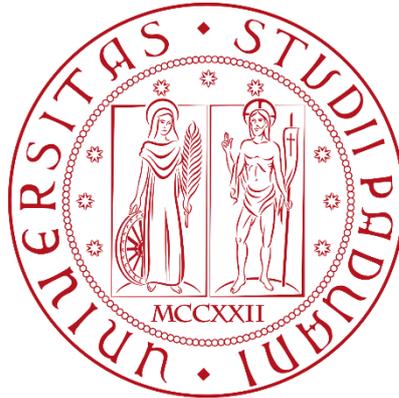


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

Corso di Laurea in biologia



**ELABORATO DI LAUREA**

**IL RUOLO DELLA REGOLAZIONE EPIGENETICA NEL CICLO  
SONNO-VEGLIA: MECCANISMI MOLECOLARI, GENI E FATTORI  
AMBIENTALI**

*Tutor:* Prof. Gabriella Margherita Mazzotta

Dipartimento di Biologia

*Laureanda:* Sofia Rinaldi

Matricola: 2042230

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

# Indice

<b>1. Abstract</b> .....	1
<b>2. Il sonno</b> .....	2
2.1. Le fasi.....	2
2.2. La durata.....	3
2.3. Il ritmo circadiano .....	4
2.4. Cronotipi .....	6
<b>3. Meccanismo molecolare</b> .....	7
3.1. Orologio biologico .....	7
3.2. Anatomia.....	8
3.3. Geni.....	10
3.4. Meccanismi epigenetici.....	12
3.4.1. Metilazione del DNA .....	12
3.4.2. Acetilazione degli istoni.....	14
3.4.3. RNA non codificanti .....	15
<b>4. Regolazione epigenetica</b> .....	17
4.1. <b>Influenze epigenetiche nei clock genes</b> .....	17
4.1.1. BMAL1 .....	17
4.1.2. CLOCK .....	18
4.1.3. PER .....	19
4.1.4. CRY.....	20
4.1.5. REV-ERB .....	21
4.1.6. NPAS2.....	21
<b>5. Fattori ambientali</b> .....	22
5.1. Zeitgeber .....	22
5.2. Influenze epigenetiche .....	23
5.2.1. Luce.....	23
5.2.2. Metabolismo.....	25
5.2.3. Stress ed Esercizio fisico.....	26
<b>6. Disturbi del sonno</b> .....	26
<b>7. Conclusione</b> .....	27
<b>8. Bibliografia</b> .....	28

## 1. Abstract

Il tempo è scandito dai ritmi circadiani, su scala di 24 ore, i quali si basano su un complesso meccanismo molecolare. I tempi preferiti di sonno e di veglia variano in ogni individuo e vengono indicati con il termine cronotipo, o preferenza diurna. Il sistema circadiano è organizzato principalmente secondo un'organizzazione gerarchica di orologi molecolari che si coordinano tra di loro con lo scopo di ottimizzare l'adattamento dell'organismo in base al momento della giornata, anticipando i cambiamenti ambientali e rispondendo con una coordinata segregazione temporale di numerosi processi biochimici al fine di renderli maggiormente efficienti.

I geni principali del meccanismo molecolare della regolazione del ciclo sonno-veglia sono detti "clock genes", ma come anticipato i ritmi dei tessuti vengono scanditi anche da input provenienti dal mondo esterno come la luce. Questi geni subiscono una regolazione epigenetica della loro espressione attraverso tre processi: la metilazione del DNA; le modifiche degli istoni; e gli RNA non codificanti. Tutte le modificazioni del DNA che si verificano in seguito a questi meccanismi epigenetici formano l'epigenoma. L'epigenoma varia tra le cellule e le generazioni a causa del fatto che le modifiche epigenetiche sono dinamiche e sensibili al loro ambiente e svolge un ruolo fondamentale sia nella regolazione dell'espressione genica, sia nell'archiviazione della memoria.

