



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

# **GLI OROLOGI CIRCADIANI DELLE PIANTE E DEI CIANOBATTERI**

*THE CIRCADIAN CLOCKS OF PLANTS AND CYANOBACTERIA*

Tesi di laurea di:

**FLAVIA D'ANGELO**

Docente Referente:

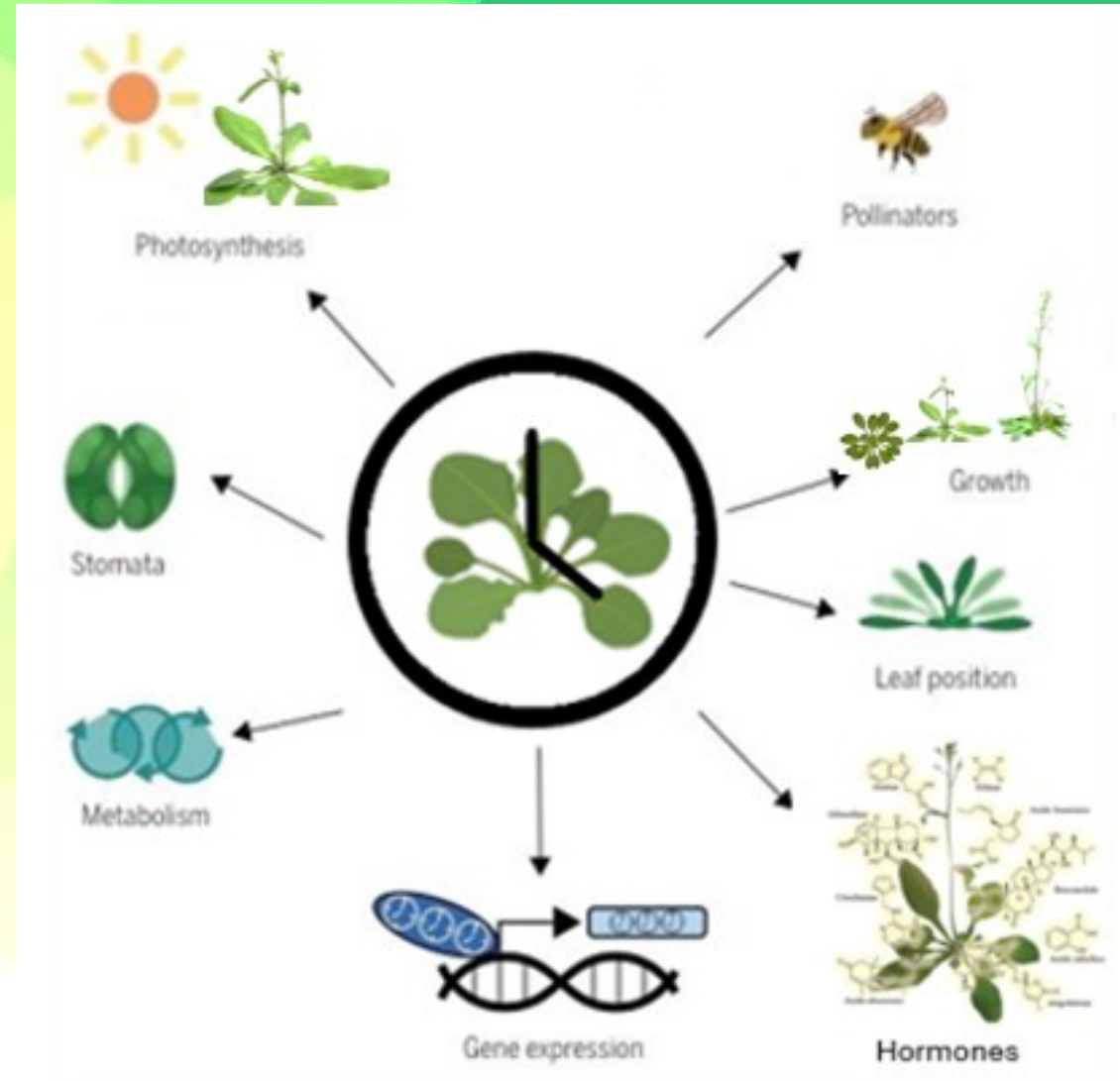
**CECILIA MARIA TOTTI**

**Sessione Autunnale – dicembre 2024**

**Anno Accademico 2023/2024**

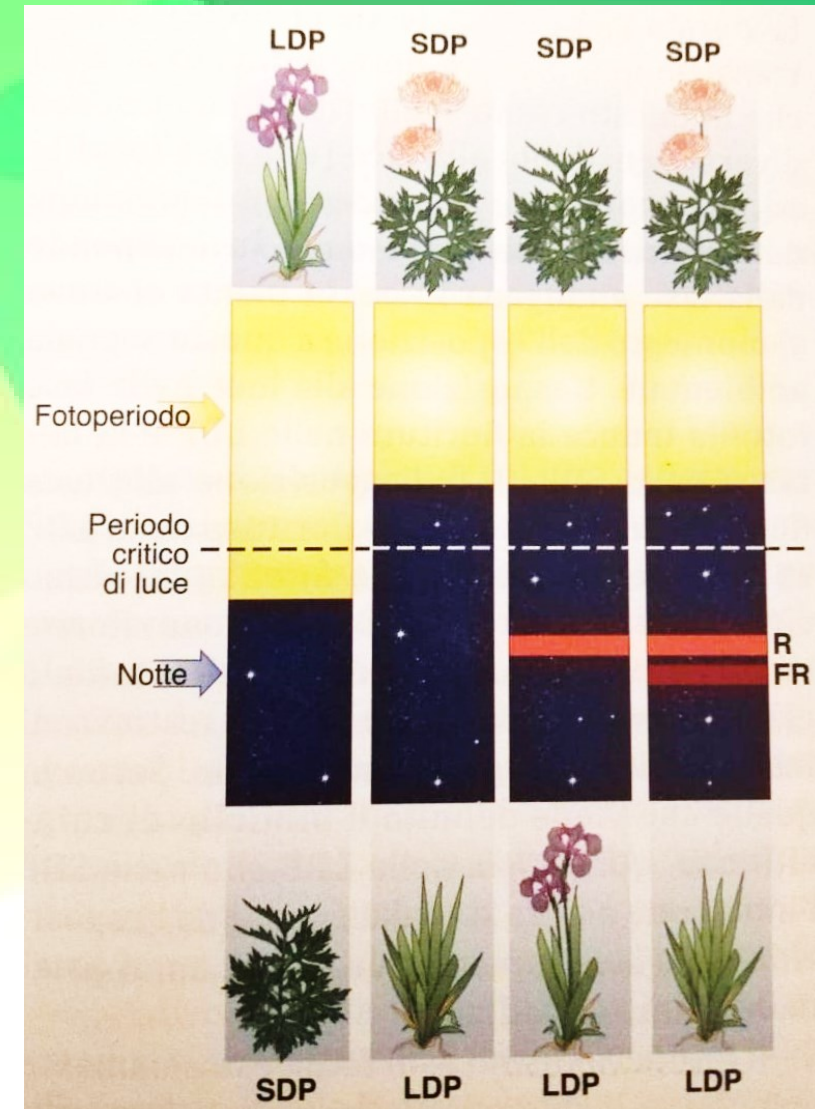
# OROLOGIO CIRCADIANO

- Circadiano è formato da due parole latine: *circa* 'intorno' e *dies* 'giorno'.
- Rappresenta il cronometro interno degli organismi viventi attraverso il quale:
  - misurano il tempo: come un oscillatore che genera segnali ritmici di 24h;
  - anticipano le variazioni ambientali: come i cambiamenti stagionali
- Regola processi giornalieri e stagionali.



