

综述 生物钟、生理稳态与疾病专辑



马定邦, 中国科学院上海有机化学研究所生物与化学交叉研究中心研究员、课题组长、博士生导师。2017年毕业于中国科学院上海生命科学研究院, 获得理学博士学位。此后, 前往美国霍华德·休斯医学研究所(布兰迪斯大学)开展博士后研究, 师从2017年诺贝尔生理学或医学奖得主Michael Rosbash教授。2023年8月, 全职加入中国科学院上海有机化学研究所生物与化学交叉研究中心。课题组结合生物信息学、分子生物学和动物行为学等手段, 研究节律神经元在单细胞水平上的基因表达时空异质性; 解析核心生物钟调控细胞特异性钟控基因表达的分子机制及其在昼夜节律与睡眠-觉醒调控中的生理功能。

果蝇昼夜节律的分子机制与神经环路研究进展

许午言[#], 乔春雪[#], 李飞祥, 马定邦^{*}

中国科学院上海有机化学研究所, 生物与化学交叉研究中心, 上海 201210

摘要: 昼夜节律是生物体在长期进化过程中为适应地球周期性自转所形成的核心调控机制, 广泛存在于从单细胞生物到高等多细胞生物的生命体中。昼夜节律在代谢调控、免疫反应以及睡眠-觉醒等关键生理过程和行为调节中发挥重要作用, 其紊乱与多种疾病的发生密切相关。过去数十年, 通过果蝇和小鼠的遗传学研究, 昼夜节律的机制研究已取得重要进展, 鉴定出了调控昼夜节律的关键保守基因, 并揭示了基于转录-翻译负反馈环路的分子调控机制。此外, 大脑中的节律神经元通过复杂的神经环路与不同层级的神经网络相互作用, 精确调控昼夜节律相关的生理和行为节律。本文将重点探讨果蝇大脑中节律神经元的神经环路机制研究进展。未来的研究拟进一步推动昼夜节律调控机制的临床转化, 特别是在时间医学和精准治疗领域。

关键词: 昼夜节律; 神经环路; 节律神经元

Advances in molecular mechanisms and neuronal circuits underlying circadian rhythms in *Drosophila*

XU Wu-Yan[#], QIAO Chun-Xue[#], LI Fei-Xiang, MA Ding-Bang^{*}

Interdisciplinary Research Center on Biology and Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

Abstract: Circadian rhythms are core regulatory mechanisms that evolved to align biological functions with the Earth's rotation. These rhythms are conserved across organisms from unicellular life to multicellular species and play essential roles in metabolism, immune responses, and sleep-wake cycle. Circadian disruptions are strongly associated with various diseases. Over the past decades, genetic studies in *Drosophila* and mice have identified key conserved clock genes and uncovered transcription-translation feedback

This work was supported by Shanghai Pujiang Program (No. E3D0381AP0) and the Youth Elite Project of Chinese Academy of Sciences Shanghai Branch (No. E4D0051AP0).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-21-68582275; E-mail: dbma@sioc.ac.cn

loops governing circadian regulation. Additionally, rhythmic neurons in the brain integrate complex neural circuits to precisely regulate physiological and behavioral rhythms. This review highlights recent advances in understanding the neuronal circuit mechanisms of rhythmic neurons in the *Drosophila* brain and discusses future directions for translating circadian rhythm research into chronomedicine and precision therapies.

Key words: circadian rhythm; neural circuits; circadian neurons

生物节律是一种广泛存在于生物体内的生理现象，与地球自转形成的24 h周期密切相关^[1]。生物体的内源性时钟系统并非严格的24 h周期，能够通过光照、温度以及进食等关键授时因子的导引(entrainment)作用与外界环境同步，从而调控不同的生理过程和行为。生物节律的稳定性对机体健康至关重要，其紊乱与肿瘤、代谢性疾病、心血管功能障碍以及神经精神疾病等多种病理状态密切相关^[2]。例如，昼夜节律的破坏能够促进部分肿瘤的形成；相反，肿瘤相关的致癌过程也会进一步削弱机体的节律系统^[3]。用药理手段调控核心生物钟基因正成为癌症治疗的一种新策略^[3]。越来越多的研究表明，针对节律紊乱的干预治疗能够缓解部分精神疾病的临床症状^[4]。在现代社会中，跨时区旅行、夜间过度光照、轮班工作以及不良的饮食习惯等造成的昼夜节律紊乱愈发普遍。因此，深入研究生物节律的调控机制及其紊乱对疾病发生、发展的影响具有重要的科学价值和临床意义。

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)生长周期短，遗传操作简单，且超过75%的基因与人存在同源性，是昼夜节律研究的经典模式生物。在分子水平上，细胞自主的转录-翻译负反馈环路(transcription-translation feedback loop, TTFL)调控核心生物钟基因及其下游钟控基因的表达，并在24 h内周期性振荡，从而调控多种生理过程^[5]。此外，哺乳动物和昆虫的大脑中均存在调控生物节律的脑区和神经元，这些神经元通过表达不同的神经多肽和神经递质，与上下游神经元组成神经环路，共同介导昼夜节律的调控^[6]。节律神经元在神经化学特性和形态上存在异质性，使其能够执行不同的生理功能。本文将重点探讨果蝇昼夜节律的分子调控机制及其神经环路网络，为深入研究昼夜节律紊乱的潜在病理机制、揭示生物钟的精细调控原理，以及解析其在昼夜节律相关疾病中的作用提供理论支撑和研究参考。

1 首个节律基因的克隆

人类早期便认识到生理活动的周期性变化，但对昼夜节律的系统性科学研究可追溯至18世纪的法国。博物学家Jean-Jacques d'Ortous de Mairan于1729年首次描述了生物钟的现象。他在一项经典实验中观察到，即使在持续黑暗的环境中，含羞草的叶片仍然会按照昼夜节律展开和闭合。这表明植物的生理节律可能由内在的生物钟调控，而不仅仅依赖于外界光照的变化。现代昼夜节律研究的突破始于果蝇的遗传学分析。20世纪60年代，在加州理工大学的Seymour Benzer在Ed Lewis的鼓励下，尝试利用化学诱变筛选出具有趋光性缺陷的果蝇突变体，首次指出基因是复杂行为学的基础^[7]。在Seymour Benzer的研究生Ronald Konopka的建议下，他们开始利用正向遗传学手段研究果蝇的昼夜节律，并成功鉴定出三个影响节律周期的突变体，分别导致周期延长、缩短或节律丧失，这些突变体被命名为 per^L 、 per^S 和 per^{AR} ^[8]。该研究首次提供了生物钟具有遗传基础的直接证据。十多年后，重组DNA技术的快速发展使得克隆基因成为可能。1984年，布兰迪斯大学的Jeff Hall、Michael Rosbash和洛克菲勒大学的Michael Young成功克隆出 $period$ 基因^[9-12]。尽管 $period$ 基因的克隆尚不揭示其分子机制，后续研究发现， $period$ mRNA水平在昼夜之间呈现周期性波动，并且可以调控自身转录，这一发现奠定了昼夜节律的TTFL的基础^[13]。此后，更多核心生物钟基因相继被发现，进一步揭示了生物钟的分子调控机制。

2 昼夜节律调控的分子机制

果蝇的核心时钟基因主要包括Clock (*Clk*)、Cycle (*Cyc*)、Period (*Per*)和Timeless (*Tim*)等。其中，CLK和CYC形成异源二聚体，作为转录激活因子，通过结合下游靶基因(包括 Per 和 Tim)启动子上的E-box序列，促进其转录。这一过程主要发生在Zeitgeber Time (ZT) 4至ZT18之间(ZT0为光照开始，

ZT12为黑暗开始)。随后, *Per*和*Tim* mRNA在细胞质中被翻译成PER和TIM蛋白。然而, 由于PER蛋白的磷酸化依赖性降解[主要由Doubletime (DBT), 即哺乳动物酪蛋白激酶1 ϵ 的同源蛋白介导], 以及TIM对PER-DBT复合物的稳定作用, PER和TIM蛋白的累积存在约6~8 h的滞后, 至ZT12左右才显著增加。PER和TIM蛋白在细胞质中形成复合物, 并在磷酸化和去磷酸化的动态平衡调控下进入细胞核。在核内, PER-DBT复合物(或PER-TIM-DBT复合物)与CLK结合, 促进其磷酸化, 使其从E-box元件上解离, 从而抑制*Per*和*Tim*的转录, 这一负反馈抑制作用从ZT18延续至ZT4。此外, 环境光照在果蝇生物钟的调节中起关键作用。当ZT0光照开始时, 环境光照通过激活隐花色素(cryptochrome, CRY)介导TIM的降解。具体而言, CRY作为光受体, 感受到环境中的蓝光信号后发生构象变化, 并通过招募F-box蛋白Jetlag促进TIM的泛素化降解。TIM的降解导致PER蛋白失去稳定性, 进而被DBT介导磷酸化, 并经E3泛素连接酶SLIMB介导的泛素化途径降解。PER的降解解除对CLK-CYC复合物的抑制, 使其重新结合至E-box元件, 启动新一轮*Per*和*Tim*的转录, 从而形成一个大约24 h的生物节律周期^[14]。除了在转录水平的调节外, 有研究表明染色质的可及性对周期性基因表达同样重要, 在*per⁰¹*突变体中, 周期性的染色质可及性消失^[15]。核心生物钟基因在神经元以及神经胶质细胞中都具有较高的表达量。胶质细胞中表达的核心生物钟基因对睡眠稳态调控具有重要功能^[16]。但有研究显示, *Tim*在这两类细胞中的调控模式是不一样的, 启动子区的E-box序列对神经胶质细胞中*Tim*的转录更加重要^[17]。在果蝇节律神经元中特异性敲低CYC的表达后, 不仅影响昼夜节律基因表达, 同时也会导致节律神经元发育异常, 表明核心生物钟基因在神经系统发育过程中也具有重要的作用^[18]。

