

Relojes Circadianos y Premio Nobel: hora de tomarse unos minutos para hablar de ritmos biológicos

Luis F. Larrondo¹

Fecha de envío: 30 de noviembre de 2017 - Fecha de aceptación: 31 de diciembre de 2017

Como todos los años, cerca de principios de octubre se conoció la identidad de los recipientes de los premios Nobel. El 2017, el Nobel en Fisiología o Medicina fue compartido por los científicos Jeff Hall, Michael Rosbash y Michael Young por sus contribuciones en develar los mecanismos moleculares que controlan los ritmos circadianos. ¡Ya era hora! (Dibner & Schibler, 2017).

Estas breves páginas no aspiran a entregar una revisión exhaustiva de lo que son los relojes circadianos, o enumerar los aportes científicos de estos investigadores. Por el contrario, este artículo solo pretende despertar en el lector la curiosidad de revisar literatura especializada e informarse más del tema. Razones hay de sobra.

Chile tuvo la suerte de ser, en noviembre del 2017, la sede del *XIV Latin American Symposium on Chronobiology* (Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, 2017), reunión bianual que por primera vez tocaba suelo nacional y que tuvo entre sus expositores centrales al recién premiado Michael Rosbash (Rosbash, 2017a, b).

Tal como indicó Rosbash en su charla pública, los ritmos circadianos son adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento en respuesta a las oscilaciones diarias producto de la constante rotación de nuestro planeta. Estos ritmos surgen como una forma de permitir a los organismos anticipar los cambios ambientales proveyendo ventajas adaptativas, y entregar coherencia a los procesos internos, de manera que distintos eventos metabólicos puedan ocurrir en orden, y no todos de manera simultánea o desordenada (Rosbash, 2009; Dibner & Schibler, 2017).

Desde el punto de vista evolutivo, los ritmos circadianos emergieron de forma temprana, aún antes de que nuestra atmósfera tuviera su composición actual. De hecho, uno de los relojes más antiguos que conocemos está presente en cianobacterias, organismos que fueron

fundamentales en permitir la oxigenación de la tierra, y donde la regulación circadiana fue clave para organizar temporalmente en estos microorganismos la producción de oxígeno (que ocurría en presencia de luz, vale decir, de día) separándola de otros procesos que necesitan ocurrir en condiciones reductoras, y que empezaron así a ser programados para la noche (Rosbash, 2009).

Pero dichos relojes no están solo limitados a cianobacterias, sino que se encuentran en plantas, hongos y en animales. Lo más interesante es que la evidencia sugiere que los relojes circadianos, como los conocemos, no habrían emergido de un ancestro común, sino que habrían aparecido de forma independiente en estas distintas ramas, lo que grafica la potente contribución al *fitness* que otorgan a la biología de los organismos (Dunlap, 1999; Rosbash, 2009).

Una visión de sistemas simple acerca de los relojes circadianos ayuda a separar los conceptos de señales de *input* (luz y temperatura) que permiten entrenar estos relojes a exactamente 24 h, mientras que el *output*, algo así como las manecillas del reloj, comprenden las manifestaciones perceptibles, ya sea desde el punto de vista macro (*i.e.*, ciclos de sueño vigilia), o molecular (cambios diarios en la expresión de genes, oscilaciones en los niveles de hormonas y metabolitos, etc.). Conectando *input* y *output* es como se encuentra el "marcapaso" o los engranajes que dan vida a la compleja maquinaria molecular circadiana que permite que existan estos ritmos diarios. El poder dilucidar cuáles eran dichos componentes y cómo funcionaban fue justamente el eje central de la contribución de estos científicos y tema central de la charla de Rosbash en nuestro país, así como en su charla magistral del Nobel (Rosbash, 2017a).