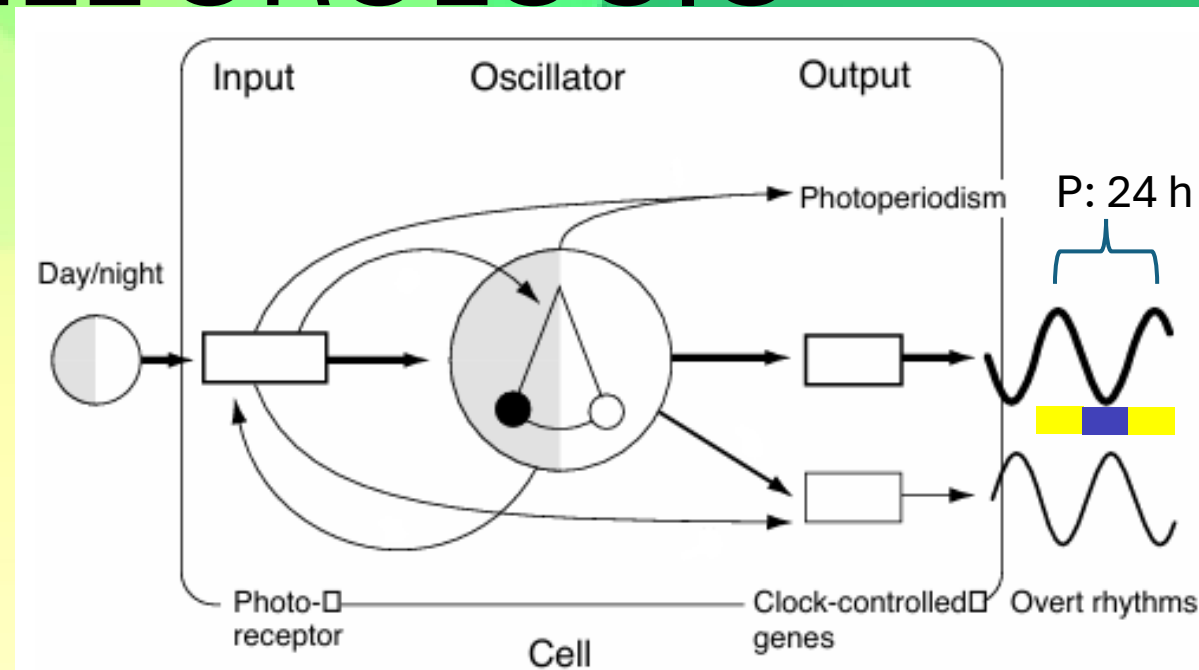
# MISURAZIONE DEL FOTOPERIODO

- **Fotoperiodo:** capacità delle piante nel percepire la durata del giorno in ore di luce, sincronizzando un dato evento di sviluppo con un preciso periodo dell'anno.
- Un esempio di risposta fotoperiodica è l'induzione della fioritura.
  - LDP: Long Day Plant (piante longidiurne)
  - SDP: Short Day Plant (piante brevidiurne)
- Le piante fotoperiodiche ricavano la durata del giorno dalla misurazione della notte.
- L'induzione o l'inibizione della fioritura da parte della luce dipende dalla fase endogena appropriata in cui la pianta si trova.



# STRUTTURA DELL'OROLOGIO

- Modello base:
  - **Input:** segnali in entrata (luce) che sincronizzano l'oscillazione
  - **Oscillatore centrale:** meccanismi molecolari che generano ritmi circadiani
  - **Output:** determina i ritmi osservabili



Kondo T., Ishiura M., *The circadian clocks of plants and cyanobacteria*, in *Trends in plant science reviews*, a. 1999, n. 4, pag. 171-176

