



Laurea triennale in scienze biologiche

Anno Accademico 2021/2022

Meccanismi molecolari di regolazione del ritmo circadiano e il loro coinvolgimento nella fisiologia e nelle patologie

Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases

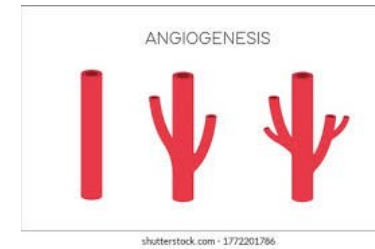
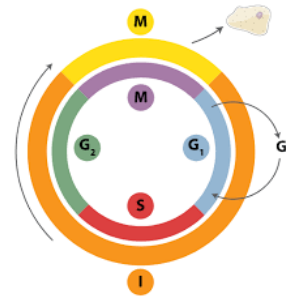
IL CICLO CIRCADIANO

Cos'è?

- **L'orologio circadiano** si basa su meccanismi di trascrizione e traduzione, serve per regolare l'ambiente interno e sincronizzarlo con quello esterno.

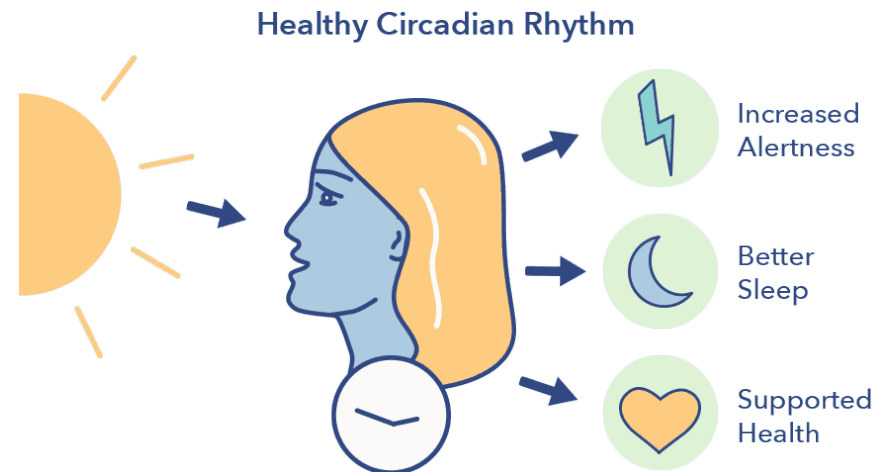
In cosa è coinvolto?

- Regolazione della macchina del ciclo cellulare
- Angiogenesi
- Immunità
- Metabolismo



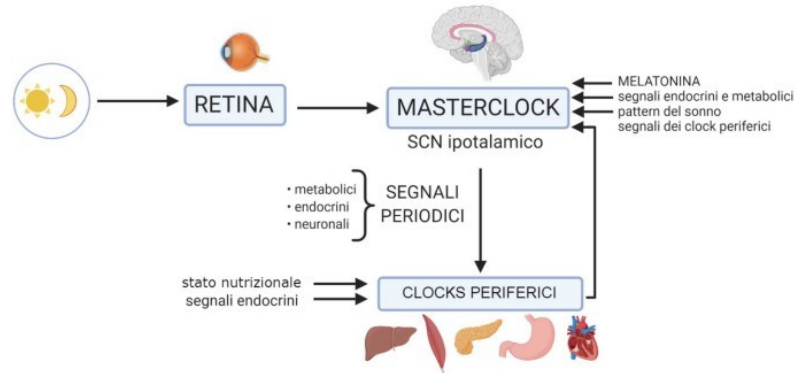
Da cosa è influenzato?