Pero antes de entrar a describir aspectos moleculares y fisiológicos de los relojes circadianos, es importante detenerse a comentar la etimología de "circadiano" (del latín *circa*, 'alrededor de' y *dies*, 'día'),

(1) Millennium Institute for Integrative Systems and Synthetic Biology, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

*Autor de correspondencia: llarrondo@bio.puc.cl



ya que revela un aspecto fundamental de cómo funcionan estos. Así, en distintos organismos, en condiciones ambientales invariables (por ejemplo, oscuridad constante), estos relojes manifiestan su periodo endógeno o *free-running*, que es cercano, pero no exactamente 24 h. Por ejemplo, en humanos el periodo endógeno es cerca de 24.5 h, lo que implica que, si un individuo se encuentra en un subterráneo, privado de luz natural y de señal temporales, su secuencia rítmica endógena se verá desplazada diariamente en cerca de 30 min comparada con sus congéneres que están en la superficie. Así, luego de 24 días, cuando él esté listo para tomar desayuno bajo tierra, afuera la gente estará preparándose para cenar. Son entonces justamente las señales ambientales (luz) que ayudan a que el reloj todos los días se entrene exactamente a ciclos de 24 h (Dunlap, 1999).

¿Cómo es que llegamos a conocer el funcionamiento de los relojes circadianos? Casi como todos los grandes avances en las ciencias biológicas y biomédicas, esto fue posible gracias a estudios realizados en organismos modelos. En particular, estudios realizados en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* abrieron paso a la “era molecular” de la descripción de los relojes circadianos (Dunlap, 2008). Trabajos posteriores en ratón y hámster permitieron avanzar en dichos conceptos, haciendo su caracterización más fácil en humanos.

A pesar de contribuciones importantes realizadas en los distintos modelos por diversos colegas, este Nobel se concentra solo en la investigación desarrollada por Young, Rosbash y Hall en *D. melanogaster*. Así, ellos fueron capaces de continuar el trabajo originado en el laboratorio de Seymour Benzer en 1971, acerca de moscas mutantes que mostraban periodos más rápidos (19 h) o más lentos (28 h) en actividad locomotora y en eclosión, logrando identificar cuál era el gen mutado (Konopka & Benzer, 1971). Dicho gen, bautizado como *period* (*per*), hace clara alusión a que mutaciones en su secuencia podían cambiar el periodo del reloj, o inclusive llevar a completa falta de ritmo. Sin embargo, hacia mediados de los ochenta no eran muchos los genes que se encontraban secuenciados, por lo que al comparar PERIOD con datos de proteínas conocidas, no fue posible dilucidar un potencial mecanismo. Así, durante varios años se trabajó en pasar de secuencia a mecanismo hasta que el 1990 la evidencia molecular reveló que PER estaba involucrado en un *feedback loop* de retroalimentación negativa: vale decir que el producto del gen *period* (la proteína PER), al ser producida, era luego capaz de inhibir su propia expresión. Esto se podía evidenciar como ritmos diarios en los niveles del mRNA de *per* (y también de proteína), ritmos que mostraban un menor periodo entre pico y pico de dichas oscilaciones, si es que su análisis se hacía en una mosca mutante (*per^s* por *per short*), o un periodo más largo, si se trataba de una mosca mutante con un reloj más lento (Young, 2000b).