哺乳动物中具有类似的分子机制。具体而言, 哺乳动物的核心时钟基因包括*Clock*、*Bmal1* (*Arntl*)、*Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*)和*Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*)等。其中, BMAL1和CLOCK蛋白形成异源二聚体, 作为转录激活因子, 结合在*Per*和*Cry*基因启动子上的E-box序列, 促进其转录, 随后PER和CRY蛋白在细胞质中积累, 形成复合物后转移到细胞核内, 与CLOCK-BMAL1复合物相互作

用, 抑制其转录活性, 形成负反馈环路。此外, 哺乳动物生物钟还存在辅助反馈环路, 以增强和稳定昼夜节律的调控^[19,20]。例如, 核受体蛋白RORs和REV-ERB分别作为转录激活因子和抑制因子, 调控*Bmal1*的转录。RORs与*Bmal1*启动子上的RORE序列结合, 促进*Bmal1*的转录; 而REV-ERBs也与RORE序列结合, 但抑制*Bmal1*的转录^[21,22]。这一辅助反馈环路与核心反馈环路相互作用, 增强了生物钟的稳健性和精确性^[5]。最新研究表明, 低活性的P-loop ATP酶RUVBL2是真核生物钟的共同起源分子, 通过与TTFL生物钟蛋白相互作用参与昼夜节律调控^[23]。

适应环境温度变化对于大多数生物的生存至关重要。果蝇作为一种变温动物, 对外在环境温度的变化尤其敏感。昼夜节律系统能够响应温度变化, 同时维持相对稳定的昼夜节律周期。越来越多的研究表明, RNA可变剪接在此过程中具有重要的调控作用。低温(18 °C)可以诱导*per* mRNA在3' UTR区域的选择性剪接, 并进一步通过激活*daywake*基因的转录, 促进果蝇在傍晚的活动高峰提前^[24,25]。*Tim* mRNA同时受到了温度的调控。已知在不同的温度条件下至少具有4种不同的*Tim* mRNA变体。遗传学筛选发现U4/U5.U6三小核核糖核蛋白(tri-snRNP)剪接体组分PRP4激酶调控果蝇昼夜节律基因表达与行为, 这一过程主要是通过*Tim*的可变剪接介导的^[26]。在25 °C条件下, 全长*Tim*转录本表达最多, 低温诱导*Tim-cold*和*Tim-sc*表达, 高温促进*Tim-M*的表达增加, 有助于推迟果蝇在傍晚时的活动高峰^[26-28]。最新的研究结果表明, 温度同时调控*Clk*的选择性剪切, 在低温条件下, CLK-cold是主要的蛋白亚型, 其部分氨基酸残基缺失影响CLK蛋白对DNA的结合能力^[29]。

3 果蝇大脑中节律神经元的组成

核心生物钟蛋白的发现极大推动了对调控昼夜节律的关键神经元的鉴定。位于哺乳动物大脑中的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)是调控昼夜节律的关键脑区。小鼠大脑中的SCN由约2万个细胞组成。果蝇大脑中的节律神经网络相对而言更加简单, 一共有约240个节律神经元, 它们通过不同的周期性基因表达调控多种生理过程和行为, 这些节律神经元分布在不同的脑区(图1)。根据其胞体位置与大小分为不同的节律神经元亚型^[30]。通常

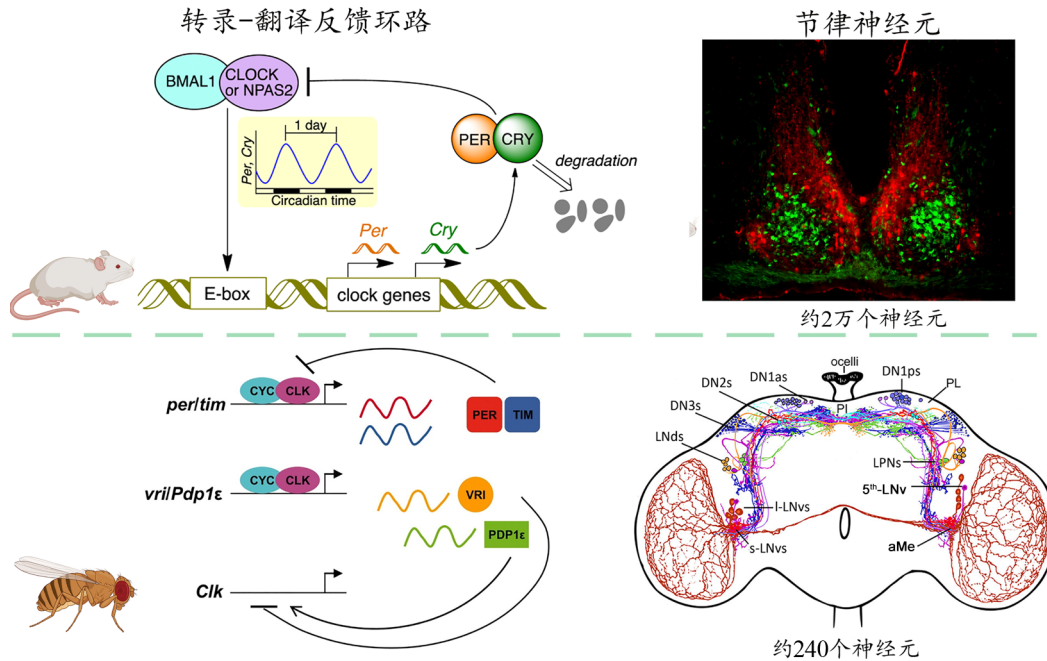


图 1. 转录-翻译反馈调节环路及果蝇和小鼠大脑中的节律神经元。正向调控因子(如 CLK/CYC 或 CLOCK/BMAL1)促进负性调控分子(如 PER/TIM 或 PER/CRY)的转录, 后者通过抑制正向因子的转录活性, 从而构成负反馈环路。小鼠视交叉上核(SCN)中, 绿色和红色荧光分别代表胃泌素释放肽(GRP)和精氨酸加压素(AVP)的表达。果蝇节律神经元根据其解剖学位置可区分为不同的亚型, 如腹侧神经元(LNVs)和背侧外侧神经元(LNds)等。

Fig. 1. Transcription-translation feedback loop and rhythmic neurons in the brains of *Drosophila* and mice. Positive regulatory factors (CLK/CYC or CLOCK/BMAL1) promote the transcription of negative regulators (PER/TIM or PER/CRY), which in turn inhibits the transcriptional activity of the positive factors, forming a negative feedback loop. In the mouse suprachiasmatic nucleus (SCN), green and red fluorescence indicate the expression of neuropeptides gastrin releasing peptide (GRP) and arginine vasopressin (AVP), respectively. In *Drosophila*, circadian neurons are classified into different subtypes based on their anatomical locations, such as the lateral ventral neurons (LNVs) and lateral dorsal neurons (LNds). PL, prelimic cortex; DN1as, dorsal neurons 1 anterior; DN1ps, dorsal neurons 1 posterior; DN2s, dorsal neurons 2; DN3s, dorsal neurons 3; LPNs, posterior lateral neurons; 5th-LNV, 5th small ventrolateral neuron; aMe, accessory medulla.