- Luce
- Temperatura
- Età



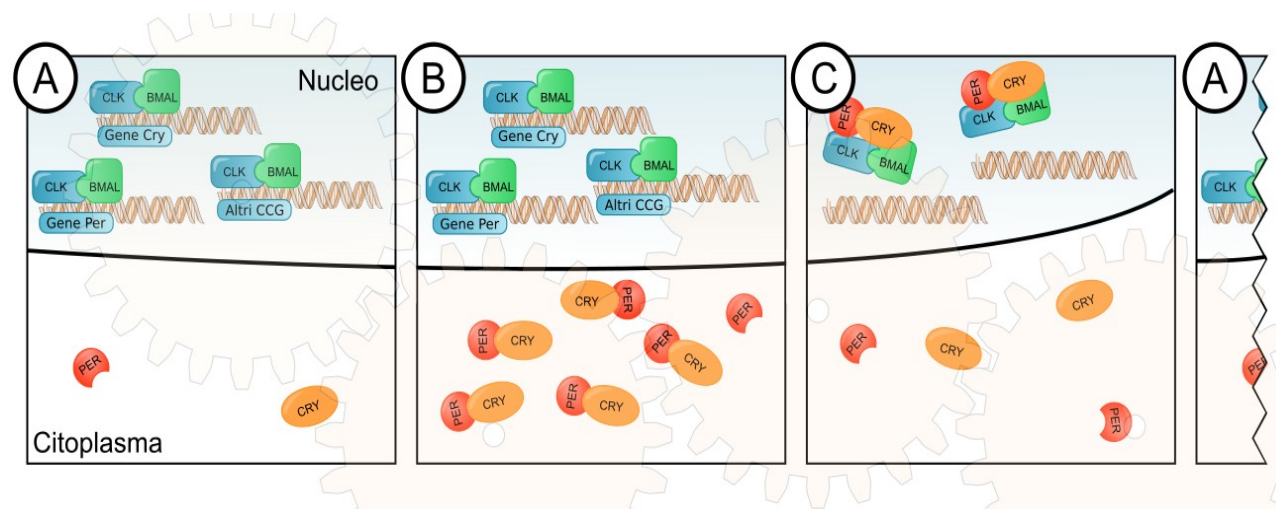
OROLOGIO CIRCADIANO

- Il **Nucleo Soprachiasmatico** è l'orologio principale, sebbene nei mammiferi ci siano orologi periferici.



Benazzi et al, L'Endocrinologo 2021

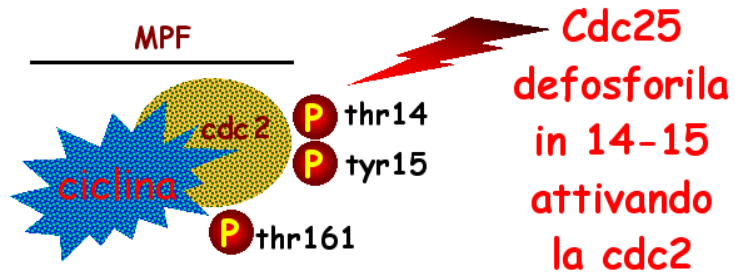
- Meccanismi molecolari di controllo si basano su **trascrizione** e **traduzione** ma sono importanti anche: depolarizzazione della membrana, flusso intracellulare di calcio e attivazione di cAMP.