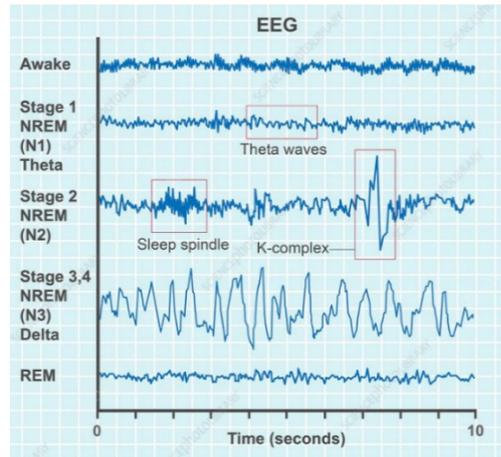
Non sono solo diversi geni ad influire nella regolazione del sonno, ma anche diversi fattori ambientali come la luce, le ore di sonno, l'alimentazione e l'attività fisica. La scorretta esposizione alla luce, un'alimentazione poco equilibrata, un'attività fisica in momenti sconvenienti della giornata comportano la desincronizzazione dei ritmi circadiani. La perdita o l'interruzione di sonno, dovuta ad esempio a scelte lavorative, all'uso di stimolanti o a problemi di salute come stress o altri disturbi, influisce sull'epigenoma con conseguenti effetti comportamentali come malattie cardiache, ictus, ipertensione, obesità, diminuzione della vigilanza e conseguente aumento del rischio di incidenti (Benazzi S, 2021).

## **2. Il sonno**

Il sonno viene generalmente definito come uno stato di riposo fisico-psichico, caratterizzato dalla sospensione totale o parziale della coscienza e della volontà, accompagnato da sensibili modificazioni funzionali come diminuzione del metabolismo energetico, riduzione del tono muscolare, della frequenza del polso e del respiro, della pressione arteriosa, ecc. (Treccani). Secondo una definizione comportamentale, il sonno viene presentato come uno stato comportamentale complesso reversibile caratterizzato principalmente da occhi chiusi, disimpegno percettivo e quiescenza comportamentale (Carskadon et al., 2011).

### **2.1. Le fasi**

All'interno del sonno umano normale sono stati identificati due stati: il sonno REM (Rapid Eye Movement), associato ad attività cerebrale simile a quella della veglia, tonicità muscolare antigravitazionale ridotta e generazione di sogni vividi ed emotivi; e lo stato NREM ("non-REM"), il quale prevede diversi stadi di cui l'ultimo associato alla fase di sonno profondo, quindi bassa tonicità muscolare generale e ridotta attività psicologica. Il sonno NREM è convenzionalmente suddiviso in quattro fasi definite lungo l'asse di misurazione dell'elettroencefalogramma (EEG) corticale definito sincrono: la fase 1 rappresenta la transizione dalla veglia al sonno leggero e dura pochi minuti; la fase 2 è uno stato di sonno leggermente più profondo caratterizzato da fusi del sonno e complessi K (variazioni dell'EEG); le fasi 3 e 4 rappresentano la discesa progressiva verso il sonno profondo caratterizzato da onde lente (Figura 1). Il sonno REM può essere suddiviso in due fasi: ad attività fasica e ad attività tonica. La distinzione tra tonico e fasico si basa su eventi di breve durata come i movimenti oculari che tendono a verificarsi in gruppi separati rispetto a episodi di relativa quiescenza. Lo stato REM è caratterizzato dall'attivazione dell'EEG, dall'aumento e della frequenza cardiaca e quella respiratoria e della loro regolarità, e dalla diminuzione della temperatura corporea (Carskadon et al., 2011).



**Figura 1.** Sono indicati i rispettivi EEG degli stadi 1-2-3 del sonno NREM e della fase REM. In particolare, evidenziate le caratteristiche onde theta dello stadio 1 NREM e i fusi del sonno e complessi K dello stadio 2 NREM (Immagine tratta da Science photo library).

Il ciclo del sonno NREM-REM è associato a cambiamenti dinamici nel sistema nervoso autonomo e nel sistema immunitario e si verifica ogni 90 minuti per circa 4-6 cicli in una notte di sonno media di 8 ore. Il sonno inizia con periodi NREM, interrotti da brevi periodi REM di qualche secondo che, successivamente, si allungano progressivamente diventando dominanti nel corso del periodo di sonno principale (Le Bon O., 2020). Il sonno REM costituisce circa il 25% del totale del sonno, mentre il sonno NREM il restante 75%.

È interessante notare come la temperatura del cervello diminuisce, rispetto al livello mantenuto durante la veglia, durante il sonno NREM e aumenta durante il sonno REM suggerendo come questo possa avere un ruolo chiave nella regolazione della temperatura e del metabolismo del cervello durante il sonno e nella facilitazione del risveglio vigile (Siegel JM, 2005).

## 2.2. La durata

La durata del sonno non è correlata alla dimensione del cervello o alle capacità cognitive, bensì ad altri fattori come la nicchia ecologica, l'esigenza alimentare e la temperatura corporea, indicando come anche l'acquisizione di cibo e la conservazione dell'energia hanno un ruolo importante nel mantenere l'equilibrio del ciclo sonno-veglia. Nella specie umana, la durata del sonno ideale varia con l'età: per i neonati si aggira intorno alle 12-15 ore, per gli adolescenti intorno alle 9-10 ore, mentre per le persone di età pari o superiore ai 18 anni intorno alle 6-8 ore.