情况下, 双侧分布的节律神经元可分为两个主要类别: 侧向神经元(lateral neurons, LNs)和背侧神经元(dorsal neurons, DNds)。其中, LNs 进一步分为大腹侧神经元(large lateral ventral neurons, l-LNVs)、小腹侧神经元(small ventrolateral neurons, s-LNVs)、第五小腹侧神经元(5th small ventrolateral neuron, 5th-LNV)、背侧外侧神经元(lateral dorsal neurons, LNds)以及后侧神经元(posterior lateral neurons, LPNs)。而 DNds 则分为 DN1s、DN2s 和 DN3s 三个亚型, 其中 DN1s 进一步分为前部(DN1as)和后部(DN1ps)两组。GAL-UAS 系统是一种常用于果蝇组织特异性操控的遗传工具^[31]。目前, 多个细胞特异的 GAL4 品系已被开发, 极大地推动了对果蝇节律神经元细胞特异的功能研究^[32]。截至目前, 针对 LNs 的研究相对更为深入。在 12 h 光暗循环(12 h:12 h LD)条件下,

果蝇的活动呈现出两个显著高峰, 分别位于早晨和黄昏。l-LNVs 和 s-LNVs 表达色素分散因子(pigment-dispersing factor, PDF), 在调控果蝇在早晨的活动高峰以及内源周期性长度过程中具有重要作用, 因此被称为 M (morning) 细胞。PDF 通过激活其受体 PDFR (PDF receptor), 在不同节律神经元亚型及部分非节律神经元中实现昼夜节律的同步化。LNds 及部分 DNds 的功能缺失会导致黄昏活动高峰异常, 因此被称为 E (evening) 细胞。

4 果蝇节律神经元的感光机制

光照是影响昼夜节律的主要环境因素之一。研究表明, 果蝇昼夜节律的光感受依赖于视觉系统和节律神经元中表达的蓝光受体 CRY^[33]。果蝇具有三种外部光感受器: 复眼(compound eyes)、小眼(ocelli)

和 Hofbauer-Buchner (HB) 小眼。利用视觉突变体的研究表明，复眼在测量日长和感知月光方面发挥作用。缺乏复眼或 *norpA* 的果蝇突变体，其黄昏活动高峰提前，晨峰活动显著减弱，表明复眼在果蝇的昼夜节律调控中具有重要作用^[34]。光响应的节律神经元投射至附加髓质 (accessory medulla, aMe)，并在该脑区与 HB 小眼光感受器及传递复眼信号的中间神经元形成突触连接^[35]。研究表明，激光切除 aMe 或去除果蝇复眼均可消除节律神经元的光响应^[36]。此外，果蝇 R8 感光细胞通过共释放组胺和乙酰胆碱两种神经递质，将成像信号与光照强度信号分离；行为学研究进一步表明，阻断组胺和乙酰胆碱的传递分别会损害 R8 介导的运动检测和昼夜节律光同步性，说明单一类型的感光细胞可以实现视觉感知与昼夜节律光同步的功能分化^[37]。

与哺乳动物因较厚的头骨而限制光穿透不同，果蝇大脑表面的角质层可以直接透光，使部分节律神经元能够直接感受环境光信号。其中，部分节律神经元直接表达蓝光受体 CRY，这一光受体在果蝇的昼夜节律光感受中起核心作用^[38]。CRY 蛋白结构与细菌中的光裂解酶高度同源并最早在拟南芥中被鉴定发现^[39]。随后的研究表明，CRY 在进化上具有极高的保守性，在植物、果蝇、斑马鱼、哺乳动物乃至人类中均有表达^[40]。有意思的是，在植物和昆虫中 CRY 可以感受蓝光并调控基因表达，而在高等动物中 CRY 失去了感光功能，主要作为转录抑制因子发挥作用^[41]。在果蝇中，*Cry^b* 突变体对光照的同步化能力显著减弱。野生型果蝇通常能在一天内将昼夜节律同步至新的明暗 (LD) 条件，然而，*Cry* 突变体需要 7 天才能适应新的环境^[42]。

周期 (period)、振幅 (amplitude) 以及节律相位 (phase) 是描述昼夜节律振荡特征的核心参数^[1]。节律相位指生物节律在周期中的特定时间点，例如，入睡以及清晨醒来的时间点可视为睡眠-觉醒周期的相位。在果蝇中，蓝光受体 CRY 通过多种机制调控昼夜节律相位。首先，蓝光激活的 CRY 可与核心生物钟蛋白 TIM 结合，促进其降解，从而破坏 PER-TIM 复合物的稳定性^[43]。CRY 也能直接调控节律神经元的放电频率，且该过程不依赖于 TIM^[44]。果蝇大脑中的腹侧神经元 (lateral ventral neurons, LNvs) 通过释放神经多肽 PDF，调控神经元网络的同步性。在夜间不同时间点激活 LNvs，可诱导下游神经元中 TIM 的降解，进而导致与光照刺激类似的昼夜节律

相位改变，表明节律神经元可通过细胞自主和神经网络依赖的方式调控昼夜节律的相位^[45]。值得注意的是，CRY 在不同节律神经元中的表达水平存在差异，对夜间光照刺激的反应亦有所不同。例如，在夜间早期施加光脉冲会导致 E 细胞中的 TIM 降解，但不会影响 M 细胞中的 TIM，这表明光照诱导的相位变化依赖于生物钟神经元的类型以及光照施加的时间点^[46]。果蝇中的 CRY 除了作为光受体介导 TIM 降解和昼夜节律相位以外，在某些组织或细胞中也可以抑制下游基因的表达。例如 CRY 可以抑制糖酵解相关基因的表达，从而降低乳酸积累和葡萄糖的利用，这与 CRY 在哺乳动物中作为一个转录抑制因子的功能是类似的^[47]。最新的研究发现线粒体呼吸链对 CRY 活性具有调控作用，抑制线粒体复合体 III 和 V 可阻止 CRY 介导的 TIM 降解，但对 CRY 的转录抑制功能无显著的影响^[48]。此外，*cry⁰¹* 突变体具有更高的食物摄入量和糖原浓度，果蝇寿命增加，提示 CRY 在代谢调控中也具有重要的功能^[49]。

5 果蝇大脑侧向节律神经环路调控

近年来，果蝇节律神经元的环路调控研究已取得了显著进展 (图 2)。尽管果蝇大脑中的 l-LNvs 和 s-LNvs 各自仅由 8 个神经元组成，但是它们对昼夜节律调控至关重要。如前所述，神经多肽 PDF 在 l-LNvs 和 s-LNvs 中高度富集，PDF 缺失突变体 (*pdf⁰¹*) 表现为无节律或具有短周期的弱行为节律^[50]。LNvs 神经元缺失的果蝇表现出与 *pdf* 突变果蝇完全一致的行为表型，表明 PDF 是 LNvs 神经元调控节律行为的主要输出信号^[50]。在解剖结构上，l-LNvs 主要向果蝇的视叶投射，而 s-LNvs 则主要投射到果蝇的背侧脑区 (图 2)。跨突触绿色荧光蛋白重构 (green fluorescent protein reconstitution across synaptic partners, GRASP) 技术和电子显微镜研究表明，s-LNvs 在背侧前脑区域与 DN1ps 和 DN2s 存在突触连接^[51,52]。l-LNvs 表达 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) A 受体 (GABA_A 受体) RDL (resistant to dieldrin)，能够促进果蝇觉醒^[53]。s-LNvs 末端轴突在果蝇大脑背侧的周期性重塑表现出明显的时间依赖性：在黎明更为舒展，而在黄昏时更为收缩，此过程依赖于 PDF 的表达以及 s-LNvs 的活性^[54]。最新的研究结果显示，小鼠 SCN 中的血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 神经元具有类似的舒展与收缩周期^[55]，说明节律神经元周期性重塑在

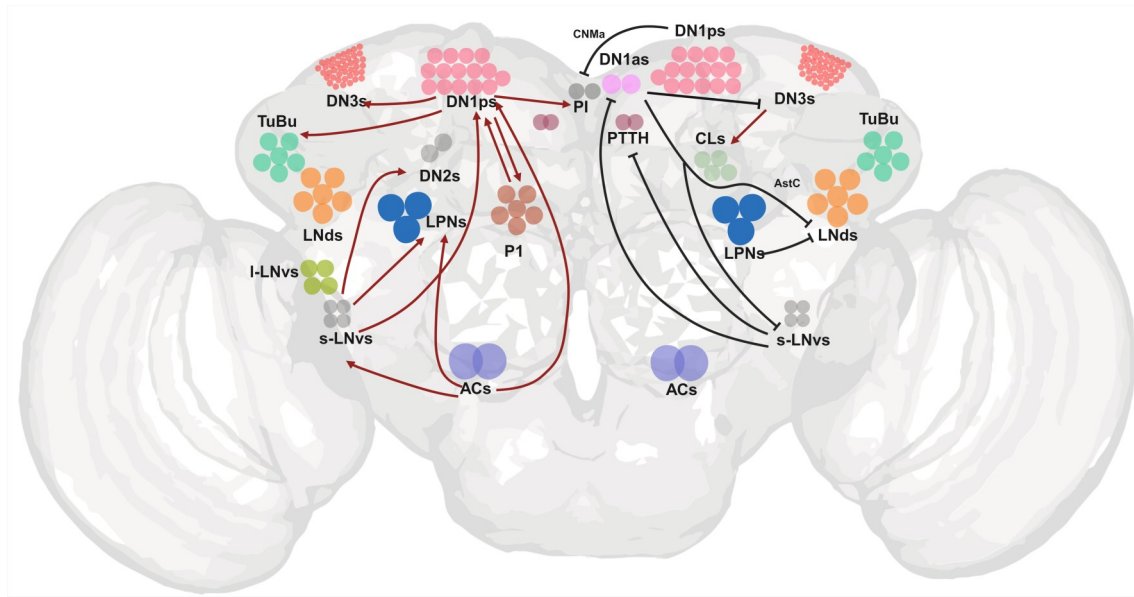


图 2. 果蝇大脑中节律神经元的主要环路

Fig. 2. Principal neural circuits of rhythmic neurons in the brain of *Drosophila*. I-LNvs, large ventrolateral neurons; s-LNvs, small ventrolateral neurons; 5th-LNv, 5th small ventrolateral neuron; LNds, dorsolateral neurons; LPNs, posterior lateral neurons; DN1as, dorsal neurons 1 anterior; DN1ps, dorsal neurons 1 posterior; DN2s, dorsal neurons 2; DN3s, dorsal neurons 3; PI, pars intercerebralis; PTH, prothoracicotrophic hormone; TuBu, Tubulet-to-Bulb; CLs, claw neurons; CNMa, CNMamide; AstC, allatostatin C; ACs, anterior cells.