Romanò, AIRInforma, 2015

Orologio Circadiano e Ciclo Cellulare

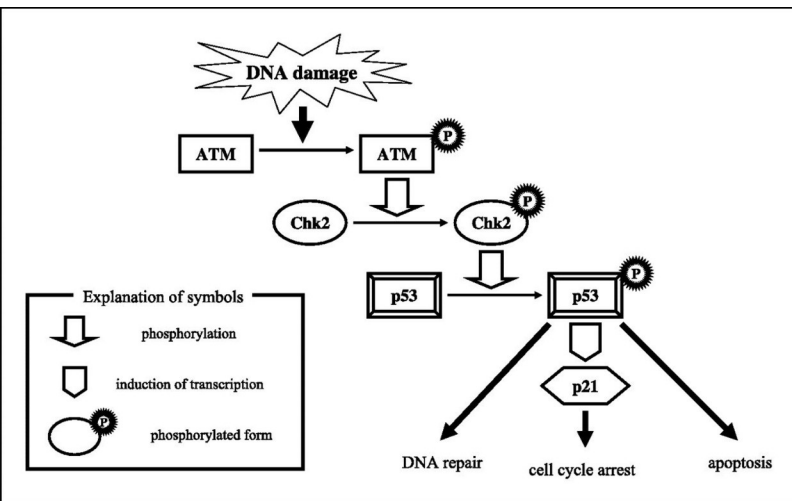
CAK attiva le CDK



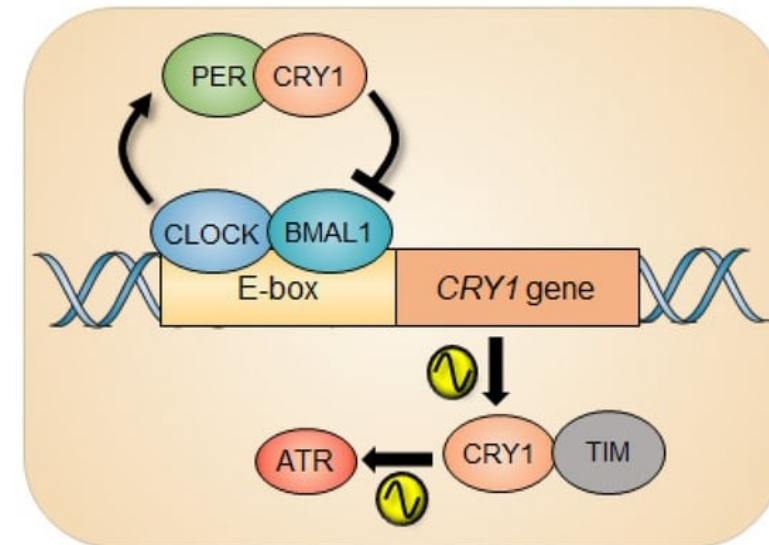
- Il gene **Wee1** (tre B-boxes nel promotore controllate direttamente da BMAL1-CLOCK) codifica per una proteina che inattiva il complesso CDC2/ciclina B1, impedendo l'ingresso in mitosi.
- Il gene che codifica per la proteina **c-Myc** è trascrizionalmente attivato dall'eterodimero. In particolare, nell'uomo, una eccessiva espressione di questa proteina, impedisce l'attivazione di PER1 da parte di BMAL1-CLOCK.
- Altri geni coinvolti nel ciclo cellulare: **Cdkn 1 a** e **Ciclina D1**.

Wee1(myt) disattiva le CDK

I geni dell'orologio circadiano controllano anche il **DDR (DNA damage-response)** a livello dei checkpoint del ciclo cellulare.