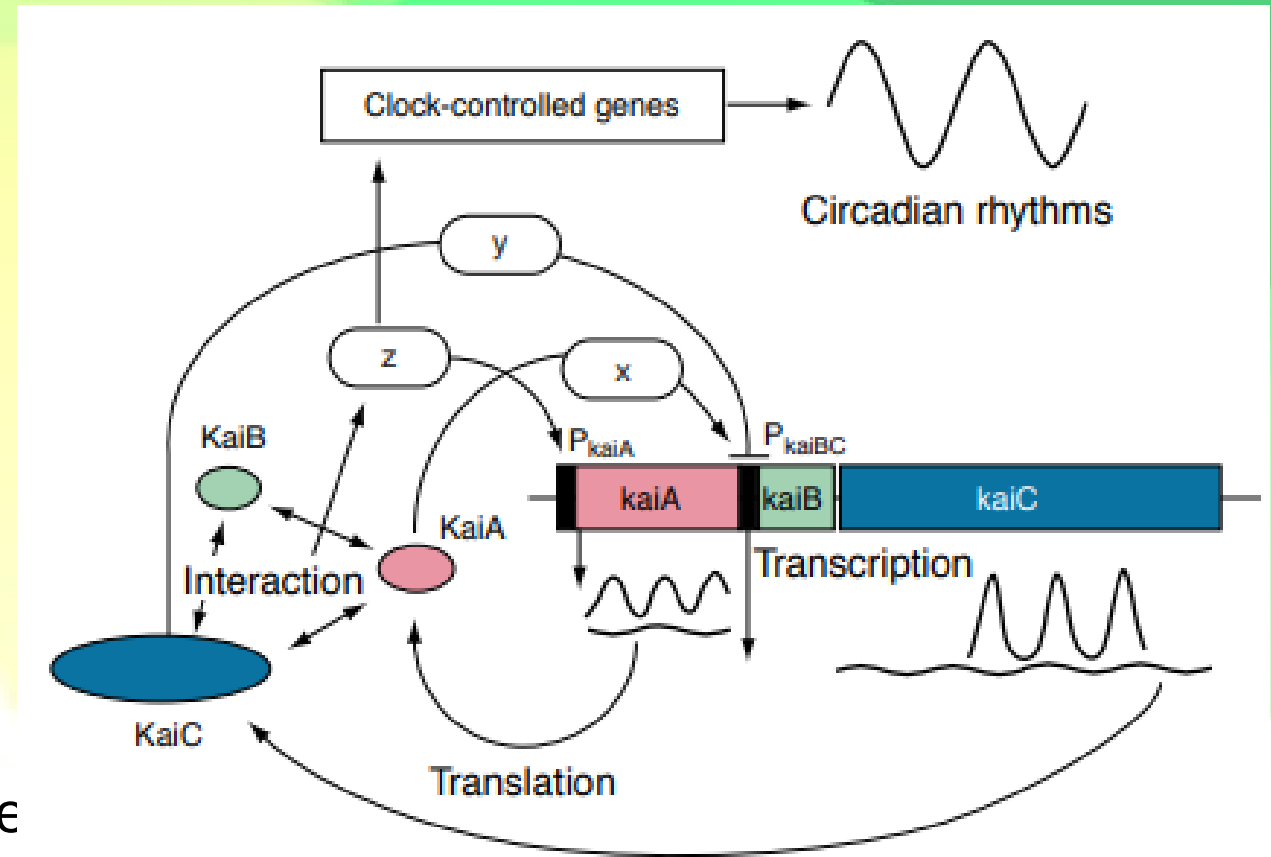
In realtà i sistemi circadiani sono molto più complessi e sul circuito dell'oscillatore centrale si inseriscono altri circuiti interconnessi da feedback trascrizionali.

Tre caratteristiche diagnostiche dell'oscillazione circadiana:

- Periodicità di circa 24 ore
- Resettabilità
- Indipendenza dalla T

# OROLOGIO DEI CIANOBATTERI

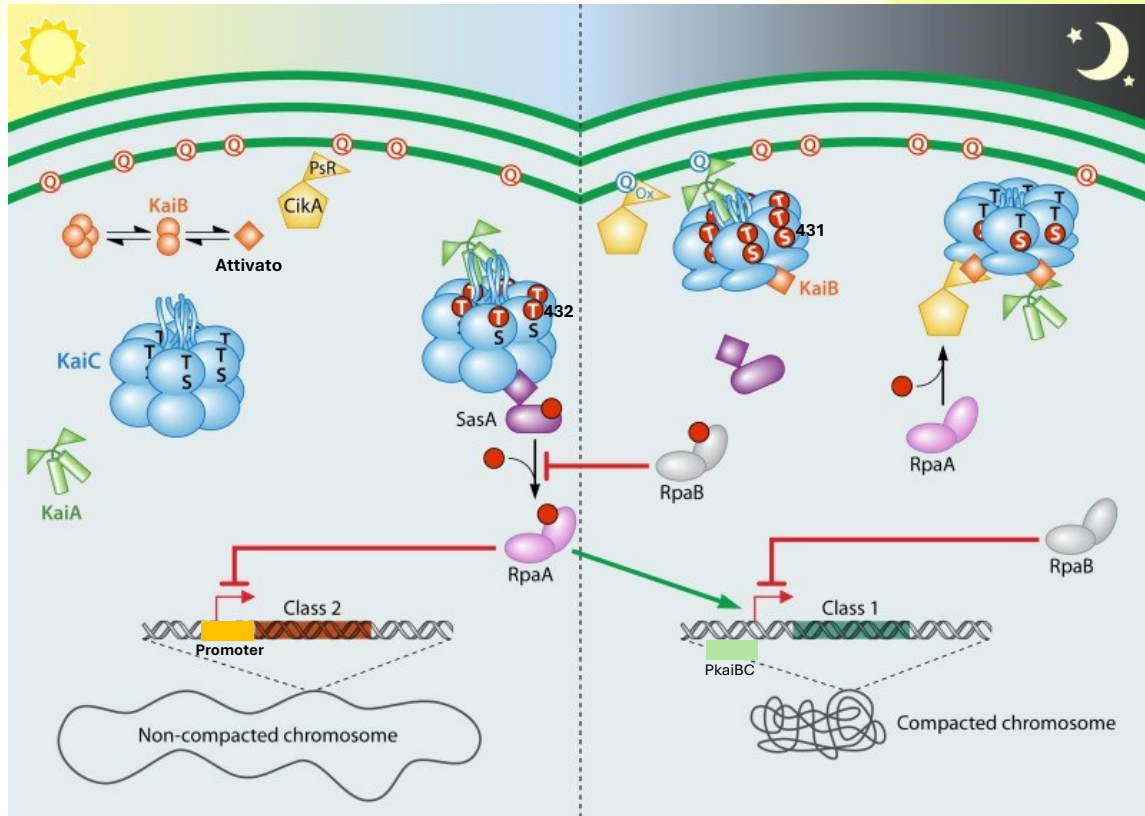
- *Synechococcus elongatus* è il procariote **modello** per studiare i dettagli molecolari e la regolazione dell'orologio.
- È stato trovato un cluster genico chiamato *kai* ('ciclo' in giapponese), formato da tre geni: ***kaiA***, ***kaiB*** e ***kaiC***.
- Il cluster è trascritto da due promotori ***PkaiA*** e ***PkaiBC***.
- La proteina KaiC sovraespressa inibisce l'espressione di *kaiBC* e genera un'oscillazione circadiana.
- La proteina KaiA sovraespressa sostiene l'oscillazione promuovendo l'espressione di *kaiC*.



# OROLOGIO DEI CIANOBATTERI

## Di giorno:

- Kai A interagisce con KaiC → autofosforilazione T432 di KaiC
- SasA interagisce con KaiC → autofosforilazione SasA → fosfotrasferimento RpaA
- RpaA-P promuove espressione *kaiB* e *kaiC*



