

Orologi biologici circadiani: meccanismi molecolari autorigeneranti che mantengono il ritmo

Simona GAUDI, Grigor ZORAQI, Vincenzo FALBO e Domenica TARUSCIO

Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Gli orologi biologici circadiani sono oscillatori endogeni, autorigeneranti, i cui geni, espressi ritmicamente, controllano molti fenomeni biologici a complessità differente. Sono presenti dai procarioti all'uomo e le loro basi molecolari sembrano essere simili nella maggior parte degli organismi viventi. In questo lavoro verranno descritti i meccanismi fondamentali alla base del funzionamento degli orologi biologici circadiani e discusso il loro possibile ruolo in alcune patologie umane.

Parole chiave: ritmi biologici, orologi biologici circadiani, malattie, meccanismi molecolari.

Summary (*Biological circadian clocks: selfsustaining molecular mechanisms that drive the rhythm*). - Biological circadian clocks are endogenous selfsustaining oscillators, where periodically expressed genes control functions at all levels of biological organization. These mechanisms are detectable from prokaryotes to humans, and their basic molecular components are common in most living organisms. This review focusses on the basic properties of biological circadian clocks and their possible involvement in human diseases.

Key words: biological rhythms, biological circadian clocks, diseases, molecular mechanisms.

Introduzione

Il tempo rappresenta una dimensione essenziale negli esseri viventi. Il tempo biologico è sia lineare (tempo cronologico) che ciclico (tempo periodico). La cronobiologia prende in considerazione gli eventi biologici ciclici, o periodici, che si ripetono con diverse frequenze e che vengono quindi definiti ritmi biologici [1].

L'attività ritmica è fondamentale per gli esseri viventi; un organismo, così come tutte le sue componenti, non funziona costantemente, ma presenta oscillazioni qualitative e quantitative nei suoi processi biologici. L'esistenza di ritmi biologici è una caratteristica peculiare di tutti gli organismi viventi, da quelli unicellulari all'uomo e sono presenti a tutti i livelli di organizzazione: dall'organismo, ai tessuti, alle cellule e alle strutture subcellulari [2].

Una distribuzione così generalizzata dei ritmi biologici giustifica l'interesse scientifico crescente per identificarne sia il valore funzionale che le basi cellulari e molecolari che ne garantiscono il mantenimento [3, 4].

Tra i ritmi biologici più studiati, in quanto giocano un ruolo fondamentale nelle funzioni degli esseri viventi, vi sono quelli con periodicità di circa 24 ore, definiti ritmi circadiani (*circa dies*: quasi un giorno) [5].

Tali ritmi sono di estrema importanza in quanto consentono all'organismo di sincronizzarsi e reagire adeguatamente ai cambiamenti ambientali.

Una delle prime osservazioni riguardo l'esistenza di una ritmicità circadiana nelle funzioni biologiche fu fatta da Jacques De Mairan nel 1729 [6]. Questo astronomo francese osservò che l'apertura e la chiusura delle foglie avveniva con periodicità giornaliera anche in condizioni sperimentali di buio assoluto e di temperatura costante; ne concluse quindi che doveva esistere un meccanismo interno di misurazione del tempo: un orologio biologico endogeno.

Il ritmo biologico mantenuto dall'organismo anche in condizioni di temperatura e luce costanti viene definito a corso libero *free-running* [7].

Numerose evidenze sperimentali hanno portato alla conclusione che l'esistenza e la conservazione di una ritmicità circadiana *free-running* è dovuta alla presenza di meccanismi altamente specializzati, endogeni, in grado di autorigenerarsi durante le 24 ore, definiti orologi biologici circadiani [8].

Tali orologi, detti anche *pacemaker*, sono preposti alla coordinazione centrale della cadenza ritmica di alcune funzioni biologiche a livello dell'organismo, in quanto consentono sia alla singola cellula che all'organismo di sincronizzarsi in relazione alle diverse necessità del periodo giorno/notte e rispondere con estrema efficienza alle variazioni ambientali.

Gli orologi biologici circadiani sono comparsi precocemente nell'albero filogenetico e quindi, si presuppone in loro l'esistenza di meccanismi comuni per tutte le specie dello spettro evolutivo [10-14].

Un sistema biologico circadiano è costituito in genere da tre componenti fondamentali e ben distinte:

a) la prima è definita *input* e consiste di uno o più segnali esogeni che mettono in relazione l'orologio biologico endogeno con l'ambiente geofisico che lo circonda; un esempio di *input* periodico circadiano è l'alternanza luce/buio (giorno/notte);

b) la seconda è l'orologio biologico propriamente detto, ovvero l'oscillatore endogeno autonomo, localizzato all'interno di ogni cellula;

c) la terza è indicata come *output* e consiste nella trasduzione della periodicità biologica dell'oscillatore in un cambiamento del comportamento cellulare, del tessuto, dell'organo e dell'organismo. Esempi di *output* sono: la secrezione ciclica ormonale, il ritmo attività-riposo, il ritmo dell'assunzione di cibo, la variazione giornaliera della temperatura corporea, ecc. [4].

Ogni orologio biologico circadiano è un oscillatore endogeno ed è costituito almeno in parte da un circuito a regolazione negativa in cui le proteine, responsabili dell'oscillazione, agiscono da repressori della trascrizione dei propri geni. Tale meccanismo dà origine, in associazione anche a fattori di regolazione positiva, a variazioni cicliche dei livelli di RNA e di proteine dell'orologio biologico che consentono il mantenimento del ritmo circadiano [3].

Tali orologi sono definiti autoscillanti in quanto, grazie alla presenza di circuiti endogeni complessi, sono in grado di mantenere il proprio ritmo e funzionare (oscillare) indipendentemente dalle condizioni ambientali.

L'orologio biologico circadiano propriamente detto è fortemente conservato nella maggior parte degli organismi viventi, pertanto deve possedere caratteristiche morfo-funzionali simili, mentre le componenti *input* e *output* possono essere diverse e specie-specifiche [4].

In alcune specie la sede di ricezione dell'*input* ed il *pacemaker* coesistono in un'unica struttura: le stesse cellule che contengono l'orologio circadiano sono anche la sede di ricezione dell'*input*. In questo caso si parla di interazione diretta, un esempio è rappresentato dalla ghiandola pineale che negli uccelli, rettili e pesci è contemporaneamente la sede delle cellule fotosensibili (sede di ricezione dell'*input*) e dell'attività del *pacemaker* [4, 12].

In altre specie, l'*input* e il *pacemaker* sono localizzate in strutture diverse. Nei mammiferi, ad esempio la retina raccoglie lo stimolo luminoso (*input*), questo viene trasmesso attraverso il fascio retino-ipotalamico all'orologio circadiano che ha sede nei nuclei soprachiasmatici (NSC). Gli NSC, localizzati nella parte anteriore dell'ipotalamo, sono costituiti da migliaia di neuroni che funzionano con attività circadiana e sono in rapporto anatomico-funzionale con la ghiandola pineale; questa a sua volta regola in modo circadiano la sua produzione di melatonina [15, 16].

L'evidenza sperimentale che gli NSC siano la sede di un importante *pacemaker* nei mammiferi, deriva da esperienze dirette di stimolazione e distruzione dei nuclei stessi. Nel ratto, a seguito della stimolazione elettrica e/o farmacologica di questi nuclei, si assiste ad uno slittamento di fase di alcuni ritmi circadiani [17]. Un esempio è rappresentato dall'iniezione diretta del fattore di crescita delle cellule neuronali (*nerve growth factor*, NGF) a livello degli NSC del criceto, che induce un avanzamento di fase del ritmo circadiano, paragonabile allo slittamento indotto dalla luce [18].