进化上是保守的。s-LNvs 表达神经多肽 sNPF，能够降低 I-LNvs 的静息膜电位并抑制其动作电位的产生，从而调控睡眠^[56]。值得注意的是，s-LNvs 还通过释放 sNPF 抑制 PTH (prothoracicotrophic hormone) 神经元的活性，从而调控果蝇成虫的羽化^[57]，这一过程涉及多个受体酪氨酸激酶的参与^[58]。此外，s-LNvs 可合成并释放经典抑制性神经递质甘氨酸。在成虫阶段，用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术下调 LNvs 神经元中的甘氨酸转运蛋白或甘氨酸合成酶可导致果蝇的昼夜节律周期延长近 1 h^[59]。

5th-LNv 不表达 PDF，它在神经连接模式、神经肽表达和细胞解剖特征上，与表达 CRY 的三个 LNds 更为相似^[60]。LNds 被认为至少具有三种不同的类型，即 E1、E2 和 E3。具体而言，E1 神经元由两个表达神经肽 Trissin 和 sNPF 的 LNds 组成；E2 神经元包括 1 个表达 ITP 的 LNds 和 5th-LNv；E3 神经元包括 3 个不表达 CRY 的 LNds，而其中两个神经元表达 NPF 神经肽^[61]。值得注意的是，LNds 具有雌雄二态性，NPF 在雄性果蝇的 LNds 中表达量更高，可能参与了果蝇的交配行为^[61, 62]。表达 CRY 的 LNds 同时表达 PDFR^[63]，表明不同类型 LNds 对 PDF 具有不同的敏感性。研究表明，E1 神经元促进果蝇从觉

醒到睡眠行为的转换，E2 神经元则行使经典的 E 细胞功能，主要调控果蝇在傍晚的活动高峰^[64]。此外，E2 LNds 高表达多巴胺受体 Dop1R1，敲除 Dop1R1 后，果蝇的晨间活动显著降低，表明多巴胺可通过 LNds 调节昼夜节律^[65]。LNds 的突触后电位在昼夜之间呈周期性变化，敲低 *Tob* 基因表达后会削弱这一节律性变化并影响果蝇在夜间的入睡时间^[66]。尽管 s-LNvs 和 LNds 分别调控果蝇在早晨和黄昏时的活动，但是二者之间几乎不存在直接突触连接^[67]。此外，研究显示，LNds 可投射至多巴胺能 PPM3 神经元，并进一步调控 EB (ellipsoid body) 神经元的活性，提示节律神经元可能通过特定多巴胺能神经元调节行为运动^[68]。

在果蝇大脑的每个半球中均有三个 LPNs，这些神经元可节律性地表达 AstA (allatostatin A)、AstC (allatostatin C) 和 DH31 (diuretic hormone 31)。其中，AstA 的表达主要与睡眠调节相关，通过与谷氨酸共同作用于 dFB (dorsal fan-shaped body) 神经元促进睡眠^[69]，并调节代谢与进食行为^[70]。LPNs 还共表达 PDFR，并可被 s-LNvs 释放的 PDF 激活，从而调控昼夜节律^[71]。此外，LPNs 中的分子时钟与温度周期高度同步^[72]。LPNs 位于温度敏感前部细胞(anterior

cells, ACs)下游, 并通过AstC抑制LNds活性, 以促进果蝇睡眠^[73, 74]。

6 果蝇大脑背侧节律神经环路调控

在果蝇大脑的每个半球中, 昼夜节律神经元包括两个DN2和两个DN1a神经元。在幼虫阶段DN2神经元即表现出PER蛋白的周期性表达, 但其相位与其他节律神经元相反^[75]。DN2神经元的内在分子时钟可被温度调节, 并主要参与果蝇的温度偏好节律, 即果蝇在一天中不同时间点趋向于选择不同的环境温度^[76]。此外, 果蝇大脑中的ACs表达温度敏感的受体TRPA1, ACs投射至s-LNvs, 再连接到DN2s, 从而调控温度偏好^[77]。DN1as表达神经肽CCHamide1、IPNa (ion transport peptide-like neuropeptide A)以及谷氨酸^[78], 但其对昼夜节律周期的影响较小^[79]。研究表明, DN1as是果蝇节律神经元中对温度最敏感的神经元, 其中, DN1a-LNd回路通过响应寒冷温度调节傍晚的运动高峰, 而DN1a-DN3回路则控制温暖温度诱导的夜间睡眠减少^[80, 81]。DN1as与LNvs在神经形态和功能上紧密连接, 它们通过周期性的神经末端轴突重塑调控果蝇在不同时间点对光照的惊觉反应^[82]。

在果蝇每个半球中, DN1p数量有15个, 其功能高度异质化, 既包括促进睡眠的神经元, 也包括抑制睡眠的亚群。其中, 部分DN1p神经元表达PDFR, 并可部分恢复*Pdfr*突变体的行为表型, 表明DN1p神经元是LNvs的直接靶标。前部投射的DNs (APDNs)通过结节球状神经(TuBus)向睡眠稳态调控中心EB传递信号, 从而调控睡眠^[83, 84]。DN1ps通过多条通路调控睡眠: 一方面, 它通过释放谷氨酸抑制侧向节律神经元的活性, 另一方面, 它投射至DN3神经元, 这些DN3神经元又与一些下游爪状神经元(claw neurons, CLs)连接, 形成DN1p-DN3-CL环路以促进睡眠^[52, 85]。此外, DN1p神经元接收来自s-LNvs的输入, 并将昼夜信息传递给促觉醒的脑间区(C)神经元^[86]。DN1p的活性与温度也密切相关^[52, 87]。在持续黑暗条件下的温度周期中, DN1p神经元能够促进果蝇在傍晚的活动高峰^[88]。例如, ACs与部分DN1p神经元形成突触连接, 通过释放神经多肽CNMamide (CNMa)抑制表达Dh44的PI (pars intercerebralis)神经元, 从而促进觉醒^[89]。研究表明, DN1p神经元的放电模式受到了昼夜节律的调控, 不同时间点的放电模式可独立于放电频

率变化。例如, 仅白天的放电模式便足以诱导下游觉醒神经元的可塑性, 从而增强其放电活动, 揭示了时间编码在行为调控中的因果作用^[90]。此外, DN1ps还存在性别特异性的调控机制, 研究表明, 编码求偶驱动力的P1神经元可与fru^M阳性的DN1ps形成连接, 从而抑制雄性果蝇的睡眠^[91]。

相较其他节律神经元, DN3s占比最高, 但目前针对DN3s的功能研究尚不充分。DN3s高度异质化, 不仅在大小和形态上存在差异, 基因表达特征亦不同, 可进一步细分为l-CPDN3、s-CPDN3和APDN3等亚群^[92, 93]。最新研究表明, 在果蝇大脑每个半球中, DN3s的数量超过70个, 部分对PDF信号具有响应性^[94]。表达AstC的DN3s参与调控果蝇的冷诱导休眠, 进一步揭示其在温度相关行为中的作用^[95]。此外, s-CPDN3已被证明具有促进睡眠的功能^[83]。

近年来, 果蝇大脑连接组解析为揭示节律神经环路的结构和功能提供了重要的基础^[96]。高分辨率全脑神经连接图谱能够系统解析果蝇节律神经元网络的突触连接模式, 并揭示其在协调进食、生殖等昼夜节律行为中的作用^[71]。未来, 结合连接组学数据、光遗传学以及钙成像等功能研究, 有望进一步解析果蝇昼夜节律神经元网络的精细调控机制。

7 节律神经元的基因表达异质性

节律神经元在细胞形态与功能上高度特异, 其神经元活性、分子特征和调控机制因不同的神经元亚型而存在显著差异。尽管不同的节律神经元具有相对同步的核心生物钟基因表达, 但是它们却具有不同的神经元活动周期^[97, 98], 提示核心生物钟通过细胞特异的基因表达调控周期性生理活动。Rosbash等对果蝇的l-LNvs和s-LNvs进行了纯化和基因芯片分析, 发现两者在转录水平上具有巨大差异, 尽管l-LNvs和s-LNvs均表达神经多肽PDF, 但是仅约50%的基因在两类细胞中是共同表达的, 而另一半基因呈现亚型特异性, 例如章鱼胺受体mRNA在l-LNvs中选择性富集, 且仅l-LNvs对章鱼胺产生响应, 而s-LNvs中特异性表达神经多肽sNPF^[99, 100]。进一步的时序转录组分析显示, LNvs、LNds以及DN1ps等不同节律神经元群体在不同时间点的基因表达谱存在动态变化, 尤其是周期性基因的表达模式及mRNA的可变剪切在不同神经元类型中呈现高度特异性, 这些细胞特异的周期性表达基因可能在