## Di notte:

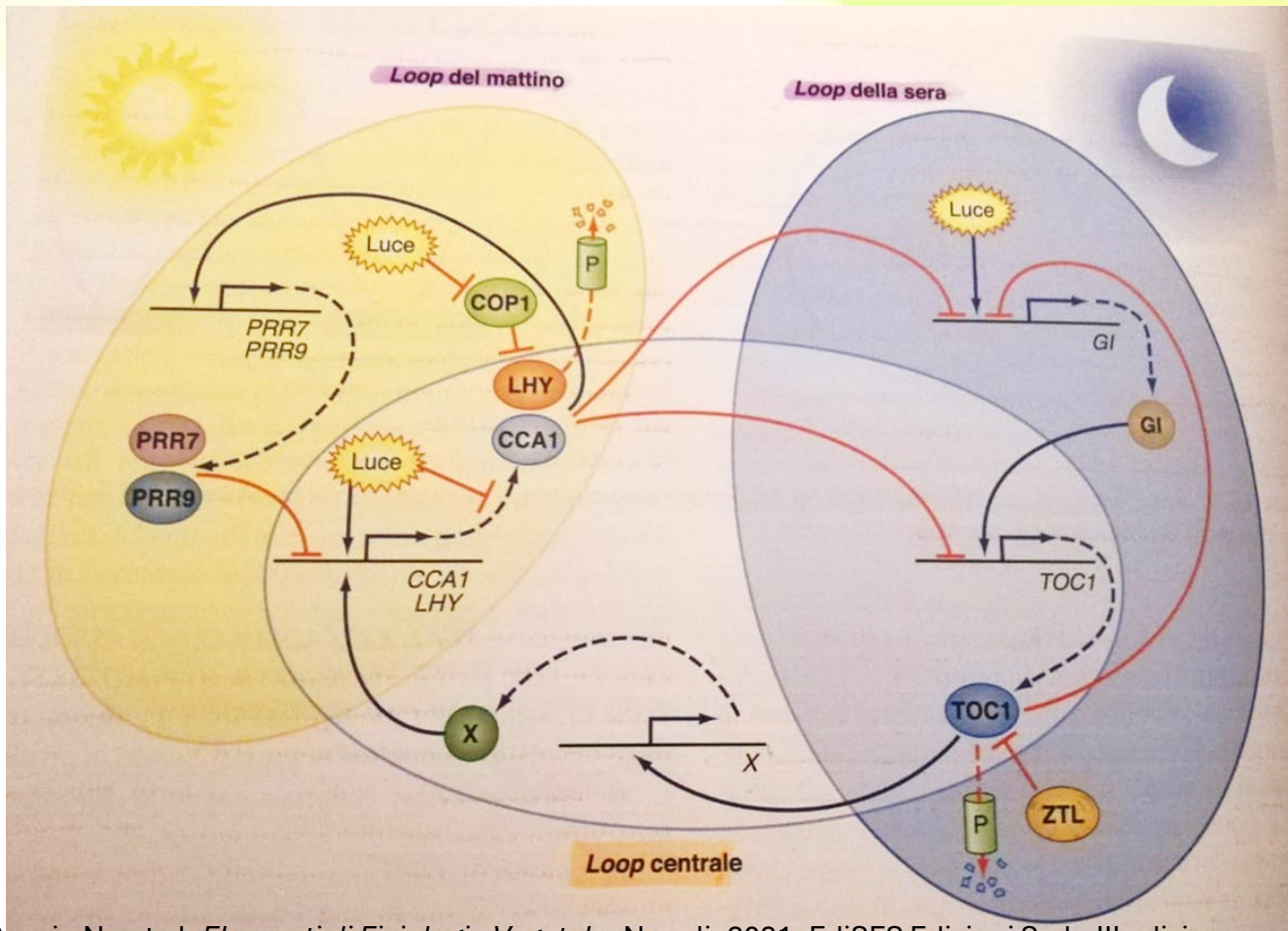
- Autofosforilazione S431 di KaiC → cambiamento conformazionale KaiC
- Kai B attivo compete con SasA per legare KaiC → sequestra KaiA → promuove la defosforilazione di KaiC.
- CikA e KaiA competono per il legame a KaiB → defosforilazione RpaA
- RpaA inibisce espressione di *kai B* e *kaiC*

# OROLOGIO DELLE PIANTE

- In *Arabidopsis* sono stati scoperti due geni omologhi *CCA1* e *LHY* che codificano per fattori di trascrizione della famiglia MYB comune a tutti gli eucarioti.
- L' Oscillatore centrale di *Arabidopsis* è composto da tre geni definiti dell'orologio:
  - ***CCA1*** (Circadian Clock-Associated 1)
  - ***LHY*** (Late Elongated Hypocotyls)
  - ***TOC1*** (Timing of Cab Expression 1 o Pseudo Response Regulator): regola positivamente l'espressione dei geni *CCA1* e *LHY*.
- Questi geni sono coinvolti in un circuito di feedback trascrizionale negativo che imprime il ritmo dell'orologio.