Variazioni possono essere dovute a diversi altri fattori come differenze razziali, etniche, industrializzazione (nelle società preindustriali è stata riscontrata una durata media maggiore e più continua delle ore di sonno rispetto che nelle società industrializzate) e fattori personali. In generale diversi studi hanno dimostrato che durate di sonno maggiori o minori alle 7 ore comportano un aumento della probabilità di sviluppare diversi disturbi legati al sonno, come ad esempio malattie croniche, e di conseguenza un accorciamento dell'aspettativa di vita (Siegel JM, 2005). La privazione del sonno altera numerose vie di segnalazione, che potrebbero regolare i meccanismi epigenetici. Un esempio è la via ciclica dell'adenosina 3',5'-monofosfato (cAMP), che viene interrotta in seguito alla privazione del sonno. La proteina cAMP response element-binding (CREB) media gli inibitori dell'istone deacetilasi, suggerendo che la via del cAMP può alterare le modificazioni dell'istone dopo la privazione del sonno. Le modificazioni a livello della cromatina influenzeranno di conseguenza l'espressione di numerosi geni come i geni implicati nel ciclo sonno-veglia, ma anche geni legati a malattie cardiovascolari, diabete, obesità, e depressione, tutti fattori che possono contribuire a un aumento della mortalità (Gaine ME et al., 2018). Anche dormire più di 7-8 ore è considerato un fattore di rischio per queste patologie, dato che potrebbe riflettere, ad esempio, uno stato di infiammazione cronica, la quale può avere effetti deleteri sulla salute a lungo termine (Gallicchio L, Kalesan B, 2009).

### **2.3. Il ritmo circadiano**

Ogni individuo possiede un orologio biologico che alterna ciclicamente il sonno con lo stato di veglia. Questo ciclo sonno-veglia ha una durata approssimativa di 24 ore e prende il nome di ritmo circadiano del sonno.

La parola "circadiano" deriva da due parole latine, "circa" e "dies" che significa "giorno o ciclo di 24 ore" (Chauhan S. et al., 2023). Durante un periodo circadiano avvengono cambiamenti ciclici nei processi cellulari, molecolari e biologici guidati da un "orologio principale" interno situato nel nucleo sopra-chiasmatico (SCN) e influenzati da stimoli ambientali (Kalmbach et al., 2012). Questa ritmicità non è semplicemente una risposta ai cambiamenti di 24 ore nell'ambiente fisico imposti dalla rotazione dell'asse terrestre, poiché deriva anche da un sistema di cronometraggio, o orologio biologico, che consente all'organismo di anticipare, coordinarsi e rispondere ai cambiamenti associati al giorno e alla notte in modo di

“fare la scelta giusta al momento giusto”. I ritmi circadiani possiedono diverse caratteristiche: la prima è che la persistenza dei ritmi in assenza di un ciclo buio-luce o di un altro segnale orario esogeno sembra chiaramente dimostrare l’esistenza dell’orologio biologico interno; seconda caratteristica dei ritmi circadiani è la capacità di essere sincronizzati ai segnali temporali esterni come il ciclo luce-buio (la tempistica dell’esposizione alla luce così come la sua intensità possono modificare i ritmi); altre due caratteristiche sono l’ubiquità dei ritmi in natura, che si ritrovano in diversi organismi con processi e proprietà simili, e la loro generazione a livello cellulare, dimostrata sempre dalla somiglianza dei ritmi in organismi unicellulari e mammiferi altamente complessi; ultima caratteristica è la leggera flessibilità nella durata di 24 ore del ciclo (individui con fase di sonno ritardata possono allungare il loro periodo circadiano a 24.2 ore), che consente al sistema di timing interno dell’organismo di continuare ad adattarsi al ciclo luce-buio (Vitaterna et al., 2021). Il ciclo sonno-veglia è regolato da un sistema di timing circadiano (CTS), ossia un meccanismo costituito da una rete di strutture gerarchicamente organizzate e responsabili di generare i ritmi circadiani, i quali influenzano tutti i nostri aspetti fisiologici e comportamentali. Questo sistema si è evoluto col fine di sincronizzare l’organismo con le condizioni ambientali che si ripetono periodicamente, definite Zeitgeber o sincronizzatori circadiani (Granada et al., 2013). Zeitgeber è una parola tedesca che letteralmente significa "donatore di tempo" che rappresenta un segnale temporale in grado di allenare i ritmi circadiani. I sincronizzatori circadiani possono essere segnali di tipo luminoso o non luminoso e sono rappresentati da segnali metabolici, neuronali, alimentari, comportamentali (Benazzi et al., 2021). La luce percepita dalla retina è il più potente sincronizzatore del SCN ed è quindi ritenuta il più importante Zeitgeber (Vitaterna et al., 2021). Diverse informazioni sui ritmi circadiani individuali arrivano dal monitoraggio della temperatura corporea, della melatonina plasmatica e del cortisolo come marcatori del ritmo circadiano. Tuttavia, numerosi fattori esogeni ed endogeni influenzano questi valori: la temperatura corporea viene influenzata da quella dell’ambiente, dai vestiti e dalle lenzuola: la concentrazione plasmatica di melatonina può essere modificata dalla somministrazione orale di questa; e quella di cortisolo varia con lo stress e l'ansia. Inoltre, qualora un soggetto umano sia libero di entrare in isolamento temporaneo si osserva, in contrasto col prolungamento del