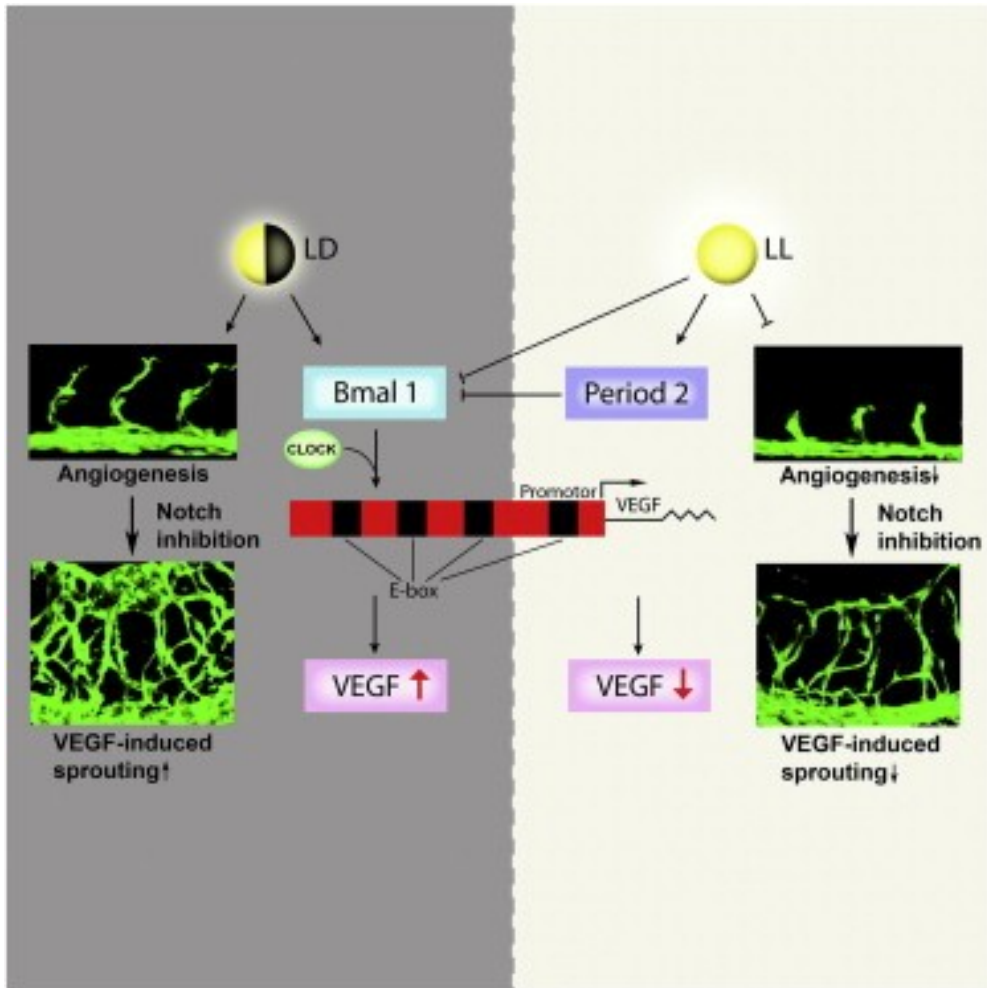


- **PER1** forma un complesso con **ATM** e **CHK2**, una cascata di eventi termina con l'attivazione del fattore di trascrizione **p53** che attiva il gene che codifica per la proteina **p21** (inibitore delle CDK).
- **CRY1** interagisce con **TIM** in modo variabile durante il giorno determinando un'oscillazione circadiana di **ATR**.



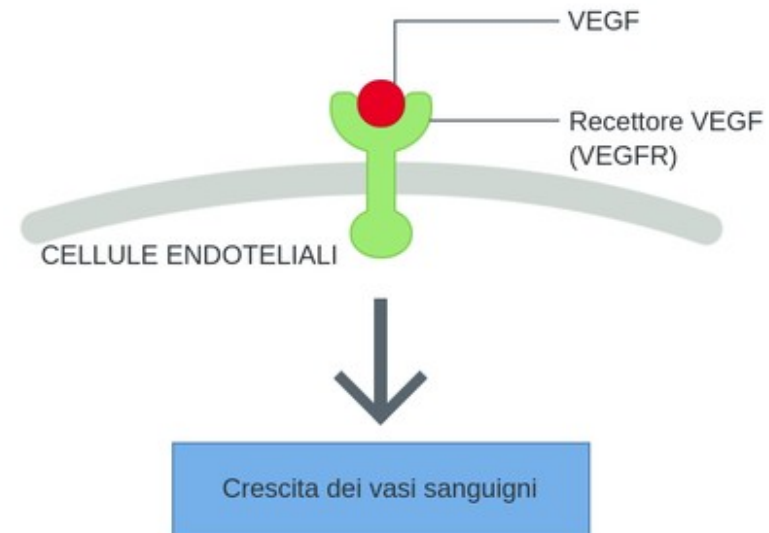
Orologio Circadiano e Angiogenesi

Correlazione tra orologio circadiano e **angiogenesi** come dimostra l'interazione tramite E-box tra BMAL1 e VEGF.



VEGF:

- stimola la mitosi delle cellule endoteliali;
- stimola la migrazione delle cellule endoteliali;
- aumenta la permeabilità delle cellule endoteliali.