Nel ratto, lesioni a carico degli NSC portano ad un cambiamento dell'organizzazione del sonno: la gravità dell'alterazione del sonno è in funzione dell'ampiezza della regione lesa [19].

Esperimenti successivi nel criceto hanno dimostrato che la rimozione chirurgica di più del 75% degli NSC promuove l'annullamento della ritmicità circadiana dell'attività locomotoria, dell'assunzione di cibo, della pressione arteriosa, della temperatura corporea e della secrezione di alcuni ormoni, quali ad esempio la melatonina e la prolattina. Dopo questa drastica asportazione, le funzioni ritmiche non riprendono, ma possono essere ristabilite solo se vengono trapiantate cellule degli NSC di un altro criceto donatore; in tal modo si ottiene una ripresa delle funzioni ritmiche che mostrano tutte le caratteristiche del *pacemaker* circadiano dell'individuo donatore e non quelle del ricevente [17].

Numerosi dati sperimentali hanno evidenziato che nei mammiferi gli NSC rappresentano l'orologio biologico circadiano primario, dal quale dipende il controllo degli orologi circadiani secondari; tuttavia non è stato ancora completamente chiarito il meccanismo mediante il quale gli NSC modulano l'azione dei *pacemaker* periferici.

Gli NSC, in seguito alla stimolazione effettuata dall'*input* (es. la luce) inducono l'espressione differenziata di alcuni fattori di trascrizione, quali *c-fos* e *junB*, che potrebbero dare inizio ad una serie di eventi a cascata responsabili della modulazione dell'azione del *pacemaker* principale. Dati sperimentali dimostrano che l'inibizione dell'azione di *c-fos* e *junB*, mediante oligonucleotidi antisense, annulla lo slittamento di fase del ciclo circadiano indotto dalla luce [20].

Recenti studi hanno evidenziato nella retina di criceto, la presenza di un altro oscillatore circadiano, geneticamente programmato che regola la sintesi di melatonina, avvalorando la tesi della coesistenza di molteplici oscillatori biologici negli organismi pluricellulari [21].

L'esistenza di più orologi biologici circadiani indipendenti all'interno di un unico organismo viene dimostrata anche in *Drosophila melanogaster*. Un esempio è costituito dai tubuli del Malpighi, che funzionando come un rene, agiscono anche da

fotorecettori indipendenti esprimendo geni tessuto-specifici in accordo con i ritmi circadiani [22]. Questi risultati dimostrano che le cellule di tessuti isolati sono in grado di compiere oscillazioni circadiane indipendenti, anche in assenza del controllo degli orologi superiori, quali ad esempio gli NSC dei mammiferi.

Pertanto, ogni organismo pluricellulare è regolato da un insieme di orologi biologici circadiani, questi includono sia i semplici orologi contenuti in una singola cellula che quelli più complessi presenti nel sistema nervoso centrale; il risultato delle loro interazioni porta ad una modulazione circadiana della fisiologia dell'organismo.

Il sistema circadiano dell'uomo è costituito da una molteplicità di oscillatori autorigeneranti che sono interconnessi e che a loro volta possono essere sincronizzati da fattori ambientali, denominati dal tedesco *Zeitgeber*s (sincronizzatori). L'organizzazione temporale delle funzioni biologiche di un individuo viene assicurata dall'interazione di questi fattori [23].

Nell'uomo alcuni esempi di funzioni biologiche con andamento circadiano sono: la temperatura corporea, la produzione di vari ormoni, il ciclo sonno/veglia, la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca.

L'andamento circadiano della temperatura corporea è sicuramente molto studiato, questa aumenta al risveglio, mentre diminuisce prima di andare a dormire; l'aumento mattutino della temperatura è evidente anche in assenza di luce e l'intero ritmo è mantenuto anche in pazienti sia sani che febbricitanti durante il riposo continuo. Ciascun individuo ha uno schema costante e caratteristico, e la curva crescente della temperatura corporea mostra una differenza misurabile tra individui. Il centro della termoregolazione è localizzato a livello dell'ipotalamo che agisce, pertanto, da orologio circadiano specifico per la termoregolazione [24].

Un altro esempio importante è rappresentato dalle variazioni nictemerali di ormoni, quali ad esempio il cortisolo e l'ormone tireotropo (*thyroid-stimulating hormone*, TSH).

In particolare, la regolazione circadiana dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenalico può essere osservata nelle variazioni dei livelli di cortisolo che fluttuano fra valori massimi, osservabili nelle prime ore del mattino, e livelli minimi presenti intorno a mezzanotte. È interessante notare che queste fluttuazioni sono abolite in condizioni patologiche, come nella sindrome di Cushing (caratterizzata da elevati livelli di cortisolo) [25].

In condizioni sperimentali che implicano un regime diverso di attività/sonno, l'aumento dei corticosteroidi plasmatici avviene durante il periodo del sonno, questo è stato ad esempio osservato in persone che lavorano abitualmente di notte e che quindi mostrano un adattamento del ritmo in cui le massime concentrazioni plasmatiche coincidono con l'inizio del lavoro [26].

Inoltre, una notevole ritmicità circadiana si manifesta anche nell'escrezione dell'adrenalina e dell'aldosterone. I livelli urinari di adrenalina raggiungono il massimo nel primo pomeriggio mentre i livelli di aldosterone salgono durante la mattina fino a raggiungere un massimo verso mezzogiorno. Studi sperimentali hanno evidenziato che, fra le altre attività, questa ritmicità surrenalica è responsabile della variazione circadiana nei livelli di eosinofili; la diminuzione del livello di eosinofili nel primo mattino è una conseguenza dell'aumento mattutino del livello plasmatico di corticosteroidi. Gli steroidi iniettati al mattino in soggetti normali provocano una diminuzione del livello di eosinofili mentre i soggetti affetti dalla malattia di Addison (caratterizzata da insufficienza di ormoni adrenocorticali) non mostrano una reazione simile [27].

Lo studio dei ritmi circadiani ha portato contributi anche in campo clinico mediante l'introduzione nella pratica medica della cronodiagnosi utile nel monitoraggio dell'ipertensione e delle malattie cardiovascolari [28, 29].

La grande attenzione rivolta all'identificazione e allo studio dei ritmi circadiani ha apportato enormi vantaggi nella individuazione di stati patologici legati alle alterazioni del ritmo circadiano, le modificazioni del ciclo circadiano possono essere la causa di alcune malattie o avere valore predittivo per alcuni stati patologici.

Un settore sicuramente tuttora in via di sviluppo è rappresentato dalla cronoterapia, la possibilità cioè di poter identificare un tempo ottimale in cui somministrare il farmaco per poterne migliorare l'azione e diminuirne gli effetti collaterali [30].

Le differenze individuali della struttura del ritmo circadiano sono il risultato della complessa interazione di più fattori quali la variabilità genetica, lo stile di vita, l'età, lo stato di salute che contraddistinguono ogni singolo individuo.

Questa revisione della letteratura sugli orologi biologici circadiani vuole evidenziare le attuali conoscenze riguardo le basi genetiche dell'orologio vero e proprio; inoltre verranno brevemente analizzate le possibili correlazioni tra mutazioni a carico di alcuni geni fondamentali per il mantenimento del ritmo circadiano e l'insorgenza di determinate malattie.

Le componenti molecolari di un orologio biologico circadiano

Uno dei quesiti fondamentali nello studio degli orologi biologici circadiani è la comprensione del loro funzionamento. Per capire come gli orologi biologici circadiani siano in grado di autorigenerarsi e mantenere la loro periodicità di 24 ore, è necessario identificare le basi molecolari che consentono al congegno di funzionare (oscillare).