ritmo sonno-veglia, il mantenimento dei ritmi circadiani della temperatura corporea, della melatonina e del cortisolo. La regolazione del ritmo circadiano nell'uomo è operata da diversi oscillatori: un oscillatore principale all'interno del SCN, regolato dal ciclo luce-buio e influenzato dai ritmi circadiani della temperatura corporea e della secrezione ormonale; e diversi oscillatori secondari che contribuiscono a dare origine al ciclo sonno-veglia e vengono principalmente regolati da segnali metabolici e nutrizionali (Takimoto M. et al., 2005).

## **2.4. Cronotipi**

La cronobiologia comprende tutte le aree di ricerca incentrate sulla temporalizzazione biologica, compresi i cicli ad alta frequenza (ad esempio la secrezione ormonale diurna), i cicli giornalieri (ad esempio i cicli di attività e riposo) e cicli mensili o annuali (ad esempio i cicli riproduttivi in alcune specie). La manifestazione comportamentale del sistema circadiano endogeno che governa i tempi preferiti di sonno e di veglia in ogni individuo viene indicata col termine cronotipo, o preferenza diurna (Kalmbach et al., 2017).

Il cronotipo è un tratto della personalità basato sul ritmo circadiano di una persona, ossia il ciclo biologico di 24 ore che influenza aspetti del comportamento e della funzione fisiologica. Gli esseri umani sono tipicamente svegli durante il giorno e dormono durante la notte. La tempistica della ritmicità circadiana raggruppa gli individui in base alle loro preferenze nei così chiamati: serotini (gufi), presentanti un cronotipo tardivo, e mattutini (allodole), caratterizzati da un cronotipo precoce. I cronotipi tardivi presentano una fase di sonno ritardata, preferendo svegliarsi più tardi al mattino, e una preferenza serale, rimanendo più attivi e motivati la sera. I mattutini d'altro canto mostrano una fase avanzata del sonno, preferendo svegliarsi presto e sentendosi più attivi durante le prime ore del giorno (Kalmbach et al., 2012).

Sono ovviamente presenti anche individui che mostrano un cronotipo intermedio, mostrando una notevole flessibilità, ad esempio nel disporre impegni durante l'intero arco della giornata.

Risulta interessante notare come gli individui con una fase di sonno estremamente ritardata possono allungare la durata del loro periodo circadiano intorno alle 24,2 ore.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che durante lo sviluppo si verificano cambiamenti del cronotipo mostrando una preferenza precoce durante lo sviluppo infantile, più tarda nell'adolescenza e prima età adulta, e progressivamente anticipata con l'avanzare dell'età. Inoltre, studi di associazione genome-wide dimostrano che la variabilità dei cronotipi della popolazione può essere influenzata dal corredo genetico di ogni individuo fino al 50%, osservando associazioni genetiche significative tra il cronotipo e diversi geni correlati all'orologio circadiano (Kalmbach et al., 2012).