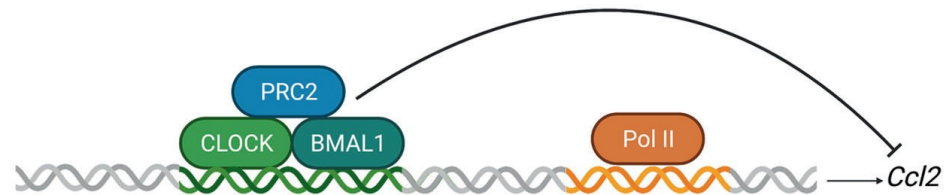


Labster theory, 31 agosto 2021

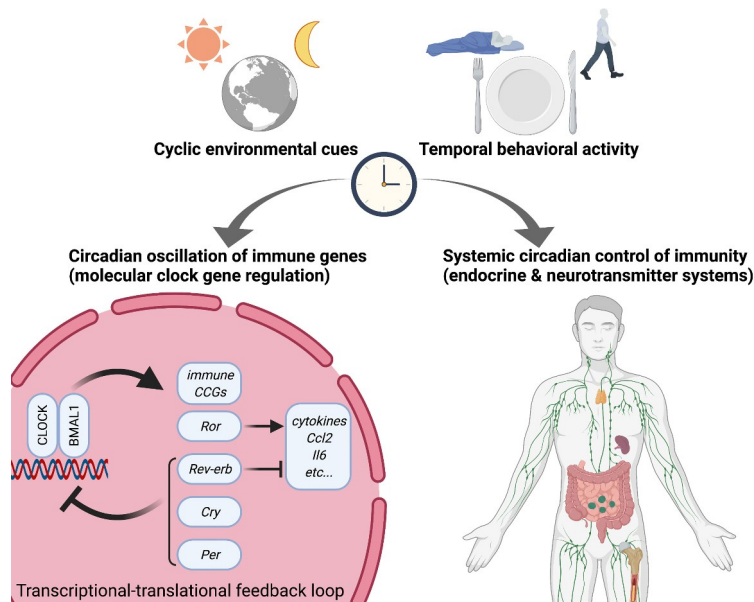
Orologio Circadiano e Infiammazione

Tutte le cellule del sistema immunitario hanno variazioni circadiane e possono:

1. essere controllate dall'orologio centrale;
2. avere un orologio autonomo.



BMAL1 recluta il complesso **PRC2** nelle cellule mieloidi per reprimere l'espressione dei geni per le chemochine.

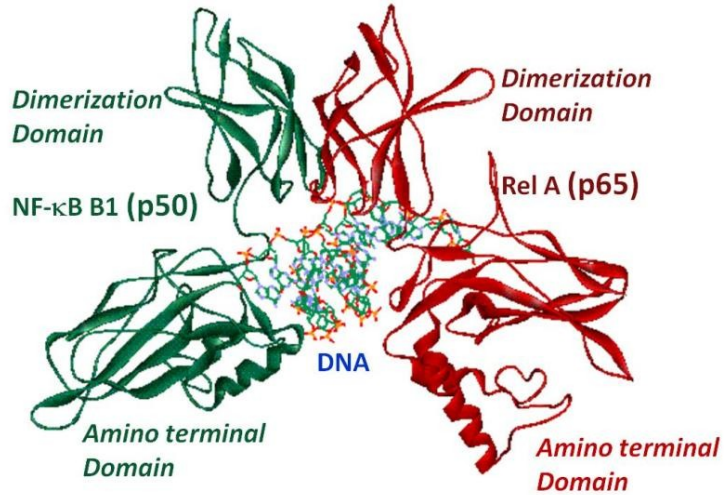


I **macrofagi** e le **cellule natural killer** possiedono un orologio endogeno che determina il momento in cui avvengono diverse funzioni (fagocitosi, produzione di citochine, attività antibatterica e antivirale).

Orologio Circadiano e Infiammazione

Interazione con il fattore di trascrizione **NF-kb**:

Qual è la struttura di NF-kb?



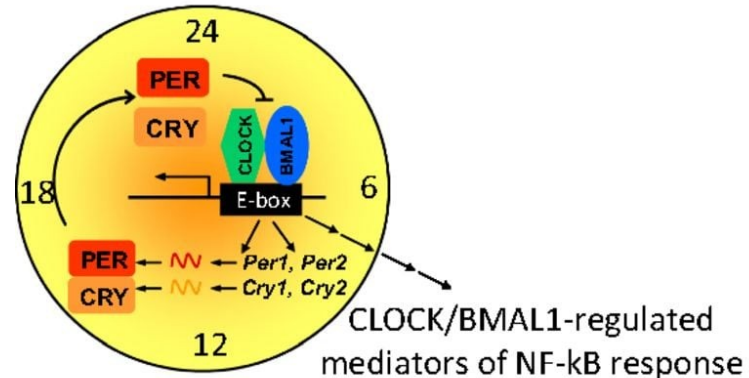
Grossman A. et al, National library of medicine, 2012

NF-kb è un fattore di trascrizione che agisce come chiave molecolare che integra l'infiammazione e la ritmicità circadiana.