# Loop centrale

- All'alba: picco di espressione dei geni *LHY* e *CCA1* attivati da luce (rossa e blu) e proteina *TOC1* (indirettamente) → Le proteine *LHY* e *CCA1* inibiscono la trascrizione del gene *TOC1*.
- Al crepuscolo: progressiva diminuzione di *LHY* e *CCA1* → aumenta la sintesi di *TOC1*.



## Loop del mattino

- *LHY* e *CCA1* promuovono l'espressione di *PRR7* e *PRR9* che inibiscono i geni *LHY* e *CCA1*.

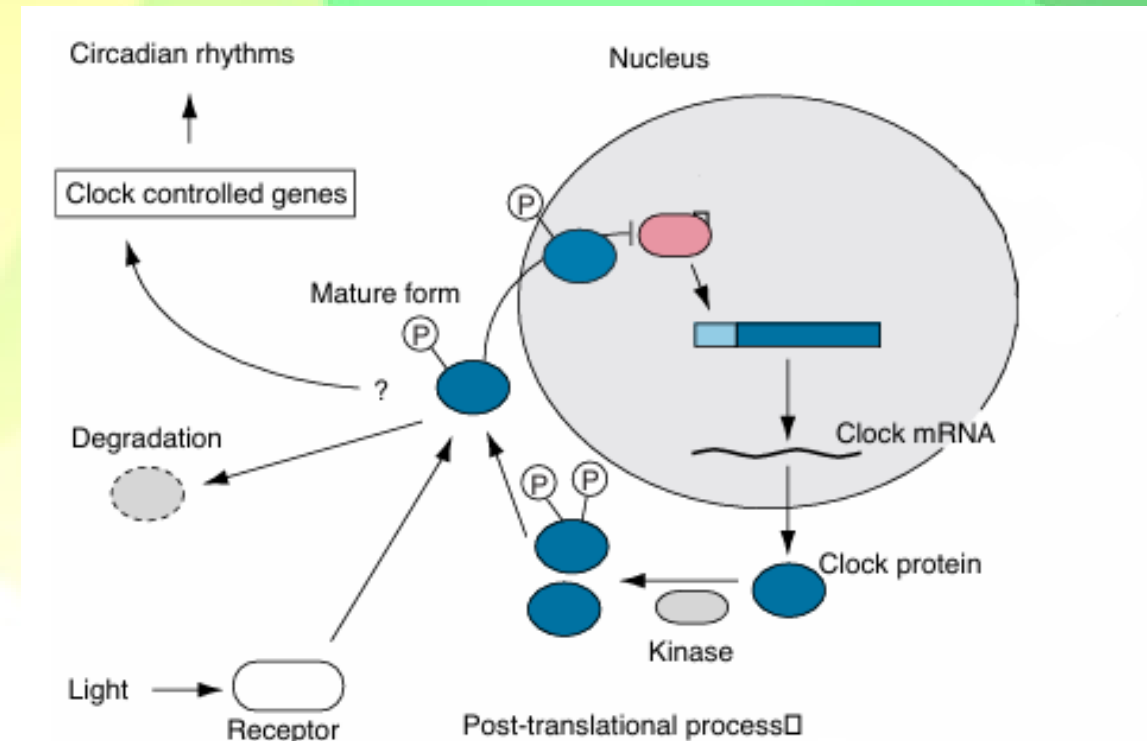
## Loop della sera

- Viene trascritto il gene *G1* la cui proteina regola positivamente l'espressione di *TOC1*.
- *TOC1* inibisce l'espressione di *G1* → diminuzione *LHY* e *CCA1*.



## Ulteriori meccanismi di regolazione nelle piante

- Meccanismi post-trascrizionali sulla stabilità degli mRNA: mRNA di CCA1 è instabile alla luce e stabile al buio, quindi si induce la degradazione dell'mRNA.
- Meccanismi post traduzionali di fosforilazione/defosforilazione: per modulare la stabilità e l'attività delle proteine. È condotta da specifiche protein-chinasi e fosfatasi o attraverso la demolizione con la via ubiquitina /proteosoma 26S.
- Cambi nella struttura della cromatina: si verificano andamenti ritmici di acetilazione degli istoni che rendono accessibile il DNA per la trascrizione.
- Questo meccanismo interviene nell'espressione del gene *TOC1* ed è modulato dal fotoperiodo.