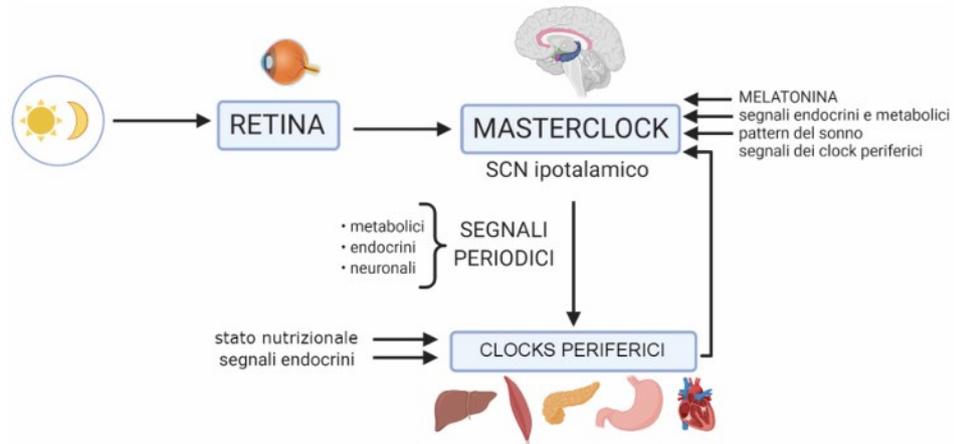
Negli individui sani, il ritmo endogeno del ciclo sonno-veglia è ben sincronizzato con le alterazioni del ciclo giorno-notte e con altri fattori, tra cui le routine quotidiane, l'orario dei pasti, ecc. La sincronizzazione è essenziale per mantenere un sonno e una veglia sani poiché interruzioni o disallineamenti possono portare a diversi problemi cognitivi, emotivi e legati al sonno (Chauhan S. et al., 2023).

### **3. Meccanismo molecolare**

#### **3.1. Orologio biologico**

Possedere un orologio circadiano centrale non è una prerogativa delle cellule del SNC, bensì ogni singola cellula ne possiede uno e mantiene la propria ritmicità circadiana. L'orologio principale nel SNC sembra avere il ruolo di mantenere la sincronizzazione tra questi orologi cellulari (Kalmbach et al., 2012).

Le variazioni quotidiane del metabolismo, della fisiologia e del comportamento sono controllate da una rete di orologi circadiani accoppiati. Il sistema si compone di orologi (clocks) circadiani, oscillatori biologici localizzati in specifiche aree del sistema nervoso centrale o in tessuti periferici. L'organizzazione dei clocks è gerarchica (Figura 2): all'apice troviamo il master clock, localizzato nel nucleo soprachiasmatico (SCN) dell'ipotalamo, controllato principalmente dai segnali luminosi; al di sotto troviamo orologi encefalici secondari e orologi periferici, distribuiti in vari organi e tessuti, maggiormente sensibili a segnali di tipo metabolico e nutrizionale (Benazzi et al., 2021). L'orologio biologico interno è costituito da una serie di geni e dai loro prodotti proteici che codificano e regolano vari processi fisiologici in tutto il corpo (Vitaterna et al., 2021). Queste componenti sono vitali per generare e regolare i ritmi circadiani all'interno delle singole cellule, sincronizzati anche dal SCN centrale (Chauhan S. et al., 2023).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica della regolazione integrata del sistema gerarchico circadiano composto dal master clock SCN e dai clock periferici (Benazzi et al., 2021).

I meccanismi dell'orologio nei nuclei soprachiasmatici e negli oscillatori periferici sono noti per essere simili a livello molecolare e consistono in una rete di cicli di feedback trascrizionale-traduzionale. Inizialmente le molecole di acido ribonucleico (RNA) subiscono un processo post-trascrizionale nel nucleo, da lì gli RNA messaggeri (mRNA) vengono esportati nel citoplasma dove la traduzione ribosomiale forma le proteine che vengono fosforilate e quindi stabilizzate mediante delle chinasi. Dopo un certo ritardo, un numero sufficiente di molecole proteiche si accumula nel citoplasma e forma eterodimeri che vengono importati nel nucleo, dove regolano l'espressione genica attraverso la chiusura di cicli di feedback a retroazione negativa (Voinescu, Bogdan I., 2009).

### 3.2. Anatomia

Diverse aree cerebrali partecipano alla regolazione del ciclo sonno-veglia, grazie a segnali condotti attraverso vari neurotrasmettitori tra le diverse regioni del cervello e delle aree corticali periferiche.

- Il prosencefalo basale (BF) riceve input dall'ipotalamo e dal tronco encefalico e ha un importante ruolo primario nel promuovere l'attività corticale, principalmente attraverso neurotrasmettitori colinergici, che si verifica durante la veglia e il sonno REM. Tuttavia, grazie all'eterogeneità dei neurotrasmettitori, il BF è coinvolto oltre che nel sonno anche nella veglia.
- Il sistema di attivazione corticale riceve afferenze da vari sistemi sensoriali e invia segnali efferenti al prosencefalo basale, al talamo e all'ipotalamo. È

formato da un gruppo di neuroni che si estende diffusamente dal midollo all'ipotalamo posteriore ed è coinvolto nel mantenimento della veglia.