调控不同节律行为方面发挥关键作用^[101, 102]。然而，核心生物钟蛋白如何介导这一细胞特异性的基因调控网络仍有待深入研究。

近年来，单细胞转录组测序(scRNA-seq)技术的发展极大地推进了昼夜节律及其对睡眠-觉醒调控的研究^[16, 93]。对果蝇成年大脑神经元展开单细胞转录组研究仍具有非常大的挑战，主要由于：首先，果蝇大脑中的神经元在功能上高度特异且不同类别神经元数目少，从复杂大脑中分离出功能特异的神经元并进行单细胞转录组非常困难；其次，果蝇神经元中RNA含量极低，因此检测灵敏度至关重要^[93]。

研究表明，在基于384孔板的单细胞RNA测序技术基础上通过两次体外转录的方法对mRNA进行线性扩增，实现了对复杂大脑中极少量神经元进行高保真、高灵敏度的基因表达研究^[103]。Clk856-GAL4标记了果蝇的大部分节律神经元(约45个细胞，除大部分DN3节律神经元)，通过对它们进行

多个时间点的单细胞转录组研究，结合免疫组化等多种实验方法，最终鉴定出了17种具有特异基因表达的节律神经元亚型^[93]。该研究首次揭示了果蝇节律神经元中显著的基因表达异质性，极大地拓展了人们对生物节律调控机制的认识。

如上所述，DN3s在果蝇大脑节律神经元中占比最高，但其功能尚未被深入研究。主要的限制因素是领域内缺乏有效的遗传工具对其进行特异性的标记与操控。最新的研究中，学者们通过遗传学筛选获得了特异标记DN3s的遗传品系，在此基础上，通过对所有节律神经元在一天中多个时间点的单细胞转录组研究，最终从250个节律神经元中识别出至少27种分子特征不同的节律神经元亚型^[93, 104]，揭示了昼夜节律系统内更加精细的分子调控模式(图3)。例如，单细胞转录组分析将6个LNds进一步划分为4种不同的分子亚型，提示其可能执行不同的节律功能。同样，3个LPNs也被区分为2种不同的细胞

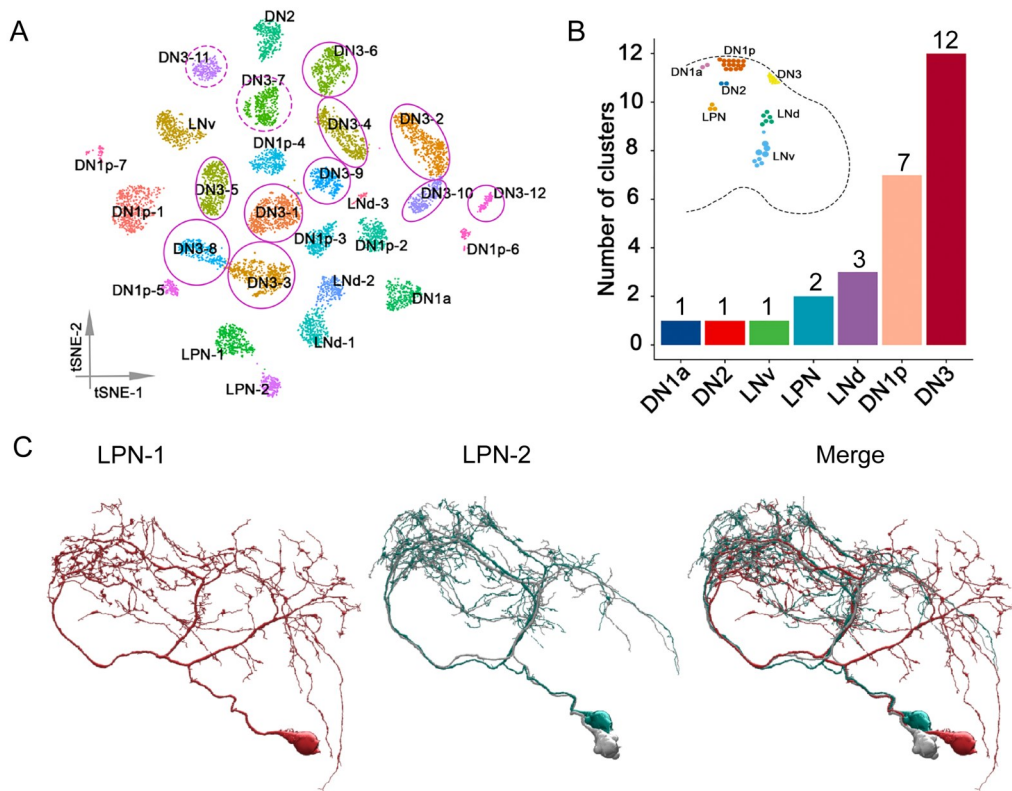


图 3. 果蝇大脑中节律神经元的基因表达异质性。A、B: 果蝇节律神经元的主要细胞亚型。C: 与基因表达分析结果类似，后侧神经元(LPNS)展现出不同的投射形态。

Fig. 3. Gene expression heterogeneity in rhythmic neurons within the brain of *Drosophila*. A, B: Principal cellular subtypes of rhythmic neurons. C: Parallel to gene expression profiling, posterior lateral neurons (LPNs) exhibit distinct projection patterns. The full forms of abbreviations were listed in the legend of Fig. 2. Reproduced from reference^[104].

亚型，表明这些神经元的功能可能比此前认识的更加复杂。进一步结合果蝇大脑连接组(connectome)的分析发现，节律神经元的基因表达异质性与其神经投射形态和连接模式高度吻合，这表明基因表达特征可能决定了神经元在节律环路中的具体功能和作用方式。此外，单细胞转录组数据还揭示了昼夜节律神经元的动态转录变化，例如核心节律基因、神经肽以及下游效应基因的表达水平在昼夜节律周期内呈现时序性波动。这种时间依赖性的转录调控机制可能是昼夜节律系统精确控制行为节律和生理过程的关键^[104]。

果蝇节律神经元的单细胞基因表达研究揭示了节律神经元具有极高的基因表达异质性，由此衍生出两个关键的科学问题：首先，高度特异的基因表达是果蝇大脑节律神经元特性还是果蝇大脑神经元共有的特征；其次，对于昼夜节律调控而言，哺乳动物节律神经元是否也具有类似的基因表达异质性。多巴胺能神经元广泛参与了睡眠、学习以及记忆等不同行为的调控^[105-108]。对果蝇大脑中节律神经元和多巴胺能神经元的比较研究显示，多巴胺能神经元具有类似的基因表达异质性，但是多巴胺能神经元中只有极少的周期性表达基因，进一步说明节律神经元中的钟控基因对周期性生理活动和行为调控的重要性^[109]。位于哺乳动物大脑中的SCN是调控昼夜节律的关键脑区。小鼠大脑中的SCN由约2万个细胞组成，这些神经元可根据神经多肽的表达，进一步分类为共表达神经肽的不同亚型，SCN可分为Shell和Core两个亚区。Shell主要由表达精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)的GABA能神经元组成，而Core包含表达VIP及胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide, GRP)的GABA能神经元。哺乳动物单细胞转录组研究结果显示，SCN中至少具有8种不同的细胞亚型，且每一种细胞亚型都具有不同模式的昼夜节律基因表达。根据标记基因的表达模式，SCN神经元可以被区分为至少5种不同的亚型，它们在分泌神经递质、对光信号的响应以及调控下游昼夜节律网络方面具有不同的功能^[110-112]。目前，对于小鼠SCN和果蝇节律神经元基因表达异质性差异的原因尚不明确，可能由于小鼠SCN神经元具有更高的功能冗余性从而获得更好的稳定性，而果蝇作为相对低等的模式生物，不同神经元需要行使不同的生理功能，例如果蝇节律神经元直接参与睡眠调控，而小鼠SCN则通过下游神

经元回路调控睡眠等周期性行为。

8 总结与展望

回顾过去半个多世纪的研究历程，果蝇作为遗传学和神经生物学研究的经典模式生物，在解析昼夜节律调控机制方面发挥了不可替代的作用。利用果蝇强大的遗传工具，研究者们系统揭示了核心生物钟的分子基础，并通过与小鼠等模式生物的比较研究，发现了高度保守的节律基因，提出了TTFL这一经典概念。这些研究不仅奠定了昼夜节律生物学的核心理论框架，还推动了对神经环路水平的深入探索，揭示了生物钟如何通过神经环路调控行为和生理节律。领域内仍存在诸多未解之谜，值得深入探索。例如，核心生物钟如何在不同细胞和组织中精准调控钟控基因的表达？组织特异性的生物钟如何调节下游的生理功能，如代谢、免疫和神经活动？这些问题不仅涉及基础科学，还与多种疾病的发病机制密切相关。不同模式生物的昼夜节律比较研究不仅有助于揭示节律调控的进化保守性与特异性，也为人类疾病研究提供了重要的理论依据。