La forte pressione selettiva del ciclo giorno/notte ha verosimilmente fatto in modo che organismi evolutivamente molto distanti potessero sviluppare e conservare meccanismi simili e altamente vantaggiosi quali gli orologi biologici circadiani. Infatti, l'esistenza di questi orologi è stata individuata in specie evolutivamente molto distanti, quali batteri, funghi, insetti e mammiferi [13, 14].

L'isolamento e la caratterizzazione di alcuni mutanti del ritmo circadiano, in organismi quali *Cyanobacteria*, *Neurospora*, *Drosophila*, topo e uomo, hanno consentito l'identificazione di alcuni geni responsabili del funzionamento dell'orologio biologico circadiano [31-37].

Partendo dall'organismo meno complesso, quale la *Neurospora*, fino all'uomo, si illustreranno alcuni dei meccanismi di regolazione, sia positivi che negativi, alla base del funzionamento degli orologi biologici circadiani.

Neurospora

Il gene *frequency* (*frq*) è responsabile della sincronizzazione del ciclo di sporulazione asessuata in *Neurospora* [32].

L'isolamento di un mutante di questo gene ha portato alla formulazione di un modello di regolazione ciclica fondamentale per la comprensione del meccanismo di autorigenerazione dell'orologio biologico circadiano. Il gene *frq* codifica per due forme alternative di proteina FRQ, rispettivamente di 989 e di 890 aminoacidi, entrambe coinvolte nella sporulazione asessuata [33, 34]. I livelli di espressione di mRNA e la sintesi di proteine FRQ sono ciclici. Infatti, se si analizzano le oscillazioni a partire dalla mezzanotte, quando i livelli di mRNA e di proteine sono bassi, si osserva un aumento della trascrizione che raggiunge il suo massimo nelle 10-12 ore successive. Questo aumento della trascrizione di *frq* è dovuto all'azione di un eterodimero costituito da due proteine *whitcollar1* (WC1) e *whitcollar2* (WC2) [38]. Tali proteine sono elementi di regolazione positiva e presentano un dominio, denominato PAS, caratteristico di una superfamiglia di fattori di trascrizione (*per*, ARNT, *sim*: PAS). Questo dominio è responsabile dell'interazione tra proteine e quindi consente la formazione di omo-, eterodimeri.

Inoltre, le proteine WC1 e WC2 posseggono entrambe un dominio Zn finger in grado di legare specificamente il DNA; grazie alla presenza di questi domini l'eterodimero WC1-WC2 si lega al promotore del gene *frq* e ne promuove la trascrizione [39, 40]. Dopo un intervallo di tempo le proteine FRQ vengono sintetizzate nel citoplasma ed entrano nel nucleo dove interagiscono con il dimero WC1-WC2 [34, 41]. Questa interazione contrasta l'attivazione della trascrizione del gene *frq* da parte dell'eterodimero, e quindi la proteina FRQ regola negativamente la trascrizione del suo gene.

Studi di cinetica hanno dimostrato che la proteina FRQ rimane nel nucleo ad alti livelli, mantenendo represso lo stato di trascrizione del gene *frq* fino a tarda notte. Durante questo periodo, la proteina FRQ precedentemente fosforilata, viene degradata; la mancata trascrizione del gene *frq* e la contemporanea degradazione del prodotto proteico abbassano i livelli della proteina FRQ, che non è più in grado di esercitare la sua regolazione negativa. Al mattino, in risposta alla luce, le proteine WC1 e WC2, attivano la trascrizione del gene *frq* dando inizio ad un nuovo ciclo di regolazione [38], come rappresentato schematicamente in Fig 1.

Drosophila

Nella *Drosophila* sono stati identificati 5 geni implicati nel funzionamento dell'orologio biologico circadiano: *period* (*per*) [42], *timeless* (*tim*) [43, 44], *Drosophila clock* (*dClk*) [45], *cycle* (*Cyc*) [46], e *doubletime* (*dbt*) [47, 48].

L'analisi dell'espressione dei geni *per* e *tim* ha rivelato la loro natura ritmica. In particolare, i messaggeri di *per* e *tim*, all'inizio del giorno sono presenti a bassa concentrazione, poi, con il trascorrere delle ore, cominciano ad aumentare fino a raggiungere il livello massimo verso mezzogiorno [49, 50, 51]. Responsabili dell'aumento della trascrizione di questi messaggeri sono le proteine dCLK e CYC che agiscono come attivatori della trascrizione [45, 46].

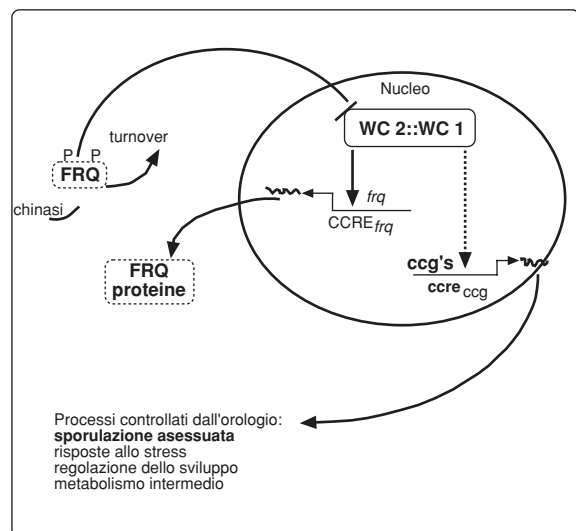


Fig. 1. - Elementi principali e ciclo di regolazione in *Neurospora*. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, mentre quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. *cgc*: *clock controlled gene*, geni controllati dall'orologio; *ccre*: *circadian clock regulatory elements*, elementi regolatori dell'orologio circadiano.

La coespressione di *Clk* e *Cyc* e la formazione dell'eterodimero sono di fondamentale importanza per l'attivazione della trascrizione dei geni *per* e *tim*. Il gene *Clk* è espresso ritmicamente mentre *Cyc* sembra essere espresso costitutivamente [46].

Tali proteine sono caratterizzate dalla presenza del dominio PAS, responsabile della loro dimerizzazione, simile a quello di WC1, WC2 e di PER [52] e di un dominio *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) in grado di legare il DNA [53].

Dopo 2-3 ore dal raggiungimento del livello massimo di trascrizione dei geni *per* e *tim*, inizia la sintesi delle proteine. Raggiunta la concentrazione critica, le proteine PER e TIM [54], formato l'eterodimero PER-TIM, vengono trasportate nel nucleo ed agiscono come regolatori negativi della loro trascrizione interagendo con il dimero CLK-CYC. I livelli dei messaggeri di *per* e *tim* cominciano a diminuire durante le 3 ore successive al tramonto. Verso mezzanotte, contemporaneamente alla diminuzione dei messaggeri di *per* e *tim*, si ha un innalzamento del livello di mRNA del gene *Clk* [55]. L'eterodimero PER-TIM in questo caso agisce come regolatore positivo della trascrizione di *Clk*.

Le proteine PER e TIM sono sintetizzate durante tutta la notte e vengono subito fosforilate dalla proteina DBT, prodotto del gene *dbt* [37, 48]. La fosforilazione influenza i livelli di accumulazione della proteina PER e sembra essere necessaria per il controllo della velocità della sua degradazione. Il controllo della cinetica di degradazione della proteina PER è uno dei punti nodali per il mantenimento dell'oscillazione dell'orologio biologico circadiano [48].

