBOT C. B., SONG S. M., THURSTON A. J. F., MIESENBOCK G., 2016. Operation of a homeostatic sleep switch. *Nature* 536, 333-337.
- POTDAR S., SHEEBA V., 2018. Wakefulness is promoted during day time by PDFR signaling to dopaminergic neurons in *Drosophila*

- melanogaster*. eNeuro, doi:10.1523/ENEURO.0129-18.2018.
- PRICE J. L., BLAU J., ROTHENFLUH A., ABODEELY M., KLOSS B., YOUNG M. W., 1998. *Double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates period protein accumulation*. Cell 94, 83-95.
- PYZA E. M., 2013. *Plasticity in invertebrate sensory systems*. Front Physiol. 4, doi: 10.3389/fphys.2013.00226.
- PYZA E., GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2004. *Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the housefly's visual system*. J. Neurobiol. 59, 205-215.
- RICHER B., MICHARD-VANHEE C., LAMOROUX A., PAPIN C., ROUYER F., 2008. *The clockwork orange Drosophila protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression*. J. Biol. Rhythms 23, 103-116.
- ROGULJA D., YOUNG M. W., 2012. *Control of sleep by cyclin A and its regulator*. Science. 335, 1617-1621.
- SEHGAL A., PRICE J. L., MAN B., YOUNG M. W., 1994. *Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless*. Science 263, 1603-1606.
- SHANG Y., GRIFFITH L. C., ROSBASH M., 2008. *Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the Drosophila brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 19587-19594.
- SHANG Y., DONELSON N. C., VECSEY C. G., GUO F., ROSBASH M., GRIFFITH L. C., 2013. *Short neuropeptide f is a sleep-promoting inhibitory modulator*. Neuron. 209, 815-828.
- SHAW P. J., CIRELLI C., GREENSPAN R. J., TONONI G., CAMPBELL S. S., TOBLER I., ZEPPELIN H., RECHTSCHAFFEN A., TOBLER I., STALDER J., TOBLER I., NEUNER-JEHLE M., KAISER W., i współaut., 2000. *Correlates of sleep and waking in Drosophila melanogaster*. Science 287, 1834-1837.
- SHEEBA V., FOGLE K. J., KANEKO M., RASHID S., CHOU Y. T., SHARMA V. K., HOLMES T. C., 2008a. *Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in Drosophila*. Curr. Biol. 18, 1537-1545.
- SHEEBA V., GU H., SHARMA V. K., O'DOWD D. K., HOLMES T. C., 2008b. *Circadian- and light-dependent regulation of resting membrane potential and spontaneous action potential firing of Drosophila circadian pacemaker neurons*. J. Neurophysiol. 99, 976-988.
- SHEEBA V., FOGLE K. J., HOLMES T. C., 2010. *Persistence of morning anticipation behavior and high amplitude morning startle response following functional loss of small ventral lateral neurons in drosophila*. PLoS One 5, doi:10.1371/journal.pone.0011628.
- SITARAMAN D., ASO Y., RUBIN G. M., NITABACH M. N., 2015. *Control of sleep by dopaminergic inputs to the drosophila mushroom body*. Front. Neural Circuits, doi:10.3389/fn-cir.2015.00073.
- STOLERU D., PENG Y., AGOSTO J., ROSBASH M., 2004. *Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of Drosophila*. Nature. 431, 862-868.
- TAYLOR P., HARDIN P. E., 2008. *Rhythmic E-box binding by CLK-CYC controls daily cycles in per and tim transcription and chromatin modifications*. Mol. Cell. Biol. 28, 4642-4652.
- UENO T., TOMITA J., TANIMOTO H., ENDO K., ITO K., KUME S., KUME K., 2012. *Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in Drosophila*. Nat. Neurosci. 15, 1516-1523.
- VAN GELDER R. N., 2002. *Tales from the cryptochromes*. J. Biol. Rhythms 17, 110-120.
- VANDERHEYDEN W. M., GOODMAN A. G., TAYLOR R. H., FRANK M. G., VAN DONGEN H. P. A., GERSTNER J. R., 2018. *Astrocyte expression of the Drosophila TNF-alpha homologue, Eiger, regulates sleep in flies*. PLoS Genet., doi:10.1371/journal.pgen.1007724.
- VANVICKLE-CHAVEZ S. J., VAN GELDER R. N., 2007. *Action spectrum of Drosophila cryptochrome*. J. Biol. Chem. 282, 10561-10566.
- WALKOWICZ L., KIJAK E., KRZEPTOWSKI W., GÓRSKA-ANDRZEJAK J., STRATOULIAS V., WOZNICKA O., CHWASTEK E., HEINO T. I., PYZA E. M., 2017. *Downregulation of DmMANF in glial cells results in neurodegeneration and affects sleep and lifespan in Drosophila melanogaster*. Front. Neurosci., doi:10.3389/fnins.2017.00610.
- WILLIAMS J. A., SATHYANARAYANAN S., HENDRICKS J. C., SEHGAL A., 2007. *Interaction between sleep and the immune response in Drosophila: A role for the NFκB relish*. Sleep 30, 389-400.
- YU W., ZHENG H., HOUL J. H., DAUWALDER B., HARDIN P. E., 2006. *PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription*. Genes Develop. 20, 723-733.
- YU Y., DONG W., ALTIMUS C., TANG X., GRIFFITH J., MORELLO M., DUDEK L., ARNOLD J., SCHUTTLER H. B., 2007. *A genetic network for the clock of Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 2809-2814.
- YUAN Q., JOINER W. J., SEHGAL A., 2006. *A sleep-promoting role for the Drosophila serotonin receptor 1A*. Curr. Biol. 16, 1051-1062.
- ZENG H., HARDIN P. E., ROSBASH M., 1994. *Constitutive overexpression of the Drosophila period protein inhibits period mRNA cycling*. EMBO J. 13, 3590-3598.

KOSMOS Vol. 69, 3, 403–413, 2020

ELŻBIETA PYZA, MILENA DAMULEWICZ

*Department of Cell Biology and Imaging, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, 9 Gronostajowa Str.,
Kraków, E-mail: elzbieta.pyza@uj.edu.pl, milena.damulewicz@uj.edu.pl*

MECHANISMS OF SLEEP REGULATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Summary

In both *Drosophila* and mammals, sleep is regulated by the circadian clock and homeostatic processes, especially after deprivation. Its function is also similar in different organisms, since the lack of sleep affects learning and memory but also development and metabolic processes. The circadian clock, the pacemaker in the brain, is composed of 150 neurons and some of them contact sleep regulating neurons located in mushroom bodies, a center of olfaction memory, and in the central complex. Wake or sleep promoting neurons are regulated by several neurotransmitters, and among them dopamine and octopamine promote wake, serotonin and GABA promote sleep, while glutamine and acetylcholine have dual function. Besides neurons, also glial cells are important in sleep regulation, especially those expressing clock genes, so-called glial oscillators.

Key words: circadian clock, glial cells, homeostatic regulation of sleep