随着空间转录组、单细胞多组学和人工智能建模等新兴技术的快速发展，神经环路在时空维度上的功能解析正迈入更高分辨率的阶段。这些技术不仅能够揭示不同细胞类型在昼夜节律调控中的精细分工，也有助于构建更为精准的神经网络动态模型，从而推动睡眠-觉醒节律及其异常机制的系统性理解。在临床应用方面，“时间医学”理念逐渐显现出重要价值。最新的研究结果首次证实，造血干细胞输注的昼夜节律时间会影响急性移植抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)的发生，将造血干细胞移植时间调整至白天较早时段能大幅降低患者术后发生aGVHD的风险，显著提升患者长期生存率^[113]。此外，有研究表明，“生物钟-缺氧信号”之间的互作机制是心肌损伤昼夜节律差异的分子基础^[114]。未来，结合分子节律特征与个体行为数据的时序干预策略，有望为多种疾病的精准治疗提供新的解决方案，推动昼夜节律研究向临床转化迈进。

参考文献

- 1 Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. Cell 1999; 96(2): 271-290.
- 2 Ruan W, Yuan X, Eltzschig HK. Circadian rhythm as a

- therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov* 2021; 20(4): 287-307.
- 3 Sulli G, Lam MTY, Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: New frontiers for cancer treatment. *Trends Cancer* 2019; 5(8): 475-494.
 - 4 Meyer N, Lok R, Schmidt C, Kyle SD, McClung CA, Cajochen C, Scheer F, Jones MW, Chellappa SL. The sleep-circadian interface: A window into mental disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2024; 121(9): e2214756121.
 - 5 Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* 2017; 18(3): 164-179.
 - 6 Starnes AN, Jones JR. Inputs and outputs of the mammalian circadian clock. *Biology (Basel)* 2023; 12(4): 508.
 - 7 Benzer S. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; 58(3): 1112-1119.
 - 8 Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(9): 2112-2116.
 - 9 Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(7): 2142-2146.
 - 10 Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 1984; 312(5996): 752-754.
 - 11 Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Rosbash M. Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 1984; 38(3): 701-710.
 - 12 Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. P-element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1984; 39(2 Pt 1): 369-376.
 - 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): 536-540.
 - 14 Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian time-keeping in *Drosophila*. *Adv Genet* 2011; 74: 141-173.
 - 15 Yuan Y, Chen Q, Brovkina M, Clowney EJ, Yadlapalli S. Clock-dependent chromatin accessibility rhythms regulate circadian transcription. *PLoS Genet* 2024; 20(5): e1011278.
 - 16 Dopp J, Ortega A, Davie K, Poovathingal S, Baz ES, Liu S. Single-cell transcriptomics reveals that glial cells integrate homeostatic and circadian processes to drive sleep-wake cycles. *Nat Neurosci* 2024; 27(2): 359-372.
 - 17 Ma D, Ojha P, Yu AD, Araujo MS, Luo W, Keefer E, Diaz MM, Wu M, Joiner WJ, Abruzzi KC, Rosbash M. Timeless noncoding DNA contains cell-type preferential enhancers important for proper *Drosophila* circadian regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2024; 121(15): e2321338121.
 - 18 Biondi G, McCormick G, Fernandez MP. The *Drosophila* circadian clock gene cycle controls the development of clock neurons. *PLoS Genet* 2024; 20(10): e1011441.
 - 19 Lincoln G, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg D. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21): 13890-13895.
 - 20 Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280(5369): 1564-1569.
 - 21 Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 2005; 20(5): 391-403.
 - 22 Liu AC, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Welsh DK, Kay SA. Redundant function of REV-ERB α and β and non-essential role for *Bmal1* cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet* 2008; 4(2): e1000023.
 - 23 Liao M, Liu Y, Xu Z, Fang M, Yu Z, Cui Y, Sun Z, Huo R, Yang J, Huang F, Liu M, Zhou Q, Song X, Han H, Chen S, Xu X, Qin X, He Q, Ju D, Wang T, Thakkar N, Hardin PE, Golden SS, Zhang EE. The P-loop NTPase RUVBL2 is a conserved clock component across eukaryotes. *Nature* 2025; 642(8066): 165-173.
 - 24 Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 1999; 24(1): 219-230.
 - 25 Yang Y, Edery I. Daywake, an anti-siesta gene linked to a splicing-based thermostat from an adjoining clock gene. *Curr Biol* 2019; 29(10): 1728-1734.e4.
 - 26 Shakhmantsir I, Nayak S, Grant GR, Sehgal A. Spliceosome factors target timeless (*tim*) mRNA to control clock protein accumulation and circadian behavior in *Drosophila*. *Elife* 2018; 7: e39821.
 - 27 Martin Anduaga A, Evantal N, Patop IL, Bartok O, Weiss R, Kadener S. Thermosensitive alternative splicing senses and mediates temperature adaptation in *Drosophila*. *Elife* 2019; 8: e44642.
 - 28 Foley LE, Ling J, Joshi R, Evantal N, Kadener S, Emery P. *Drosophila* PSI controls circadian period and the phase of circadian behavior under temperature cycle via *tim* splicing. *Elife* 2019; 8: e50063.
 - 29 Cai YD, Liu X, Chow GK, Hidalgo S, Jackson KC, Vasquez CD, Gao ZY, Lam VH, Tabuloc CA, Zheng H, Zhao C, Chiu JC. Alternative splicing of *Clock* transcript mediates the response of circadian clocks to temperature changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2024; 121(50): e2410680121.
 - 30 Dubowy C, Sehgal A. Circadian rhythms and sleep in *Dro-*

- sophila melanogaster*. Genetics 2017; 205(4): 1373-1397.
- 31 Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 1993; 118(2): 401-415.
 - 32 Sekiguchi M, Inoue K, Yang T, Luo DG, Yoshii T. A catalog of GAL4 drivers for labeling and manipulating circadian clock neurons in *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms 2020; 35(2): 207-213.
 - 33 Agrawal P, Houl JH, Gunawardhana KL, Liu T, Zhou J, Zoran MJ, Hardin PE. *Drosophila* CRY entrains clocks in body tissues to light and maintains passive membrane properties in a non-clock body tissue independent of light. Curr Biol 2017; 27(16): 2431-2441.e3.
 - 34 Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C. Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms 2003; 18(5): 377-391.
 - 35 Helfrich-Förster C. Light input pathways to the circadian clock of insects with an emphasis on the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 2020; 206(2): 259-272.
 - 36 Li MT, Cao LH, Xiao N, Tang M, Deng B, Yang T, Yoshii T, Luo DG. Hub-organized parallel circuits of central circadian pacemaker neurons for visual photoentrainment in *Drosophila*. Nat Commun 2018; 9(1): 4247.
 - 37 Xiao N, Xu S, Li ZK, Tang M, Mao R, Yang T, Ma SX, Wang PH, Li MT, Sunilkumar A, Rouyer F, Cao LH, Luo DG. A single photoreceptor splits perception and entrainment by cotransmission. Nature 2023; 623(7987): 562-570.
 - 38 Yoshii T, Hermann C, Helfrich-Förster C. Cryptochrome-positive and -negative clock neurons in *Drosophila* entrain differentially to light and temperature. J Biol Rhythms 2010; 25(6): 387-398.
 - 39 Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C. The action mechanisms of plant cryptochromes. Trends Plant Sci 2011; 16(12): 684-691.
 - 40 Parico GCG, Partch CL. The tail of cryptochromes: an intrinsically disordered cog within the mammalian circadian clock. Cell Commun Signal 2020; 18(1): 182.
 - 41 Zhang L, Malkemper EP. Cryptochromes in mammals: a magnetoreception misconception? Front Physiol 2023; 14: 1250798.
 - 42 Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. Cell 1998; 95(5): 681-692.
 - 43 Koh K, Zheng X, Sehgal A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. Science 2006; 312(5781): 1809-1812.
 - 44 Fogle KJ, Parson KG, Dahm NA, Holmes TC. CRYPTOCHROME is a blue-light sensor that regulates neuronal firing rate. Science 2011; 331(6023): 1409-1413.
 - 45 Guo F, Cerullo I, Chen X, Rosbash M. PDF neuron firing phase-shifts key circadian activity neurons in *Drosophila*. Elife 2014; 3: e02780.
 - 46 Tang CH, Hinteregger E, Shang Y, Rosbash M. Light-mediated TIM degradation within *Drosophila* pacemaker neurons (s-LNvs) is neither necessary nor sufficient for delay zone phase shifts. Neuron 2010; 66(3): 378-385.
 - 47 Chiou YY, Lee CY, Yang HW, Cheng WC, Ji KD. Circadian modulation of glucose utilization via CRY1-mediated repression of Pdk1 expression. J Biol Chem 2024; 300(2): 105637.
 - 48 Zheng X, Chen D, Zoltowski B, Sehgal A. Mitochondrial inhibitors reveal roles of specific respiratory chain complexes in CRY-dependent degradation of TIM. Sci Rep 2024; 14(1): 26051.
 - 49 Gopalakrishnan S, Yadav SR, Kannan NN. A role for the circadian photoreceptor CRYPTOCHROME in regulating triglyceride metabolism in *Drosophila*. G3 (Bethesda) 2024; 14(11): jkae220.
 - 50 Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. 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.
 - 51 Shafer OT, Gutierrez GJ, Li K, Mildenhall A, Spira D, Marty J, Lazar AA, Fernandez MP. Connectomic analysis of the *Drosophila* lateral neuron clock cells reveals the synaptic basis of functional pacemaker classes. Elife 2022; 11: e79139.
 - 52 Guo F, Yu J, Jung HJ, Abruzzi KC, Luo W, Griffith LC, Rosbash M. Circadian neuron feedback controls the *Drosophila* sleep-activity profile. Nature 2016; 536(7616): 292-297.
 - 53 Chung BY, Kilman VL, Keath JR, Pitman JL, Allada R. The GABA_A receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in *Drosophila*. Curr Biol 2009; 19(5): 386-390.
 - 54 Fernandez MP, Berni J, Ceriani MF. Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. PLoS Biol 2008; 6(3): e69.
 - 55 Neitz AF, Carter BM, Ceriani MF, Ellisman MH, de la Iglesia HO. Suprachiasmatic nucleus VIPergic fibers show a circadian rhythm of expansion and retraction. Curr Biol 2024; 34(17): 4056-4061.e2.
 - 56 Shang Y, Haynes P, Pirez N, Harrington KI, Guo F, Pollack J, Hong P, Griffith LC, Rosbash M. Imaging analysis of clock neurons reveals light buffers the wake-promoting effect of dopamine. Nat Neurosci 2011; 14(7): 889-895.
 - 57 Selcho M, Millan C, Palacios-Munoz A, Ruf F, Ubillo L, Chen J, Bergmann G, Ito C, Silva V, Wegener C, Ewer J.

- Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*. *Nat Commun* 2017; 8: 15563.
- 58 Cavieres-Lepe J, Amini E, Zabel M, Nassel DR, Stanewsky R, Wegener C, Ewer J. Timed receptor tyrosine kinase signaling couples the central and a peripheral circadian clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2024; 121(11): e2308067121.
- 59 Frenkel L, Muraro NI, Beltran Gonzalez AN, Marcora MS, Bernabo G, Hermann-Luibl C, Romero JI, Helfrich-Forster C, Castano EM, Marino-Busjle C, Calvo DJ, Ceriani MF. Organization of circadian behavior relies on glycinergic transmission. *Cell Rep* 2017; 19(1): 72-85.
- 60 Yao Z, Shafer OT. The *Drosophila* circadian clock is a variably coupled network of multiple peptidergic units. *Science* 2014; 343(6178): 1516-1520.
- 61 Kim WJ, Jan LY, Jan YN. A PDF/NPF neuropeptide signaling circuitry of male *Drosophila melanogaster* controls rival-induced prolonged mating. *Neuron* 2013; 80(5): 1190-1205.
- 62 Lee G, Bahn JH, Park JH. Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(33): 12580-12585.
- 63 Im SH, Li W, Taghert PH. PDFR and CRY signaling converge in a subset of clock neurons to modulate the amplitude and phase of circadian behavior in *Drosophila*. *PLoS One* 2011; 6(4): e18974.
- 64 Brown MP, Verma S, Palmer I, Guerrero Zuniga A, Mehta A, Rosensweig C, Keles MF, Wu MN. A subclass of evening cells promotes the switch from arousal to sleep at dusk. *Curr Biol* 2024; 34(10): 2186-2199.e3.
- 65 Le JQ, Ma D, Dai X, Rosbash M. Light and dopamine impact two circadian neurons to promote morning wakefulness. *Curr Biol* 2024; 34(17): 3941-3954.e4.
- 66 Han E, Lee SS, Park KH, Blum ID, Liu Q, Mehta A, Palmer I, Issa H, Han A, Brown MP, Sanchez-Franco VM, Velasco M, Tabuchi M, Wu MN. Tob regulates the timing of sleep onset at night in *Drosophila*. *J Neurosci* 2024; 44(18): e0389232024.
- 67 Hulse BK, Jayaraman V. Busted! A dope ring with activity clocked at dawn and dusk. *Neuron* 2019; 102(4): 713-715.
- 68 Liang X, Ho MCW, Zhang Y, Li Y, Wu MN, Holy TE, Taghert PH. Morning and evening circadian pacemakers independently drive premotor centers via a specific dopamine relay. *Neuron* 2019; 102(4): 843-857.e4.
- 69 Ni JD, Gurav AS, Liu W, Ogunmowo TH, Hackbart H, Elsheikh A, Verdegaal AA, Montell C. Differential regulation of the *Drosophila* sleep homeostat by circadian and arousal inputs. *Elife* 2019; 8: e40487.
- 70 Reinhard N, Bertolini E, Saito A, Sekiguchi M, Yoshii T, Rieger D, Helfrich-Forster C. The lateral posterior clock neurons of *Drosophila melanogaster* express three neuropeptides and have multiple connections within the circadian clock network and beyond. *J Comp Neurol* 2022; 530(9): 1507-1529.
- 71 Reinhard N, Fukuda A, Manoli G, Derksen E, Saito A, Möller G, Sekiguchi M, Rieger D, Helfrich-Förster C, Yoshii T, Zandawala M. Synaptic connectome of the *Drosophila* circadian clock. *Nat Commun* 2024; 15(1): 10392.
- 72 Miyasako Y, Umezaki Y, Tomioka K. Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J Biol Rhythms* 2007; 22(2): 115-126.
- 73 Alpert MH, Gil H, Para A, Gallio M. A thermometer circuit for hot temperature adjusts *Drosophila* behavior to persistent heat. *Curr Biol* 2022; 32(18): 4079-4087.e4.
- 74 Yuan X, Li H, Guo F. Temperature cues are integrated in a flexible circadian neuropeptidergic feedback circuit to remodel sleep-wake patterns in flies. *PLoS Biol* 2024; 22(12): e3002918.
- 75 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): 6745-6760.
- 76 Kaneko H, Head LM, Ling J, Tang X, Liu Y, Hardin PE, Emery P, Hamada FN. Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*. *Curr Biol* 2012; 22(19): 1851-1857.
- 77 Tang X, Roessingh S, Hayley SE, Chu ML, Tanaka NK, Wolfgang W, Song S, Stanewsky R, Hamada FN. The role of PDF neurons in setting the preferred temperature before dawn in *Drosophila*. *Elife* 2017; 6: e23206.
- 78 Fujiwara Y, Hermann-Luibl C, Katsura M, Sekiguchi M, Ida T, Helfrich-Forster C, Yoshii T. The CCHamide1 neuropeptide expressed in the anterior dorsal neuron 1 conveys a circadian signal to the ventral lateral neurons in *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol* 2018; 9: 1276.
- 79 Nettnin EA, Sallèse TR, Nasser A, Saurabh S, Cavanaugh DJ. Dorsal clock neurons in *Drosophila* sculpt locomotor outputs but are dispensable for circadian activity rhythms. *iScience* 2021; 24(9): 103001.
- 80 Li H, Li Z, Yuan X, Tian Y, Ye W, Zeng P, Li XM, Guo F. Dynamic encoding of temperature in the central circadian circuit coordinates physiological activities. *Nat Commun* 2024; 15(1): 2834.
- 81 Alpert MH, Frank DD, Kaspi E, Flourakis M, Zaharieva EE, Allada R, Para A, Gallio M. A circuit encoding absolute cold temperature in *Drosophila*. *Curr Biol* 2020; 30(12): 2275-2288.e5.
- 82 Song BJ, Sharp SJ, Rogulja D. Daily rewiring of a neural circuit generates a predictive model of environmental light. *Sci Adv* 2021; 7(13): eabe4284.