Verso mezzogiorno del giorno seguente i livelli di proteine PER e TIM hanno raggiunto livelli così bassi che non esiste più repressione della loro trascrizione, il dimero CLK-CYC attiva la trascrizione del gene *per* e ricomincia un nuovo ciclo circadiano (Fig. 2).

Mammiferi

Uno dei punti cruciali per l'analisi molecolare del meccanismo circadiano nei mammiferi, è stata l'identificazione del mutante *clock* nel topo, che influenza sia la periodicità che la persistenza del ritmo circadiano. Nei mutanti *clock* si è osservato un ciclo di circa 25 ore nell'eterozigote, e di 27-28 ore nell'omozigote [56].

L'allele *clock* è un mutante dominante-negativo che codifica per una proteina deleta di 51 aminoacidi, chiamata CLOCKO19, nel dominio ritenuto importante per la regolazione della trascrizione [57, 58].

Lo studio della funzione della proteina CLOCK e gli esperimenti di *two-hybrid screen* [37] hanno consentito l'isolamento della proteina BMAL1, omologa alla proteina CYC di *Drosophila*.

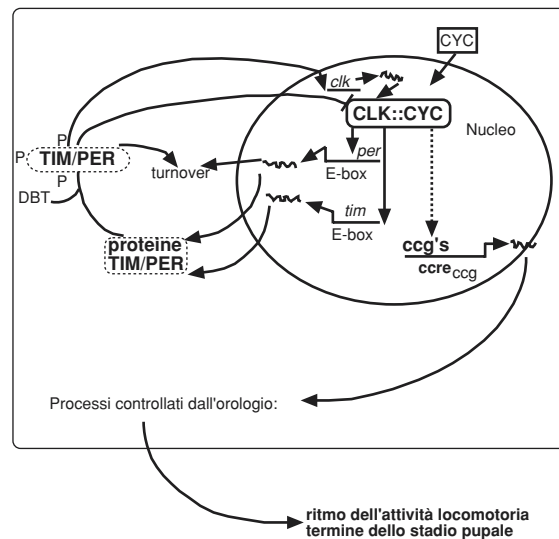


Fig. 2. - Elementi principali e ciclo di regolazione in *Drosophila*. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, le linee a freccia discontinue mostrano un possibile meccanismo positivo di regolazione e quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. *cgc*: *clock controlled gene*, geni controllati dall'orologio; *ccre*: *circadian clock regulatory elements*, elementi regolatori dell'orologio circadiano.

Le due proteine CLOCK e BMAL1 posseggono il dominio PAS, che consente la loro associazione ad eterodimero; inoltre, sia CLOCK che BMAL1, sono caratterizzate dalla presenza di regioni bHLH specifiche per il legame con il DNA a livello delle sequenze E-box (CACGTG) [37].

Il mutante CLOCKO19 forma l'eterodimero con BMAL1, si lega fortemente alle sequenze E-box, ma non è in grado di attivare la trascrizione.

Nel topo e nell'uomo sono stati identificati tre differenti geni *per*, chiamati *mPer1*, *mPer2* e *mPer3* nel topo e *hPer1*, *hPer2* e *hPer3* nell'uomo, ortologi al gene *per* di *Drosophila*, espressi abbondantemente nel NSC e nella retina, ma presenti anche in altri tessuti; tutti questi geni sono stati localizzati su cromosomi diversi e sono presenti in un'unica copia [59-66].

La regione regolativa del gene *mPer1* presenta tre domini E-box che costituiscono le sequenze di legame dei domini bHLH dell'eterodimero CLOCK-BMAL1 [59]. Tale eterodimero si lega alle sequenze E-box ed attiva la trascrizione del gene *mPer1*. Si suppone che l'eterodimero CLOCK-BMAL1 interagisca anche con i geni *mPer2* e *mPer3*, ma al momento mancano evidenze sperimentali che lo dimostrino.

I prodotti dei tre geni *mPer1*, *mPer2* e *mPer3* sono caratterizzati dalla presenza del dominio PAS, ma non presentano alcuna regione che possa costituire un dominio putativo di legame al DNA [64].

In condizioni normali, i livelli di trascrizione di *mPer1*, iniziano ad aumentare a tarda notte, con successivo aumento della trascrizione dei geni *mPer2* e *mPer3*. Questi tre geni hanno un comportamento molto diverso in risposta alla luce; *mPer1* e *mPer2* sono fortemente indotti dalla luce [61], mentre *mPer3* risulta insensibile e l'espressione del suo messaggero rimane costante [67].

Alcune ore dopo l'inizio della trascrizione del gene *mPer1*, si ha un innalzamento dei livelli di proteina PER1 nel citoplasma. La proteina PER1 si associa, grazie al dominio PAS, alla proteina TIM, prodotto dell'espressione del gene *tim*, per formare l'eterodimero PER-TIM. Tale eterodimero entra nel nucleo ed interagisce con l'eterodimero CLOCK-BMAL1 bloccandone l'azione di regolatore positivo della trascrizione del gene *mPer1*.

Nei mammiferi l'espressione del gene *tim* è costitutiva e non sembra oscillare, come invece è stato osservato per il gene ortologo di *Drosophila*.

L'esistenza di tre diverse proteine, PER1, PER2 e PER3, ha fatto nascere l'ipotesi di una loro reciproca interazione per portare alla formazione di eterodimeri differenti PER-PER o PER-TIM con funzioni e ruoli diversificati all'interno dell'orologio biologico circadiano. Studi *in vitro* hanno dimostrato una forte associazione delle proteine PER-PER ed una più debole tra PER e TIM [67].

Recentemente è stato osservato che l'eterodimero CLOCK-BMAL1 non solo attiva la trascrizione di *per*, ma agisce da regolatore positivo anche per la trascrizione di alcuni geni che controllano l'*output*, quali la vasopressina [68].

In Fig. 3 è schematizzato il funzionamento dell'orologio biologico circadiano dei mammiferi [69].

Studi, effettuati in *Drosophila* e *Neurospora*, mettono l'accento sull'importanza delle modificazioni post-traduzionali che avvengono a carico delle diverse proteine coinvolte nel funzionamento dell'orologio biologico circadiano [34, 70]. Le velocità relative di fosforilazione e di degradazione delle proteine garantiscono la conservazione del ritmo circadiano. Nei mammiferi non è stata ancora identificata la presenza di una o più chinasi in grado di fosforilare le proteine oscillanti (es. PER1), per analogia non risulta difficile pensare che tale meccanismo di regolazione post-traduzionale intervenga anche nella generazione dell'orologio biologico circadiano dei mammiferi.

Possibile coinvolgimento dell'orologio biologico circadiano nello sviluppo

Durante l'embriogenesi, gli eventi che portano alla determinazione dei differenti tipi cellulari sono verosimilmente controllati attraverso *timers* dello sviluppo, che funzionano all'interno delle singole cellule [4].