Luego venía el otro gran desafío: explicar cómo el circuito de retroalimentación antes mencionado permitía generar estos ritmos, y entender cómo una mutación que cambiaba solo un aminoácido podía alterar el periodo en varias horas. Piezas del puzzle fueron agregándose cuando los datos revelaron que las oscilaciones en el mRNA de *per* eran reguladas de forma transcripcional, abriéndose oficialmente la temporada de caza para atrapar los factores de transcripción (TF) responsables de controlar su expresión. Esta cacería llevó a identificar CYCLE y CLOCK, los TF dedicados a regular positivamente la expresión de *per*, permitiendo cerrar el círculo de lo que conocemos como “feedback loop transcripcional traduccional negativo” o TTFL por sus siglas en inglés. Así, un activador (complejo CYCLE-CLOCK) controla la expresión de un represor (PER), cuyos niveles van aumentando hasta que es capaz de interactuar con el activador en el núcleo, inhibiéndolo y apagando la expresión del represor. Cuando esto ocurre, tanto el mRNA de *per* como la proteína empiezan a decaer y desaparecer, hasta que la inhibición sobre el activador desaparece. Aunque en general esto parece simple, es mucho más complejo. Por ejemplo, PER no actúa solo, sino que su función como elemento negativo es junto a la proteína TIMELESS (TIM). Por otra parte, hay una serie de cambios postraduccionales (tales como fosforilaciones) en PER, que son fundamentales para controlar su capacidad de entrar al núcleo junto a TIM, y de inhibir CYCLE/CLOCK. A su vez, estas fosforilaciones impactan sucesivas fosforilaciones, y en conjunto controlan la vida media de PER. Así, mutaciones que afectan algunos de estos sitios que son fosforilados pueden impactar fuertemente el periodo. De esta manera, no es sorprendente que, en la búsqueda de mutantes con periodo alterado, el laboratorio de Michael Young identificara el gen *doubletime* (*dbt*), aislando mutaciones que causaban una disminución o aumento del periodo. De esta forma, la secuenciación de *dbt* permitió involucrar formalmente a Caseína Quinasa 1 (CK1) como una proteína central en permitir controlar el correcto funcionamiento del reloj (Young, 2000a; Allada *et al.*, 2001). CK1 es una quinasa sumamente conservada entre organismos, con una larga lista de proteínas blanco y que, además, juega un rol clave en la regulación de cómo funciona un reloj circadiano, controlando eventos de fosforilación en PER. Lo más sorprendente es concebir que, como se mencionó anteriormente, los componentes del reloj son distintos en hongos que en moscas y también entre estos dos últimos y mamíferos. Sin embargo, la lógica de diseño en todos estos organismos sigue la del TTFL antes descrito y también involucra quininas, donde los homólogos de DBT (CK1) son también centrales. Sin duda, un increíble ejemplo de evolución convergente (Rosbash, 2009).

Un dato anecdótico, pero clave, es que los laboratorios de Michael Rosbash y Jeff Hall, ambos en Brandeis University (Boston) empezaron a trabajar conjuntamente en definir los mecanismos

moleculares del reloj circadiano en *Drosophila* (Rosbash, 2017b). Esta colaboración permitió combinar exitosamente los conocimientos de genética clásica y neurogenética de Jeff Hall, y la experiencia en expresión génica y biología molecular de Rosbash, para lograr clonar *per* y postular un mecanismo de retroalimentación negativa basado en transcripción-traducción.

Por otra parte, y casi de forma simultánea, en 1984 Michael Young, en Rockefeller University, no solo también clonaba *per*, sino que luego en 1994 identificaba *timeless*, para luego mostrar, como ya se mencionó, que dicho producto génico se asocia a PER, para poder ambas actuar como elemento negativo bloqueando la expresión de *per* (Dibner & Schibler, 2017).

Así, todas estas publicaciones marcaron el comienzo de la era molecular en el estudio de los relojes circadianos eucariontes, seguidos muy de cerca por los hallazgos en el hongo *N. crassa* (Dunlap, 2008).

Sin duda, el conocer los mecanismos del oscilador circadiano permitió empezar a entender cómo se regulan diariamente una serie de procesos de forma rítmica. Así, se ha comprendido la importancia de la regulación circadiana en la fisiología y el metabolismo de mamíferos (Takahashi *et al.*, 2008; Bass & Takahashi, 2010; Asher & Sassone-Corsi, 2015; Fitzgerald *et al.*, 2015). Es más, estos estudios incluso han mostrado el efecto del reloj en la regulación de la microbiota intestinal, con el consecuente impacto en el metabolismo, así como la disrupción de estos ritmos (por *jetlag* crónico o mutaciones, etc.) pueden llevar a disbiosis y alteraciones metabólicas (Thaiss *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015). De esta forma, ya no resulta sorprendente que diversas patologías humanas hayan sido conectadas a la disrupción genética o ambiental de la regulación circadiana (Takahashi *et al.*, 2008; Bass & Takahashi, 2010; Fitzgerald *et al.*, 2015; Perelis *et al.*, 2015; Bass & Lazar, 2016; Paschos & Fitzgerald, 2017). Por otra parte, se ha vuelto claro el control circadiano del sistema inmune, con el consecuente efecto en la respuesta a patógenos (Tognini *et al.*, 2017), así como de procesos inflamatorios y reumatoideos (Buttgereit *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2016).