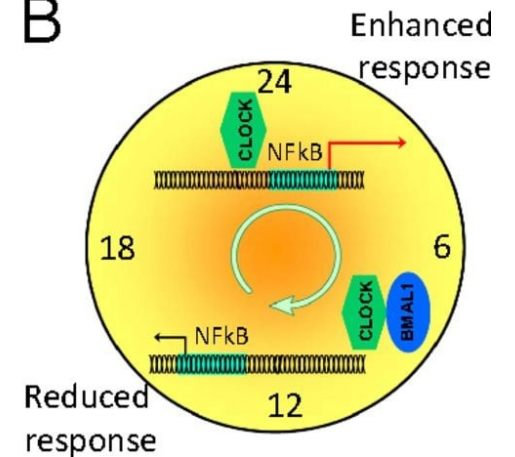
Questa interazione può essere di due tipi:

1. **CLOCK** interagisce con **p65**, comportandosi come un regolatore positivo di NF-kb;
2. NF-kb eccessivamente attivato previene il legame di **BMAL1** al promotore di **PER2**.

A



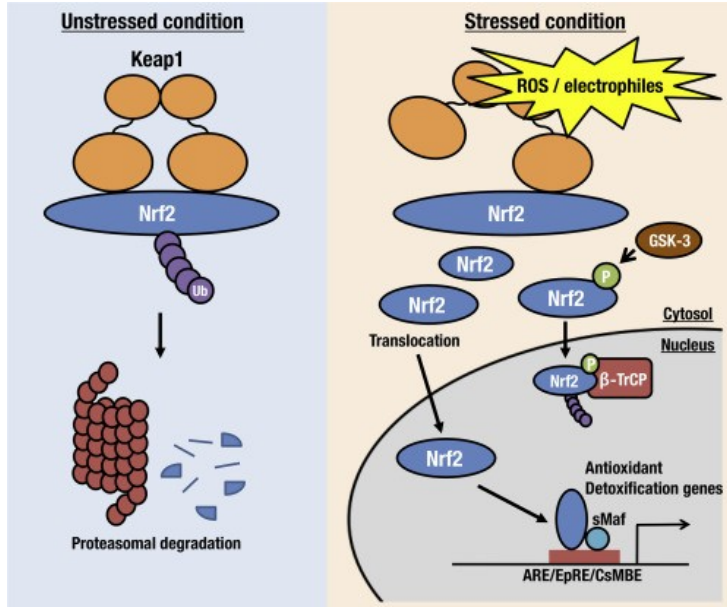
B



Spengler et al, PNAS, 2012

Orologio Circadiano e Infiammazione

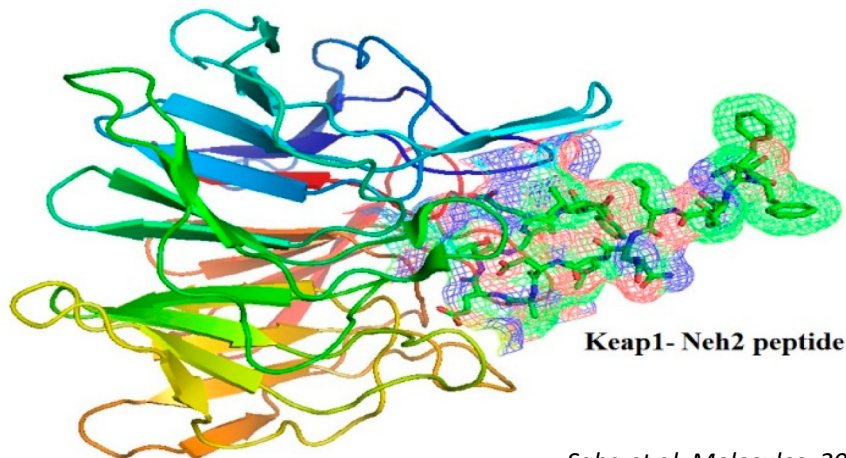
Interazione con il fattore di trascrizione **Nrf2**:



In condizioni normali Nrf2 è trattenuto nel citoplasma grazie al legame con **Keap1**. In seguito a stimoli esterni Keap1 va incontro a modifiche strutturali ed Nrf2 entra nel nucleo per:

- limitare risposta infiammatoria sopprimendo le ROS;
- prevenire la produzione delle citochine pro infiammatorie legandosi direttamente ai promotori.
- In seguito a perturbazione della PPP, aumenta il legame tra Nrf2 e **NR1D1** inviando segnali redox all'orologio circadiano.