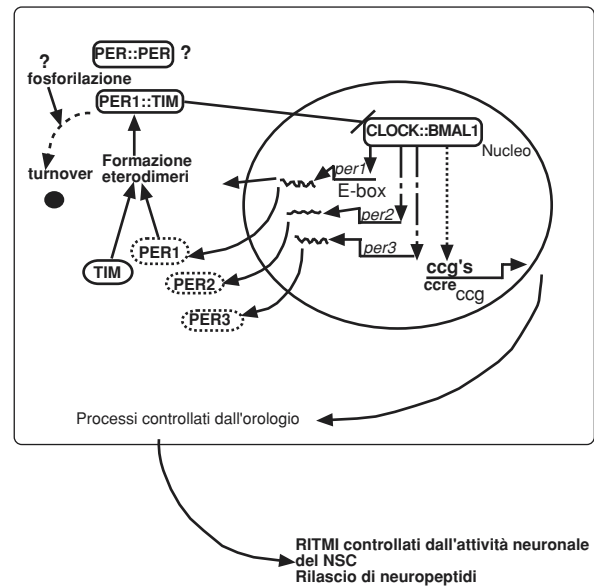


Fig. 3. - Elementi principali e ciclo di regolazione nei mammiferi. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, le linee a freccia discontinue mostrano un possibile meccanismo positivo di regolazione e quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. *ccg*: *clock controlled gene*, geni controllati dall'orologio; *ccre*: *circadian clock regulatory elements*, elementi regolatori dell'orologio circadiano.

Un esempio alquanto significativo di come le cellule siano in grado di controllare la loro divisione secondo un ritmo ben prestabilito è dato dalla transizione da una divisione cellulare rapida e simmetrica ad una divisione lenta e asimmetrica dell'embrione di *Xenopus laevis*. Questa transizione avviene sempre alla dodicesima divisione dopo la fecondazione, quando l'embrione è ormai costituito da circa 2000 cellule, cioè allo stadio di blastomero. La durata della transizione è controllata da un orologio biologico che è intrinseco di ogni blastomero e non dipende dalle interazioni cellula-cellula [71].

Un altro esempio, ci viene dato dal differenziamento degli oligodendrociti. Sperimentalmente è stato osservato che due cellule figlie provenienti dallo stesso precursore, messe in coltura separatamente sono sottoposte ad un numero sincronizzato di divisioni cellulari e differenziano allo stesso tempo [72].

Orologi biologici che regolano lo sviluppo, come quelli sopraindicati, sono probabilmente ben distinti da quelli che governano i ritmi circadiani, anche se i meccanismi molecolari che controllano la proliferazione ed il differenziamento possono essere interconnessi con le funzioni cellulari oscillatorie.

Ad esempio, l'espressione dell'ortologo gene *hairy* di *Drosophila* nell'embrione di pollo, è controllato da un orologio molecolare che è legato alla formazione dei somiti. Il gene *hairy* è espresso ad impulsi ciclici con

una periodicità di 90 minuti, esattamente il tempo che occorre per formare un somita. Il movimento ad impulsi non dipende dal dislocamento della cellula o dalla propagazione di un segnale di attivazione, ed ogni cellula sembra possedere il suo proprio orologio funzionale [73].

Anche il ciclo di divisione cellulare può essere considerato un orologio biologico circadiano. La maggior parte delle cellule eucariotiche in coltura entrano in mitosi (divisione nucleare) con una periodicità di circa 24 ore. Questa è solo una coincidenza o le cellule milioni di anni fa, sono state sensibili ai cicli luce/buio? Se lo sono state, quello che noi oggi studiamo come ciclo cellulare potrebbe essere il risultato di un ciclo circadiano ancestrale [4].

Esistono numerosi studi diretti ad evidenziare le possibili correlazioni funzionali tra ciclo cellulare e ciclo circadiano [74].

Ipotesi sulle correlazioni fra desincronizzazione degli orologi biologici circadiani e malattie umane

Il grande interesse rivolto verso lo studio degli orologi biologici circadiani è dovuto al fatto che tali meccanismi interni regolano la nostra vita e dal loro corretto funzionamento dipende il nostro benessere.

Diversi eventi patologici, quali ad esempio la aumentata frequenza di disturbi cardiaci durante la mattina, la presenza di disturbi dell'umore legati alla stagione invernale, i disturbi del ciclo sonno/veglia, sono verosimilmente da mettere in relazione ai ritmi circadiani [75-78].

In particolare, molti autori hanno fornito evidenze sulla ricorrenza periodica circadiana di patologie quali ischemia ed infarto miocardico, morte cardiaca improvvisa ed ictus ischemico (cronocardiologia) [28].

Moltissime pubblicazioni hanno documentato il coinvolgimento del sistema circadiano nell'organizzazione temporale del rilascio degli ormoni corticosteroidi [79, 27], in alcuni disordini psichiatrici quali la schizofrenia e la depressione [80-84] e nei processi d'invecchiamento [85, 86].

Anomalie legate al funzionamento non sincrono dei ritmi circadiani sembrano essere la causa di disturbi associati al sonno quali: la sindrome di avanzamento della fase di sonno (ASPS), la sindrome di ritardo della fase di sonno (DSPS), l'alternanza irregolare del sonno/veglia [87].

Gli orologi biologici circadiani sono coinvolti nella regolazione di molte funzioni nell'uomo, per le quali al momento non esistono modelli sperimentali adeguati.

Per lo studio di condizioni così complesse come i disturbi del sonno, dell'umore e dell'invecchiamento, anomalie verosimilmente associate ad una mancata sincronizzazione del sistema circadiano, uno dei metodi più informativi è rappresentato dall'analisi genetica diretta di tutti i geni circadiani umani, identificati e sequenziati finora.

Inoltre, l'analisi di *linkage* può dare informazioni importanti riguardo ai determinanti genetici di tratti complessi.

Il gene *clock*, che riveste un ruolo centrale nel funzionamento dell'orologio circadiano, rappresenta uno dei geni principali per l'analisi genetica dei disordini associati al sistema circadiano.

L'identificazione di un *single nucleotide polymorphism* (SNP) può essere utilizzata per associare ad un dato polimorfismo un fenotipo ben determinato all'interno di una popolazione selezionata. Ad esempio, in una popolazione d'origine europea, a livello del nucleotide 3111 della sequenza del gene *clock*, nella regione 3' non tradotta, è stato identificato uno SNP, una variazione di sequenza C/T, in cui la frequenza dei differenti alleli è rispettivamente 0,27 (3111C) e 0,73 (3111T) [87].

Studi di *linkage disequilibrium* hanno evidenziato che l'allele 3111C è strettamente associato ($P = 0,02$) al fenotipo *evening type*, che si riferisce alla tendenza, di alcuni individui, a svolgere preferenzialmente le attività fisiche e mentali in una precisa fase della giornata, ovvero più tardi rispetto al fenotipo normale.

La distinzione tra *morning type* ed *evening type* è un fenomeno circadiano ben documentato [88-90] e l'associazione dell'allele 3111C con il tipo serale potrebbe rappresentare l'effetto diretto del polimorfismo sull'espressione del gene *clock* [87]. La presenza di SNP nella regione 3' non codificante del gene può influire sulla stabilità del messaggero e sulla lunghezza della sua vita media; pertanto, questo polimorfismo potrebbe avere effetti rilevanti sul livello finale di proteina CLOCK tradotta.

Nel topo, la regione al 3' non tradotta dell'RNA messaggero di *clock* è insolitamente lunga (6 Kb) e contiene numerosi segnali funzionali di poliadenilazione, che potrebbero avere un'importante funzione regolatrice; inoltre, tale polimorfismo si trova in una zona altamente conservata tra uomo e topo, e questo potrebbe indicare il suo valore funzionale [87].

L'ipotesi più accreditata rimane comunque quella in cui il polimorfismo sia un marcatore di uno o più cambiamenti polimorfici all'interno del gene *clock* o dei suoi elementi di regolazione, che solo l'analisi della sequenza potrà mettere in luce.