- Il talamo è una regione importante nella modulazione del ciclo sonno-veglia, in quanto agisce come una stazione di trasmissione per gli input sensoriali glutammatergici alla corteccia.
- Ed infine il nucleo soprachiasmatico (SCN) (Falup-Pecurariu C. et al., 2021)

Come anticipato, il principale orologio biologico interno si trova nel nucleo soprachiasmatico (SCN) dell'ipotalamo e influenza il ciclo sonno-veglia in stretta associazione e interazione con la ghiandola pineale. Gli orologi periferici o oscillatori circadiani sono presenti in tutto il cervello e in altre cellule del corpo; questi sono sincronizzati dal nucleo soprachiasmatico e geneticamente programmati per generare i ritmi circadiani.

L'SCN è costituito da due nuclei situati su ciascun lato del terzo ventricolo, direttamente sopra il chiasma ottico, ed è diviso in due sottoregioni "core" e "shell", con peptide intestinale vasoattivo e peptide di rilascio di gastrina, fondamentali per il mantenimento del ritmo circadiano, poiché l'aumento o la diminuzione della loro concentrazione in base ai periodi di luce e buio regolano i ritmi circadiani (CR) (Challet E., 2015). L'SCN svolge un ruolo vitale nella regolazione di diversi CR endocrini, fisiologici e comportamentali. La principale connessione afferente del SCN fornisce informazioni fotiche dagli ipRGC, cellule gangliari retiniche intrinsecamente fotosensibili che rispondono alla luce grazie all'espressione del fotopigmento melanopsina al loro interno. In particolare, i segnali luminosi naturali o artificiali rilevati dalle cellule gangliari retiniche fotosensibili intrinseche vengono trasdotti e trasmessi al SCN, il quale invia le informazioni attraverso il nucleo paraventricolare alla colonna intermedio-laterale del midollo spinale toracico (midollo laterale), dove i neuroni simpatici di primo ordine proiettano verso il ganglio cervicale superiore e le fibre simpatiche di secondo ordine, dal ganglio cervicale superiore, proiettano alla ghiandola pineale attraverso il tentorio cerebello, terminando all'apice della ghiandola pineale come singolo nervus conarius. Queste fibre nervose rilasciano noradrenalina dai loro terminali portando alla formazione di sinapsi sulla superficie dei pinealociti, cellule principali all'interno della ghiandola pineale contenenti un'alta concentrazione di serotonina

che viene convertita in melatonina, aiutando gli individui ad addormentarsi (Chauhan S. et al., 2023).

Le principali vie efferenti del SCN sono l'ipotalamo, il talamo, le aree retrochiasmatiche e preottiche, il setto laterale, la stria terminale e il nucleo intergenicolato. C'è anche comunicazione tra il SCN e gli organi periferici come il cuore, il fegato, il polmone, i muscoli, i reni e il tratto gastrointestinale tramite segnali umorali, come il fattore di crescita trasformante  $\alpha$ , il fattore 1 delle citochine simili alle cardiotrofine e il recettore procinetico 2 (Prokr2). Questo circuito umorale è della massima importanza affinché l'SCN sia in grado di svolgere la sua funzione nella sincronizzazione delle funzioni dei tessuti periferici (Challet E., 2015).

### **3.3. Geni**

Il meccanismo molecolare che genera la ritmicità circadiana consiste in un loop trascrizionale di cicli a feedback negativo e positivo che coinvolgono diversi geni, denominati appunto “clock genes”.

In particolare, si identificano i geni Period (Per1, Per2 e Per3) e Cryptochrome (Cry1 e Cry2). Altri geni coinvolti nella generazione molecolare dei ritmi circadiani includono: caseina chinasi  $1\delta$  e  $1\epsilon$  (CK1) e fattori di trascrizione Circadian Locomotor Output Cycles Kaput Protein (CLOCK), proteina ARNT-like cerebrale e muscolare (BMAL1 e BMAL2) e proteina del dominio Pas neuronale (NPAS1 e NPAS2) (Kalmbach et al., 2012).

Nei soggetti umani sani, i livelli di espressione dell'mRNA di Per1, Per2 e Per3 sono più alti al mattino presto e poi diminuiscono nel tardo pomeriggio, mentre i livelli di picco dell'espressione dell'mRNA in Bmal1 e Clock sono precedenti a quelli di Per1, Per2 e Per3 (Takimoto M. et al., 2005).

I geni Clock e Bmal1 codificano per le proteine CLOCK e BMAL1, appartenenti al gruppo di proteine note come basic Helix-Loop Helix Per-Arnt-Single-minded (bHLH-PAS), che rappresentano la parte positiva del circuito di feedback (Benazzi et al., 2021).