# EVOLUZIONE DELL'OROLOGIO CIRCADIANO

- Si riteneva che il sistema circadiano fosse evolutivamente conservato, ma è stato osservato in diverse specie che nelle proteine chiave non c'è somiglianza di sequenza.
- È più probabile che gli orologi si siano sviluppati più volte in organismi diversi e la selezione naturale, in ambienti alternativi, ha apparentemente portato a un'evoluzione di proprietà fisiologiche simili.
- I geni *kai* presenti in diverse specie di cianobatteri sono interessanti per l'evoluzione dei sistemi circadiani per due motivi:
  - Gli omologhi dei geni *kai* non si trovano nei database di eubatteri o eucarioti, ma sono presenti presunti omologhi di *KaiB* e *KaiC* nei database genomici degli Archea.
  - Possibile relazione tra l'orologio dei cianobatteri e quello delle piante. È possibile che i geni *kai* siano stati incorporati nelle cellule vegetali ancestrali insieme ai geni fotosintetici.
- Fino ad oggi, non è stato trovato alcun omologo di *Kai* in *Arabidopsis*.

# RIASSUNTO

L'orologio circadiano è il meccanismo interno attraverso il quale gli organismi misurano il tempo e anticipano le variazioni ambientali. Regola processi giornalieri come la fotosintesi, la crescita vegetativa, il movimento delle foglie, il metabolismo, l'espressione genica e processi stagionali come la fioritura. La misura del tempo (fotoperiodo) permette di sincronizzare gli eventi di sviluppo, come la fioritura, rispetto ad un determinato periodo dell'anno. Le piante rilevano la quantità di luce durante il giorno e lo confrontano ad un periodo critico di luce. Quando la quantità di luce supera il periodo critico le piante longidiurne fioriranno, invece, quando la quantità di luce è inferiore fioriranno le brevidiurne. Il modello base del sistema circadiano è formato da un oscillatore centrale che, attraverso meccanismi molecolari, genera degli output in risposta ad input che provengono dall'ambiente. Si pensava che gli orologi circadiani fossero presenti solo negli organismi eucarioti, ma in *Synechococcus elongatus* è stato individuato un orologio formato dai geni *kaiA*, *kaiB* e *kaiC*. Le tre proteine corrispondenti insieme generano oscillazioni circadiane nella fosforilazione della proteina KaiC. Questo oscillatore post-traduzionale proteico è incorporato in un ciclo di feedback trascrizione-traduzione che regola l'espressione dell'operone *kaiBC*. Nelle piante i geni dell'orologio sono *LHY*, *CCA1* e *TOC1* e attraverso un circuito di feedback negativo imprimono il ritmo all'orologio, insieme ad altri loop addizionali che si interconnettono nell'oscillatore centrale. Oltre ai meccanismi trascrizionali, nelle piante regolano i ritmi circadiani anche la stabilità dell'mRNA, la stabilità delle proteine e lo stato di condensazione della cromatina. Le proteine dell'orologio non sono omologhe nelle specie vegetali, quindi i meccanismi dell'orologio non sono conservati ma sono frutto della convergenza evolutiva.

# BIBLIOGRAFIA

Bünning E. (1960) Circadian rhythms and the time measurement in photoperiodism. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25, Biological Clocks Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 249-256.

Cohen S.E., Golden S.S. (2015) Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(4): 373-385.

Hamner K.D. (1960) Photoperiodism and circadian rhythms. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25, Biological Clocks Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 269-277.

Huang T.C. et al (1990) Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiology*, 92(2): 531-533.

Ishiura M. et al (1998) Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 19(13): 3349-3357.

Kondo T., Ishiura M. (1999) The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends in Plant Science*, 4(5): 171-176.

Liu Y. et al (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes & Development*, 9: 1469-1478.

Rascio N. et al, *Elementi di Fisiologia Vegetale*, Napoli, 2021, EdiSES Edizioni S.r.l., III edizione.

Srivastava D., Md.Shamim, et al (2019) Role of circadian rhythm in plant system: An update from development to stress response. *Environmental and Experimental Botany*, 162(24): 256-271.