Nel nostro laboratorio abbiamo isolato il gene *Per1* di uomo (*hPer1*), sequenziato e caratterizzato la sua struttura genomica completa, ed analizzato la regione regolativa [91]. Anche nel caso del gene *hPer1* è stato identificato uno SNP, in posizione 2548 del cDNA, una sostituzione sinonima A/G al 3' della regione non codificante, che dopo studi di analisi di *linkage* non ha dimostrato alcuna associazione con il fenotipo *morning type* o *evening type* nella popolazione [92]. La sequenza completa del gene *hPer1* (introni/esoni) e delle sue regioni regolative potrà essere utilizzata per l'identificazione di nuovi polimorfismi presenti nella popolazione umana.

Conclusioni

Le recenti acquisizioni scientifiche hanno permesso l'identificazione e la comprensione dei principali meccanismi molecolari alla base dell'orologio biologico circadiano. Questo approccio, non solo ci permette di interpretare le diverse relazioni esistenti all'interno dell'orologio, ma anche di identificare quei determinanti genetici responsabili delle disfunzioni a carico dei sistemi circadiani.

Dall'analisi dei diversi meccanismi presenti negli organismi viventi è emerso che tutti gli orologi biologici circadiani conosciuti utilizzano dei circuiti comuni di regolazione; come riassunto in Fig. 4 all'interno di una singola cellula coesistono geni, e rispettivamente proteine, per la regolazione positiva (WC1, WC2, CLK, CYC, BMAL1) e negativa (FRQ, PER, TIM) dell'orologio, che interagendo tra loro, secondo rapporti ben determinati, garantiscono il mantenimento del ritmo circadiano [3, 93, 94].

Non è difficile prevedere che l'insorgenza di mutazioni a carico di questi geni possa alterare il complesso meccanismo di reciproco controllo tra i sistemi di regolazione positiva e negativa, e quindi essere la causa dell'insorgenza di patologie.

L'identificazione di sindromi legate ad un ritmo veglia/sonno anomalo, quali appunto l'avanzamento della fase di sonno (ASPS: *advanced sleep-phase syndrome*), rappresenta un modello altamente informativo per l'analisi genetica dei ritmi circadiani umani [95].

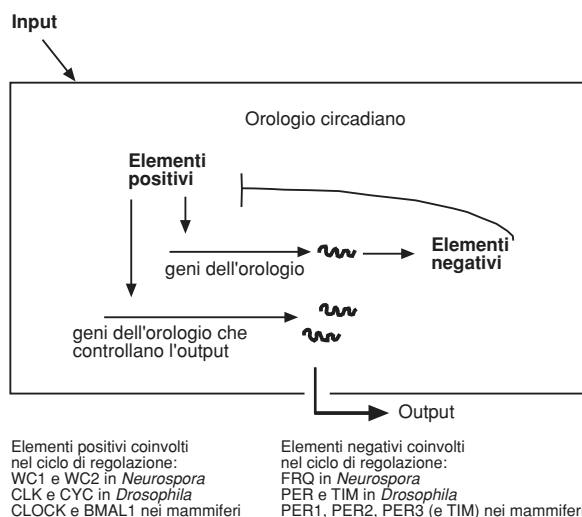


Fig. 4. - Elementi comuni che costituiscono il sistema circadiano. La natura oscillatoria del sistema circadiano è dovuta alla presenza di elementi negativi che sono in grado di rallentare l'espressione di se stessi e di elementi positivi che contrastano questa azione attivandone invece l'espressione.

Inoltre, l'allestimento di modelli animali che coinvolgono nuove mutazioni nei geni circadiani, potrebbe portare alla comprensione dell'etiopatogenesi e quindi allo sviluppo di terapie adeguate per la cura dei molteplici disturbi correlati all'esistenza di un ciclo circadiano desincronizzato.

Infine, viene ipotizzato che i ritmi circadiani asincroni possono anche essere responsabili dell'accentuarsi dei sintomi in patologie croniche quali la rinite allergica, l'asma, l'angina stabile, l'angina instabile, l'ipertensione, l'artrite reumatoide, l'osteoartrite, l'ulcera e l'epilessia [96].

Questa organizzazione temporale circadiana a livello di cellule, organi e organismi, potrebbe influenzare anche la natura e la qualità delle risposte agli interventi terapeutici.

Poiché il sistema metabolico cambia ritmicamente nel tempo ne consegue che un organismo quale l'uomo, è biochimicamente e fisiologicamente una entità differente a differenti stadi circadiani, pertanto egli reagisce diversamente ad un identico stimolo apportato a tempi differenti. La scelta di un tempo circadiano in cui somministrare i farmaci potrebbe migliorare l'efficacia del farmaco stesso e/o diminuire gli effetti collaterali indesiderati [30, 80].

Gli orologi biologici circadiani rappresentano quindi un sistema di regolazione cellulare, sostenuto da un fine processo di regolazione molecolare, i cui effetti influenzano il comportamento dell'intero organismo.

Una maggiore conoscenza dei loro meccanismi e dei loro fattori, endogeni ed esogeni, che possono alterarli potrebbe avere quindi ricadute di estrema importanza per la ricerca biomedica.

Ringraziamenti

Si ringrazia Natalia Mancino per la preziosa collaborazione nel reperimento del materiale bibliografico.

Ricevuto il 13 dicembre 1999.

Accettato il 14 febbraio 2000.

BIBLIOGRAFIA

- CUGINI, P. 1993. Chronobiology: principles and methods. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**: 483-500.
- PITTENDRIGH, C.S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 17-54.
- DUNLAP, J.C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.
- SASSONE-CORSI, P. 1998. Molecular clocks: mastering time by gene regulation. *Nature* **392**: 871-874.
- PITTENDRIGH, C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *CSH Sym. Quant. Biol.* **25**: 159-184.
- DE MARAIN. 1729. *Observation botanique*. Histoire de l'Académie Royale des Sciences, Paris. p. 352.