I domini bHLH di CLOCK e del suo partner di legame BMAL1 permettono loro di legare il DNA in corrispondenza della sequenza nucleotidica CACGTG, chiamata

E-box, direttamente agli elementi regolatori sui geni ritmici per influenzare la loro trascrizione (Cox KH, Takahashi JS, 2019).

CLOCK e BMAL1 formano un eterodimero che induce la trascrizione dei geni target, legandosi a specifici siti di DNA nei loro promotori. Il bersaglio è l'attivazione di geni che includono le componenti negative del loop: i geni Per1, Per2, Cry1 e Cry2.

CRY e PER si accumulano gradualmente nel citoplasma, quando PER raggiunge un livello critico consente la dimerizzazione con CRY e la traslocazione nucleare. Qui, CRY sopprime la trascrizione indotta da BMAL1/CLOCK/NPAS2 di Per, Cry, Ror e Rev-Erb. Ciò porta ad una diminuzione dei livelli delle proteine CRY e PER al di sotto della concentrazione richiesta per l'auto repressione, queste quindi dimerizzano e bloccano l'attività trascrizionale dell'eterodimero CLOCK/BMAL1. Può quindi seguire un nuovo ciclo di trascrizione di Cry e Per, completando così un ciclo di feedback negativo (Benazzi et al., 2021) (Voinescu, Bogdan I., 2009).

Oltre a questo feedback trascrizionale diretto, l'espressione dell'mRNA di Per1/2/3 e Cry1/2 è regolata da altri meccanismi, infatti, la degradazione delle proteine PER e CRY è regolata anche dalle chinasi serina/treonina, dalla caseina chinasi 1 $\delta$  (CK1 $\delta$ ) e CK1 $\epsilon$  e da altre proteine, tra cui le F-box. Una volta che il feedback trascrizionale negativo e la regolazione post-trascrizionale e post-traduzionale sono sufficienti a diminuire i livelli di proteina PER/CRY nel nucleo, la repressione viene alleviata e CLOCK/BMAL1 inizia un nuovo ciclo di trascrizione genica Per/Cry (Cox KH, Takahashi JS, 2019).

Nel secondo ciclo trascrizionale principale, il dimero CLOCK/BMAL1 induce la trascrizione di un secondo loop, attivando la trascrizione dei geni per i recettori nucleari correlati all'acido retinoico, portando alla sintesi di proteine REV-ROB e ROR che legano i siti del promotore di BMAL1, rispettivamente inducendone e inibendone la trascrizione (Benazzi et al., 2021). Queste proteine competono con i recettori orfani correlati all'acido retinoico ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  e ROR $\gamma$  per i siti di legame sul gene Bmal1, chiamata sequenza RORE (AAAGTAGGTCA), fornendo una regolazione della trascrizione sia positiva (ROR) che negativa (REV-ERB), costituendo un importante collegamento tra l'orologio circadiano ed il metabolismo (Cox KH, Takahashi JS, 2019). Gli effetti antagonisti di ROR, che attiva la

trascrizione di Bmal1, e REV-ERB, che la inibisce, generano un livello ritmico di BMAL1 e quindi di CLOCK-BMAL1 (Voinescu, Bogdan I., 2009).

Prove recenti suggeriscono che il legame di BMAL1 è altamente variabile tra i tessuti e dipende da altri fattori di trascrizione tessuto-specifici. (Benazzi et al., 2021)

Un terzo ciclo di feedback coinvolge la proteina legante la D-box (DBP) e il fattore nucleare, la proteina regolata dall'interleuchina-3 (NFIL3, nota anche come E4BP4) che sono regolati da CLOCK/BMAL1 e CRY1 e si legano agli elementi D-box sui promotori circadiani, tra cui Rora e Rorb (Cox KH, Takahashi JS, 2019).

Insieme, questi cicli di feedback che compongono l'"orologio molecolare" sono governati da meccanismi regolatori trascrizionali, post-trascrizionali e post-traduzionali che sono sufficienti a mantenere i ritmi circadiani; tuttavia, i segnali esterni sono ancora importanti per sincronizzare i ritmi delle cellule all'interno e tra i tessuti (Cox KH, Takahashi JS, 2019). Questo meccanismo di espressione genica è sotto controllo epigenetico, viene infatti influenzato da eventi ciclici di rimodellamento della cromatina e anche dal metabolismo cellulare.

### **3.4. Meccanismi epigenetici**

Esistono tre principali meccanismi epigenetici che controllano l'espressione genica, e quindi la funzione della cellula, modificandone la struttura della cromatina e l'accessibilità al genoma: la metilazione e idrossimetilazione del DNA; le modifiche degli istoni; e gli RNA non codificanti (Figura 3). Queste modifiche epigenetiche non sono indipendenti e possono anche regolarsi a vicenda.