Suzuki et al, Science direct, 2016



Keap1- Neh2 peptide

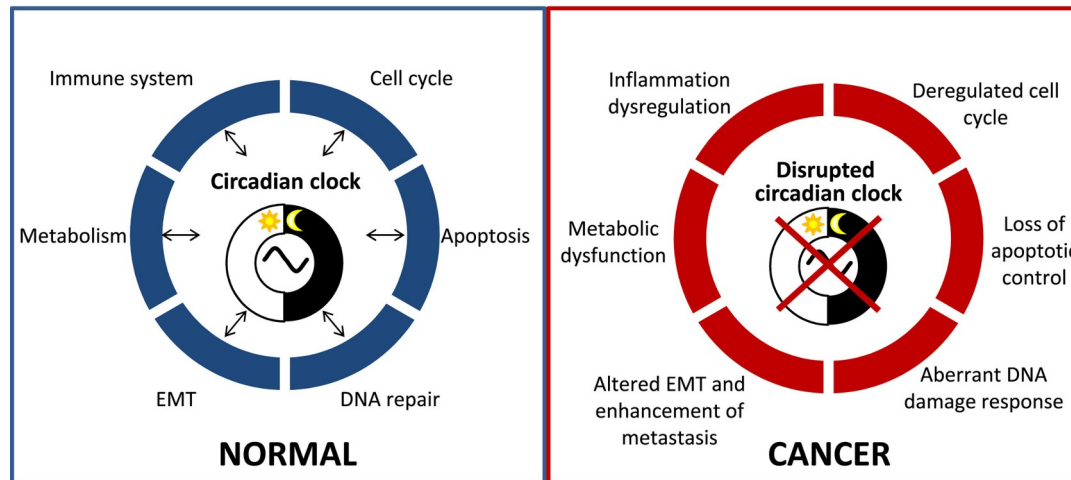
Saha et al, Molecules, 2020



Nrf2 è costituito da 7 domini funzionali; Neh2 (dominio N-ter) interagisce con Keap1.

OROLOGIO CIRCADIANO E CANCRO

I **tessuti cancerogeni** presentano spesso modifiche post traduzionali nei promotori dei geni dell'orologio causandone un'espressione alterata.



Davis et al, Life, 2019

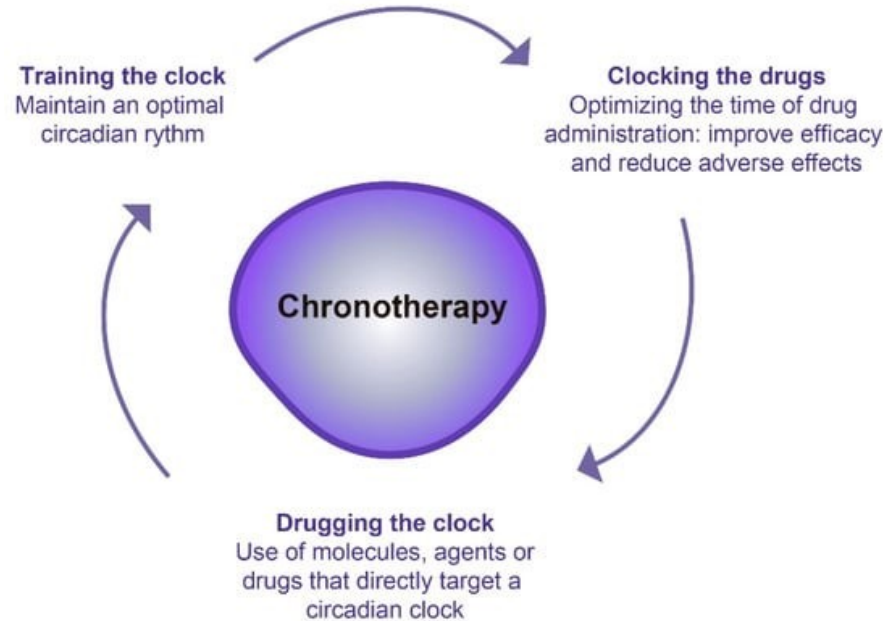
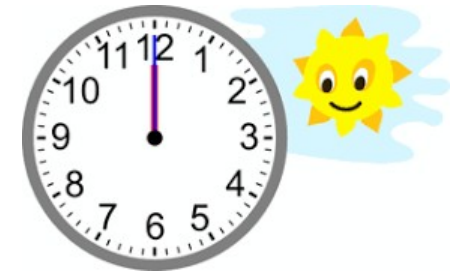