7. EDMUNDS, L.N Jr. 1983. Chronobiology at the cellular and molecular levels: models and mechanisms for circadian time keying. *Am. J. Anat.* **168**: 389-431.
8. GREEN, C.B. 1998. How cells tell time. *Trends Cell. Biol.* **8**: 224-230.
9. ASCHOFF, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**: 11-28.
10. GOLDEN, S., ISHIURA, M., JOHNSON, C.H., & KONDO, T. 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 327-354.
11. PITTENDRIGH, C.S., BRUCE, V.G., ROSENZWEIG, N.S. & RUBIN, M.L. 1959. A biological clock in *Neurospora*. *Nature* **184**: 169-170.
12. DEGUCHI, T. 1979. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature* **282**: 94-96.
13. HALL, J. C. 1995. Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* **18**: 230-240.
14. SOGIN, M.L. 1994. The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. In: *Early life on earth*. S. Bengtson (Ed.). Nobel Symposium no 84. Columbia University Press, New York. p. 181-192.
15. *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. 1991. D.C. Klein, R.Y. Moore & S.M. Reppert (Eds). Oxford University Press, New York.
16. FOULKES, N.S., BORJIGIN, J., SNYDER, S.H. & SASSONE-CORSI, P. 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci.* **20**(10): 487-492.
17. RALPH, M.R., FOSTER, R.G., DAVIS, F.C. & MENAKER, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**(4945): 975-978.
18. BINA, K.G. & RUSAK, B. 1996. Nerve growth factor phase shifts circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Neurosci. Lett.* **206**: 97-100.
19. MOURET, J., COINDET, J., DEBILLY, G. & CHOUVET, G. 1978. Suprachiasmatic nuclei lesions in the rat: alterations in sleep circadian rhythms. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **45** (3): 402-408.
20. SCHLINGENSIEPEN, K.H., WOLLINIK, F., KUNST, M., SCHLINGENSIEPEN, R., HERDEGEN, T. & BRYSCHE, W. 1994. The role of Jun transcription factor expression and phosphorylation in neuronal differentiation, neuronal cell death, and plastic adaptation *in vivo*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **14**(5): 487-505.
21. TOSINI, G. & MENAKER, M. 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**: 419-421.
22. PLAUTZ, J.D., KANEKO, M., HALL, J.C. & KAY, S.A. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* **278**: 1632-1635.
23. ASCHOFF, J. 1978. Circadian rhythms in man. *Arzneimittelforschung* **28**(10a): 1820-1827.
24. SATINOFF, E., LIRAN, J. & CLAPMAN, R. 1982. Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. *Am. J. Physiol.* **242**(3): 352-357.
25. COPINSCHI, G., VAVREETH, O. & VAN CAUTER, E. 1999. Biologic rhythms. Nyctemeral variation in man. *Presse Med.* **28**(17): 936-941.
26. CONROY, R.T., ELLIOTT, A.L. & MILLS, J.N. 1970. Circadian excretory rhythms in night workers. *Br. J. Ind. Med.* **27**(4): 356-363.
27. JENNINGS, B.H., ANDERSSON, K.E. & JOHANSSON, S.A. 1990. Assessment of the systemic effects of inhaled glucocorticosteroids: the influence of blood sampling technique and frequency on plasma cortisol and leucocytes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **39**(2): 127-131.
28. OTSUKA, K., YAMANAKA, T., KUBO, Y., NAKAJIMA, S., CUGINI, P. & WATANABE, H. 1993. Chronobiology in cardiology. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**(4): 633-646.
29. KAWASAKI, T., CUGINI, P. & DI PALMA, L. 1993. Chronobiology approach to human hypertension. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**(4): 679-692.
30. WOOD, P.A. & HRUSHESKY, W.J. 1996. Circadian rhythms and cancer chemotherapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**: 299-343.
31. KONDO, T., TSINOREMAS, N., GOLDEN, S., JOHNSON, C.H., KUTSUNA, S. & ISHIURA, M. 1994. Circadian clock mutants of *cyanobacteria*. *Science* **266**: 1233-1236.
32. FELDMAN, J.F. & HOYLE, M. 1973. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**: 605-613.
33. NAKASHIMA H, & ONAI, K. 1996. The circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**: 765-774.
34. GARCEAU, N., LIU, Y., LOROS, J.J. & DUNLAP, J.C. 1997. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell* **89**: 469-476.
35. MYERS, M.P., WAGER-SMITH, K., WESLEY, C.S., YOUNG, M.W. & SEHGAL, A. 1995. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* **270**: 805-808.
36. RALPH, M.R. & MENAKER, M. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* **241**: 1225-1227.
37. GEKAKIS, N., STAKNIS, D., NGUYEN, H., DAVIS, F., WILSBACHER, D.L., KING, D., TAKAHASHI J. & WEITZ, C. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**: 1564-1569.
38. CROSTHWAITE, S.K., DUNLAP, J.C. & LOROS, J.J. 1997. *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**: 763-769.
39. BALLARIO, P. & MACINO, G. 1997. White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol.* **5**: 458-462.
40. BALLARIO, P., TALORA, C., GALLI, D., LINDEN, H. & MACINO, G. 1998. Roles in dimerization and blue light photoreponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* WHITE COLLAR proteins. *Mol. Biol.* **29**: 719-729.
41. LUO, C., LOROS, J.J. & DUNLAP, J.C. 1998. Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FREQUENCY. *EMBO J.* **17**: 1228-1235.
42. KONOPKA, R.J. & BENZER, S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2112-2116.
43. GEKAKIS, N., SAEZ, L., DELAHAYE-BROWN, A.M., MYERS, M.P., SEHGAL, A. & WEITZ, C.J. 1995. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* **3**(270): 811-815.

44. MYERS, M., WAGER-SMITH, K., ROTHENFLUH-HILFIKER, A. & YOUNG, M. 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* **271**: 1736-1740.
45. ALLADA, R., WHITE, N.E., SO, W.V., HALL, J.C. & ROSBASH, M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**: 791-804.
46. DARLINGTON, T.K., WAGER-SMITH, K., CERIANI, M.F., STAKNIS, D., GEKAKIS, N., STEEVES, T.D.L., WEITZ C.J., TAKAHASHI, J.S. & KAY, S.A. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**: 1599-1603.
47. KLOSS, B., PRINCE, J.L., SAEZ, L., BLAU, J., ROTHENFLUH, A., WESLEY, C.S. & YOUNG, M.W. 1998. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a proteins closely related to human casein kinase I. *Cell* **94**: 97-107.
48. PRICE, J.L., BLAU, J., ROTHENFLUH, A., ADODEELY, M., KLOSS, B., & YOUNG, M.W. 1998. *Double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**: 83-95.
49. 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* **342**: 536-540.
50. SEHGAL, A., ROTHENFLUH, A., HUNTER-ENSOR, M., CHEN, Y., MYER, M.P. & YOUNG, M.W. 1995. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* **270**: 808-810.
51. RUTILA, J.E., SURI, V., LE, M., SO, W.V., ROSBASH, M., & HALL, J.C. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* **93**: 805-813.
52. CREWS, S. 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* **12**: 607-620.
53. HAO, H., ALLEN, D.L. & HARDIN, P.E. 1997. A cycling element in the *per* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3687-3693.
54. SAEZ, L. & YOUNG, M.W. 1996. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* **17**: 911-920.
55. LEE, C., BAE, K. & EDERY, I. 1998. The *Drosophila* CLOCK proteins undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interaction with PER-TIM complex. *Neuron* **21**: 857-867.
56. VITATERNA, M., KING, D. P., CHANG, A. M., KORNHAUSER, J.M., LOWEREY, P.L., MC DONALD, D., DOVE, W.F., PINTO, W.L., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* **264**: 719-725.
57. KING, D.P., ZHAO, Y.Z., SANGORAM, A.M., WILSBACHER, L.W., TANAKA, M., ANTOCH, M.P., STEEVES, T.D., VITATERNA, M.H., KORNHAUSER, J.M., LOWEREY, P.L., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1997. Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* **89**: 641-653.
58. KING, D.P., VITATERNA, M.H., CHANG, A.M., DOVE, W.F., PINTO, L.H., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1997. The mouse *Clock* mutation behaves as an antimorph and maps within the W^{19H} deletion, distal of *Kit*. *Genetics* **146**: 1049-1060.
59. SUN, Z.S., ALBRECHT, U., ZHUCHENKO, O., BAILEY, J., EICHELE, G. & LEE, C.C. 1997. *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* **90**: 1003-1011.
60. TEI, H., OKAMURA, H., SHIGEYOSHI, Y., FUKUHARA, C., OZAWA, R., HIROSE, M. & SAKAKI, Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* **389**: 512-516.
61. ALBRECHT, U., SUN, Z.S.O., EICHELE, G. & LEE, C.C. 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mPer1* and *mPer2*, to light. *Cell* **91**: 1055-1064.
62. SHERMAN, L., ZYLKA, M., WEAVER, D., KOLAKOWSKI, JR.L.F. & REPPERT, S. 1998. Two *period* homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**: 1261-1269.
63. TAKUMI, T., MATSUBARA, C., SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI K., YAGITA, K., MAEBAYASHI, Y., SAKAKIDA, Y., OKUMURA, K., TAKASHIMA, N. & OKAMURA, H. 1998. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**: 167-176.
64. ZYLKA, M., SHERMAN, L., WEAVER, D. & REPPERT, S. 1998. Three *period* homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**: 1103-1110.
65. TAKUMI, T., TAGUCHI, K., MIYAKE, S., SAKAKIDA, Y., TAKASHIMA, N., MATSUBARA, C., MAEBAYASHI, Y., OKUMURA, K., TAKEKIDA, S., YAMAMOTO, S., YAGITA, K., YAN, L., YOUNG, M.W. & OKAMURA, H. 1998. A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVLT. *EMBO J.* **17**: 4753-4759.
66. SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAMAMOTO, S., TAKEIDA, S., YAN, L., TEI, H., MORIYA, S., SHIBATA, S., LOROS, J.J., DUNLAP, J.C. & OKAMURA, H. 1997. Light-induced resetting of mammalian circadian clock is associated with rapid induction of *mPer1* transcript. *Cell* **91**: 1043-1053.
67. TAKUMI, T., NAGAMINE, Y., MIYAKE, S., MATSUBARA, C., TAGUCHI, K., TAKEKIDA, S., SAKAKIDA, Y., YAMAGUCHI, S., NISHIKAWA, K. *et al.* 1999. A mammalian homolog of *Drosophila timeless*, highly expressed in the SCN, and retina, forms a complex with *mPER1*. *Genes Cells* **4**: 67-75.
68. SILVER, R., SOOKHOO, A.I., LE SAUTER, J., STEVENS, P., JANSEN, H.T. & LEHMAN, M.N. 1999. Multiple regulatory elements result in regional specificity in circadian rhythms of neuropeptide expression in mouse SCN. *NeuroReport*. **10**(15): 3165-3174.
69. JIN, X., SHEARMAN, L., WEAVER, D., ZYLKA, M., DE VRIES, G. & REPPERT, S. 1999. A molecular mechanism regulating *output* from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**: 57-68.
70. EDERY, I., ZWIEBEL, L.J., DEMBINSKA, M.E. & ROSHBASH, M. 1994. Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2260-2264.
71. GRAINGER, R.M. & GURDON, J.B. 1989. Loss of competence in amphibian induction can take place in single nondividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1900-1904.
72. TEMPLE, S. & RAFF, M.C. 1986. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* **14**: 773-779.
73. PALMEIRIM, I., HENRIQUE, D., ISH-HOROWICZ, D. & POURQUIE, O. 1997. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **28**: 639-648.