La descripción molecular de estos relojes ha permitido entender trastornos de ciclos de sueño vigilia, y poder identificar mutaciones en componentes del reloj tales como PER o quinasas, que llevan a problemas como el *síndrome familiar avanzado* de la fase del sueño (Gallego & Virshup, 2007).

Así, lo que comenzó hace más de 30 años como la identificación de un gen en *D. melanogaster*, se ha transformado en una acabada

descripción molecular de cómo el tiempo impacta una serie de procesos y cómo estos a su vez impactan nuestra salud y calidad de vida. De manera importante, algunos de estos nuevos estudios han empezado a ser rápidamente captados por la comunidad general llevando a reformular dichos populares tales como "somos lo que comemos" a "somos lo que comemos y cuándo lo comemos".

Por lo tanto, es hora de comenzar a incorporar estos conceptos circadianos en cómo enfrentamos la ciencia experimental y la clínica. ¡No hay tiempo que perder!

Referencias

- Allada R, Emery P, Takahashi JS & Rosbash M. (2001). Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1091-1119.
- Asher G & Sassone-Corsi P. (2015). Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell* **161**, 84-92.
- Bass J & Lazar MA. (2016). Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* **354**, 994-999.
- Bass J & Takahashi JS. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349-1354.
- Buttgereit F, Smolen JS, Coogan AN & Cajochen C. (2015). Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **11**, 349-356.
- Centro Interdisciplinario de Neurología de Valparaíso. (2017). XIV Latin American Symposium of Chronobiology. Accedido en <http://cinv.uv.cl/lasc2017/> el 19-12-2017
- Dibner C & Schibler U. (2017). Body clocks: time for the Nobel Prize. *Acta Physiol (Oxf)*.
- Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Dunlap JC. (2008). Salad days in the rhythms trade. *Genetics* **178**, 1-13.
- Fitzgerald GA, Yang G, Paschos GK, Liang X & Skarke C. (2015). Molecular clocks and the human condition: approaching their characterization in human physiology and disease. *Diabetes, obesity & metabolism* **17 Suppl 1**, 139-142.
- Gallego M & Virshup DM. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 139-148.

- Konopka RJ & Benzer S. (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, 2112-2116.
- Liang X, Bushman FD & FitzGerald GA. (2015). Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10479-10484.
- Paschos GK & FitzGerald GA. (2017). Circadian Clocks and Metabolism: Implications for Microbiome and Aging. *Trends Genet* **33**, 760-769.
- Perelis M, Ramsey KM & Bass J. (2015). The molecular clock as a metabolic rheostat. *Diabetes, obesity & metabolism* **17 Suppl 1**, 99-105.
- Rao RT, Pierre KK, Schlesinger N & Androulakis IP. (2016). The Potential of Circadian Realignment in Rheumatoid Arthritis. *Crit Rev Biomed Eng* **44**, 177-191.
- Rosbash M. (2009). The implications of multiple circadian clock origins. *PLoS Biol* **7**, e62. Revisado el 12-12-2017
- Rosbash M. (2017a). https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/rosbash-lecture.html. revisado el 22-12-17
- Rosbash M. (2017b). Life Is an N of 1. *Cell* **171**, 1241-1245.
- Takahashi JS, Hong HK, Ko CH & McDearmon EL. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* **9**, 764-775.
- Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, Abramson L, Katz MN, Korem T, Zmora N, Kuperman Y, Biton I, Gilad S, Harmelin A, Shapiro H, Halpern Z, Segal E & Elinav E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* **159**, 514-529.
- Tognini P, Thaiss CA, Elinav E & Sassone-Corsi P. (2017). Circadian Coordination of Antimicrobial Responses. *Cell Host Microbe* **22**, 185-192.
- Young MW. (2000a). Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *TIBS* **25**, 601-606.
- Young MW. (2000b). Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *Trends Biochem Sci* **25**, 601-606.