- 83 Guo F, Holla M, Diaz MM, Rosbash M. [A circadian output circuit controls sleep-wake arousal in *Drosophila*](#). *Neuron* 2018; 100(3): 624-635.e4.
- 84 Lamaze A, Kratschmer P, Chen KF, Lowe S, Jepson JEC. [A Wake-promoting circadian output circuit in *Drosophila*](#). *Curr Biol* 2018; 28(19): 3098-3105.e3.
- 85 Sun L, Jiang RH, Ye WJ, Rosbash M, Guo F. [Recurrent circadian circuitry regulates central brain activity to maintain sleep](#). *Neuron* 2022; 110(13): 2139-2154.e5.
- 86 Cavanaugh DJ, Geratowski JD, Woollorton JR, Spaethling JM, Hector CE, Zheng X, Johnson EC, Eberwine JH, Sehgal A. [Identification of a circadian output circuit for rest:activity rhythms in *Drosophila*](#). *Cell* 2014; 157(3): 689-701.
- 87 Yadlapalli S, Jiang C, Bahle A, Reddy P, Meyhofer E, Shafer OT. [Circadian clock neurons constantly monitor environmental temperature to set sleep timing](#). *Nature* 2018; 555(7694): 98-102.
- 88 Zhang Y, Liu Y, Bilodeau-Wentworth D, Hardin PE, Emery P. [Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior](#). *Curr Biol* 2010; 20(7): 600-605.
- 89 Jin X, Tian Y, Zhang ZC, Gu P, Liu C, Han J. [A subset of DN1p neurons integrates thermosensory inputs to promote wakefulness via CNMa signaling](#). *Curr Biol* 2021; 31(10): 2075-2087.e6.
- 90 Tabuchi M, Monaco JD, Duan G, Bell B, Liu S, Liu Q, Zhang K, Wu MN. [Clock-generated temporal codes determine synaptic plasticity to control sleep](#). *Cell* 2018; 175(5): 1213-1227.e8.
- 91 Chen D, Sitaraman D, Chen N, Jin X, Han C, Chen J, Sun M, Baker BS, Nitabach MN, Pan Y. [Genetic and neuronal mechanisms governing the sex-specific interaction between sleep and sexual behaviors in *Drosophila*](#). *Nat Commun* 2017; 8(1): 154.
- 92 Jiang R, Tian Y, Yuan X, Guo F. [Regulation of pre-dawn arousal in *Drosophila* by a pair of trissinergic descending neurons of the visual and circadian networks](#). *Curr Biol* 2025; 35(8): 1750-1764.e3.
- 93 Ma D, Przybylski D, Abruzzi KC, Schlichting M, Li Q, Long X, Rosbash M. [A transcriptomic taxonomy of *Drosophila* circadian neurons around the clock](#). *Elife* 2021; 10: e63056.
- 94 Shafer OT, Kim DJ, Dunbar-Yaffe R, Nikolaev VO, Lohse MJ, Taghert PH. [Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging](#). *Neuron* 2008; 58(2): 223-237.
- 95 Meiselman MR, Alpert MH, Cui X, Shea J, Gregg I, Gallio M, Yapici N. [Recovery from cold-induced reproductive dormancy is regulated by temperature-dependent AstC signaling](#). *Curr Biol* 2022; 32(6): 1362-1375.e8.
- 96 Scheffer LK, Xu CS, Januszewski M, Lu Z, Takemura SY, Hayworth KJ, Huang GB, Shinomiya K, Maitlin-Shepard J, Berg S, Clements J, Hubbard PM, Katz WT, Umayam L, Zhao T, Ackerman D, Blakely T, Bogovic J, Dolafi T, Kainmueller D, Kawase T, Khairy KA, Leavitt L, LiPH, Lindsey L, Neubarth N, Olbris DJ, Otsuna H, Trautman ET, Ito M, Bates AS, Goldammer J, Wolff T, Svirskas R, Schlegel P, Neace E, Knecht CJ, Alvarado CX, Bailey DA, Ballinger S, Borycz JA, Canino BS, Cheatham N, Cook M, Dreher M, Duclos O, Eubanks B, Fairbanks K, Finley S, Forknall N, Francis A, Hopkins GP, Joyce EM, Kim S, Kirk NA, Kovalyak J, Lauchie SA, Lohff A, Maldonado C, Manley EA, McLin S, Mooney C, Ndama M, Ogundeyi O, Okeoma N, Ordish C, Padilla N, Patrick CM, Paterson T, Phillips EE, Phillips EM, Rampally N, Ribeiro C, Robertson MK, Rymer JT, Ryan SM, Sammons M, Scott AK, Scott AL, Shinomiya A, Smith C, Smith K, Smith NL, Sobeski MA, Suleiman A, Swift J, Takemura S, Talebi I, Tarnogorska D, Tenshaw E, Tokhi T, Walsh JJ, Yang T, Horne JA, Li F, Parekh R, Rivlin PK, Jayaraman V, Costa M, Jefferis GS, Ito K, Saalfeld S, George R, Meinertzhagen IA, Rubin GM, Hess HF, Jain V, Plaza SM. [A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain](#). *Elife* 2020; 9: e57443.
- 97 Liang X, Holy TE, Taghert PH. [Synchronous *Drosophila* circadian pacemakers display nonsynchronous Ca²⁺ rhythms *in vivo*](#). *Science* 2016; 351(6276): 976-981.
- 98 Liang X, Holy TE, Taghert PH. [Circadian pacemaker neurons display cophasic rhythms in basal calcium level and in fast calcium fluctuations](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(17): e2109969119.
- 99 Kula-Eversole E, Nagoshi E, Shang Y, Rodriguez J, Allada R, Rosbash M. [Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(30): 13497-13502.
- 100 Nagoshi E, Sugino K, Kula E, Okazaki E, Tachibana T, Nelson S, Rosbash M. [Dissecting differential gene expression within the circadian neuronal circuit of *Drosophila*](#). *Nat Neurosci* 2010; 13(1): 60-68.
- 101 Abruzzi KC, Zadina A, Luo W, Wiyanto E, Rahman R, Guo F, Shafer O, Rosbash M. [RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides](#). *PLoS Genet* 2017; 13(2): e1006613.
- 102 Wang Q, Abruzzi KC, Rosbash M, Rio DC. [Striking circadian neuron diversity and cycling of *Drosophila* alternative splicing](#). *Elife* 2018; 7: e35618.
- 103 Zheng J, Ye Y, Xu Q, Xu W, Zhang W, Chen X. [A modified SMART-Seq method for single-cell transcriptomic analysis of embryoid body differentiation](#). *Methods Mol Biol* 2022; 2520: 233-259.

- 104 Ma D, Le JQ, Dai X, Díaz MM, Abruzzi KC, Rosbash M. [Transcriptomic DN3 clock neuron subtypes regulate *Drosophila* sleep](#). *Sci Adv* 2025; 11(1): eadr4580.
- 105 Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M. [Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*](#). *J Neurosci* 2003; 23(33): 10495-10502.
- 106 Ganguly-Fitzgerald I, Donlea J, Shaw PJ. [Waking experience affects sleep need in *Drosophila*](#). *Science* 2006; 313(5794): 1775-1781.
- 107 Ueno T, Tomita J, Tanimoto H, Endo K, Ito K, Kume S, Kume K. [Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*](#). *Nat Neurosci* 2012; 15(11): 1516-1523.
- 108 Liu Q, Liu S, Kodama L, Driscoll MR, Wu MN. [Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in *Drosophila*](#). *Curr Biol* 2012; 22(22): 2114-2123.
- 109 Ma D, Herndon N, Le JQ, Abruzzi KC, Zinn K, Rosbash M. [Neural connectivity molecules best identify the heterogeneous clock and dopaminergic cell types in the *Drosophila* adult brain](#). *Sci Adv* 2023; 9(8): eade8500.
- 110 Wen S, Ma D, Zhao M, Xie L, Wu Q, Gou L, Zhu C, Fan Y, Wang H, Yan J. [Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus](#). *Nat Neurosci* 2020; 23(3): 456-467.
- 111 Xu P, Berto S, Kulkarni A, Jeong B, Joseph C, Cox KH, Greenberg ME, Kim TK, Konopka G, Takahashi JS. [NPAS4 regulates the transcriptional response of the suprachiasmatic nucleus to light and circadian behavior](#). *Neuron* 2021; 109(20): 3268-3282.e6.
- 112 Morris EL, Patton AP, Chesham JE, Crisp A, Adamson A, Hastings MH. [Single-cell transcriptomics of suprachiasmatic nuclei reveal a Prokineticin-driven circadian network](#). *EMBO J* 2021; 40(20): e108614.
- 113 Hou Y, Wu Y, Cao Y, Hu X, Sun Y, Wang H, Wang L, Zhou J, Zhang Z, Liu Z, Tang B, Song K, Sun G, Gao W, Zheng T, Wu P, Wu W, Ju D, Zhu X, Zhan C. [Optimizing stem cell infusion timing in the prevention of acute graft-versus-host disease](#). *Cell* 2025; 188(11): 3030-3044.e7.
- 114 Ruan W, Li T, Bang IH, Lee J, Deng W, Ma X, Luo C, Du F, Yoo SH, Kim B, Li J, Yuan X, Figarella K, An YA, Wang YY, Liang Y, DeBerge M, Zhang D, Zhou Z, Wang Y, Gorham JM, Seidman JG, Seidman CE, Aranki SF, Nair R, Li L, Narula J, Zhao Z, Gorfe AA, Muehlschlegel JD, Tsai KL, Eltzschig HK. [BMAL1-HIF2A heterodimer modulates circadian variations of myocardial injury](#). *Nature* 2025; 641(8064): 1017-1028.