74. EDMUNDS, L.N. Jr. 1997. Regulation in cell division cycles by circadian oscillators: signal trasduction between clocks. In: *Physiology and pharmacology of biological rhythms*. P.H. Redfern & B. Lemmer (Eds). Springer-Verlag, New York. p. 29-53.
75. KRAFT, M. & MARTIN, R.J. 1995. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis. Mon.* **41**: 501-75.
76. TEICHER, B.A., ARA, G., BUXTON, D., LEONARD, J. & SCHAUB, R.G. 1997. Optimal scheduling of interleukin 12 and chemotherapy in the murine MB-49 bladder carcinoma and B16 melanoma. *Clin. Cancer Res.* **3**: 1661-1667.
77. RODENBECK, A., HUETHER, G., RUTHER, E. & HAJAK, G. 1998. Altered circadian melatonin secretion patterns in relation to sleep in patients with chronic sleep-wake rhythm disorders. *J. Pineal. Res.* **25**: 201-210.
78. REILLY, T., WATERHOUSE, J. & ATKINSON, G. 1997. Aging, rhythms of physical performance, and adjustment to changes in the sleep-activity cycle. *Occup. Environ. Med.* **54**: 812-816.
79. VAN CAUTER, E.V., POLONSKY, K.S., BLACKMAN, J.D., ROLAND, D., STURIS, J., BYRNE, M.M. & SCHEEN, A.J. 1994. Abnormal temporal patterns of glucose tolerance in obesity: relationship to sleep-related growth hormone secretion and circadian cortisol rhythmicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1797-805.
80. MORGAN, R. & CHEADLE, A.J. 1976. Circadian body temperature in chronic schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* **129**: 350-354.
81. KUPFER, D.J., FOSTER, F.G., COBLE, P., MCPARTLAND, R.J. & ULRICH, R.F. 1978. The application of EEG sleep for the differential diagnosis of affective disorders. *Am. J. Psychiatry* **135**: 69-74.
82. WEHR, T.A., GOODWIN, F.K., WIRZ-JUSTICE, A., BREITMAIER, J. & CRAIG, C. 1982. 48-hour sleep-wake cycles in manic-depressive illness: naturalistic observations and sleep deprivation experiments. *Arch. Gen. Psychiatry* **39**: 559-565.
83. CZEISLER, C.A., KRONAUER, R.E., MOONEY, J.J., ANDERSON, J.L. & ALLAN, J.S. 1987. Biologic rhythm disorders, depression, and phototherapy. A new hypothesis. *Psychiatr. Clin. North. Am.* **10**: 687-709.
84. WEHR, T.A. 1996. A "clock for all seasons" in the human brain. In: *Hypothalamic integration of circadian rhythms*. R.M. Buijs, A. Kalsbeek, H.G. Romijn, C.M.A. Pennartz. & M. Mirmiran, (Eds). Elsevier Press, Amsterdam. p. 321-342.
85. VAN COEVORDEN, A., MOCKEL, J., LAURENT, E., KERKHOFS, M., L'HERMITE-BALERIAUX, M., DECOSTER, C., NEVE, P. & VAN CAUTER, E. 1991. Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am. J. Physiol.* **260**: 651-661.
86. OLIVERIO, A., ALLEVA, E. & CASTELLANO, C. 1980. A genetic approach to behavioral ontogeny and aging in the mouse. In: *The psychobiology of aging: problems and perspectives*. Stein (Ed.). Elsevier, North Holland. p. 35-46.
87. RICHARDSON, G.S. & MALIN, H.V., 1996. Circadian rhythm sleep disorders: pathophysiology and treatment *J. Clin. Neurophysiol.* **13**: 117-131.
88. KATZENBERG, D., YOUNG, T., FINN L., LIN L., KING D.P., TAKAHASHI, J. & MIGNOT, E. 1998. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* **21**: 569-576.
89. HORNE, J.A. & OSTBERG, O. 1976. A self assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int. J. Chronobiol.* **4**: 97-110.
90. POSEY, T.B. & FORD, J.A. 1981. The morningness-eveningness preference of college students as measured by the Horne and Ostberg questionnaire. *Int. J. Chronobiol.* **7**: 141-144.
91. FALBO, V., ZORAQI, G.K., FALCHI, M., IOSI, F., PARADISI, S. & TARUSCIO, D. 1999. Struttura genomica del gene umano *PER1* (*hPer1*)-ortologo umano del gene *period* (*PER*) di *Drosophila*. In: *Riassunti di comunicazioni e poster*. Atti del 2. Congresso Nazionale della Società Italiana di Genetica Umana. Orvieto, 29 settembre - 1 ottobre 1999. Università degli Studi, Perugia. p. 15.
92. KATZENBERG, D., YOUNG, T., LIN L., FINN L. & MIGNOT, E. 1999. A human period gene (*hPER1*) polymorphism is not associated with diurnal preference in normal adults. *Psychiatr. Genet.* **9**: 107-109.
93. DUNLAP, J.C. 1998. An end in the beginning. *Science* **280**: 1548-1549.
94. GREEN, B.C. 1998. Time marches on. *Trends Cell. Biol.* **8**: 342-343.
95. JONES, C.R., CAMPBELL, S.S., ZONE, S.E., COOPER, F., DE SANO, A., MURPHY, P.J., JONES, B., CZAJKOWSKI, L. & PTCEK, L.J. 1999. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.* **5**: 1062-1065.