Un esperimento del *Nurses' Health Study* ha dimostrato che chi fa lavori con turni di notte (da almeno 30 anni) ha una maggiore probabilità di sviluppare il cancro al seno (donne) o alla prostata (uomini) a causa di livelli ormonali alterati.

CRONOTERAPIA COME PROSPETTIVA FUTURA

Cos'è?

identificazione di un tempo ottimale in cui somministrare il farmaco per migliorarne l'efficacia.



Test clinici su pazienti affette da uno stadio avanzato del cancro ovarico hanno dimostrato che la somministrazione di due farmaci con 12 ore di distanza l'uno dall'altro ha una maggiore efficacia rispetto al trattamento con i medesimi farmaci ma alla stessa ora.

- **RIASSUNTO ESTESO:**

Gli orologi biologici circadiani sono oscillatori endogeni, autorigeneranti, i cui geni (espressi ritmicamente) controllano molti fenomeni biologici; questi sono una caratteristica condivisa da tutti gli esseri viventi: dai procarioti fotosintetici agli eucarioti più complessi.

L'orologio centrale è costituito dal nucleo soprachiasmatico, a sua volta formato da nuclei autonomi contenenti neuroni con oscillatori propri e che comunicano tra loro; sono inoltre presenti, negli organismi più complessi, altri nuclei periferici semi autonomi.

Il loro meccanismo molecolare prevede la presenza di fattori di trascrizione (es. BMAL1 e CLOCK) che dal citoplasma migrano nel nucleo e promuovono la trascrizione di diversi geni, tra cui i loro inibitori (es. PER e CRY) che una volta sintetizzati si spostano nel nucleo e inibiscono BMAL1 e CLOCK.

Inizia un nuovo ciclo quando PER e CRY vengono fosforilati e degradati per ubiquitinazione con un conseguente aumento di concentrazione di BMAL1 e CLOCK.

Oltre ai meccanismi di trascrizione e traduzione, sono importanti anche la depolarizzazione della membrana, il flusso intracellulare di calcio e l'attivazione di cAMP.

L'architettura molecolare dell'orologio circadiano condivide diverse analogie con la macchina del ciclo cellulare, influenzando in particolare la transizione G2-M e G1-S poiché sono necessari geni che contengono nei loro promotori delle E-box con sequenze consenso trascrizionalmente attivate dall'eterodimero BMAL1-CLOCK.

Altri meccanismi in cui risulta fondamentale l'orologio circadiano sono: l'angiogenesi (BMAL1, infatti, attraverso il legame con la E-box del promotore, attiva il gene del fattore di crescita endoteliale) e la ritmicità dell'espressione delle cellule del sistema immunitario.

In quest'ultimo caso la comunicazione è reciproca come dimostra il fatto che avvenga una riprogrammazione circadiana in seguito a infiammazioni croniche.

Per tutte le ragioni sopra indicate è intuibile che una disfunzione dell'orologio circadiano possa essere responsabile di diverse patologie.

In particolare è stato sperimentalmente osservato che il malfunzionamento dell'orologio circadiano è un segno distintivo del cancro e, sebbene non sia l'unico, può influire sugli altri (come la progressione del ciclo cellulare incontrollata o danni al DNA non riparati); questo è dovuto a una diversa espressione dei geni dell'orologio in seguito a modifiche post traduzionali.

Pertanto, in diverse cure sperimentali si sintetizzano molecole artificiali che hanno come target i geni dell'orologio, sfruttando anche la cronoterapia (identificazione di un tempo ottimale in cui somministrare i farmaci per migliorarne l'azione e diminuirne gli effetti collaterali dovuti proprio al fatto che questi vengono assorbiti, metabolizzati ed escreti in modo circadiano).