#### **3.4.1. Metilazione del DNA**

La metilazione del DNA è considerata la modificazione epigenetica più comune, è un processo che prevede l'aggiunta di un gruppo metilico a un dinucleotide citosinaguanina (CpG). I modelli di metilazione del DNA che si verificano in tutto il genoma sono indicati come metiloma e la metilazione del DNA, all'interno della regione del promotore del primo esone di un gene, è generalmente correlata con una diminuzione dell'espressione genica. Questa diminuzione si verifica in parte a causa della proteina legante il metil-CpG2 (MeCP2) che si lega al DNA metilato, altera la struttura della cromatina e recluta repressori trascrizionali nel sito di metilazione.

L'abbondanza di MeCP2 nel cervello indica la prevalente ed essenziale funzione della metilazione del DNA nella normale funzione cerebrale, suggerendo che una sua interruzione può causare rilevanti cambiamenti neurologici. I livelli di metilazione del DNA sono stabiliti e mantenuti in tutto il genoma da una famiglia di enzimi chiamati DNA metiltransferasi (DNMT), che includono:

- DNMT1 in grado di mantenere il metiloma durante la replicazione del DNA;
- DNMT2 poco conosciuta ma ritenuta avere la capacità enzimatica di metilare il DNA e di funzionare anche come RNA metiltransferasi;
- DNMT3A e DNMT3B coinvolti nella creazione di marcatori di metilazione del DNA de novo;
- e DNMT3-like (DNMT3L) privo di attività enzimatica ma coinvolto nella metilazione del DNA durante lo sviluppo insieme a DNMT3A e DNMT3B.

Le controparti dei DNMT sono gli enzimi di traslocazione Ten-undici (TET): TET1, TET2 e TET3. Questi enzimi controllano la demetilazione del DNA aggiungendo un gruppo ossidrilico al gruppo metilico, creando una base intermedia, ma ancora funzionale, la 5-idrossimetilcitosina (5hmC), ritenuta cruciale all'interno nel cervello data la sua abbondanza al suo interno e al suo arricchimento in geni correlati alle sinapsi (Gaine ME et al., 2018).

Ci sono diverse prove che suggeriscono il collegamento e la reciproca influenza tra lo stato di metilazione del DNA ed il sonno e, in particolare, tra lo stato di metilazione dei geni dell'orologio circadiano e la perdita di sonno. È stato dimostrato, infatti, che individui che dormono brevemente (< 6,8h) mostrano pattern di metilazione del DNA alterati in 52 geni rispetto ad individui che dormono a lungo (> 7,8h). Inoltre, anche all'interno dei geni del ritmo circadiano due siti CpG nelle regioni predette dell'enhancer di PER1 e un sito CpG nella regione del promotore di CRY1 sono risultati significativamente ipermetilati in campioni di tessuto adiposo di individui maschi privati del sonno. I cambiamenti nella metilazione del DNA possono quindi verificarsi a seguito della privazione del sonno e possono portare all'interruzione di processi fisiologici come il metabolismo e la regolazione dei ritmi circadiani, influenzando la durata e la qualità del sonno (Gaine ME et al., 2018).

### **3.4.2. Acetilazione degli istoni**

Tra le modificazioni epigenetiche della cromatina, l'acetilazione degli istoni è cruciale nel regolare l'accessibilità del DNA ai fattori di trascrizione, in particolare a BMAL1, CLOCK e NPAS2, fondamentali per attivare l'espressione genica dei geni dell'orologio. Il DNA per formare la cromatina si avvolge attorno a particolari proteine dette istoni e la loro acetilazione facilita il legame tra l'acido desossiribonucleico e i fattori di trascrizione, portando alla loro attivazione. I principali target di BMAL1 e CLOCK sono i geni *Per1* e *Per2*, questi originano il feedback negativo nella regolazione dell'orologio circadiano modulando l'attività di BMAL e CLOCK nella durata delle 24 ore (Mongrain V. et al., 2011).

L'acetilazione degli istoni è la modificazione post-traduzionale (PTM) più studiata nel sistema nervoso. È catalizzata dalle acetiltransferasi di lisina (HAT/KAT) che trasferiscono una porzione acetilica dall'acetil-CoA ai residui di lisina su una proteina bersaglio. La reazione inversa a questa è catalizzata dalle lisina-deacetilasi (HDAC/KDAC). L'acetilazione degli istoni indebolisce le interazioni istone-DNA con conseguente rilassamento della conformazione della cromatina, facilitando il reclutamento del macchinario trascrizionale (RNA polimerasi). L'interazione dinamica tra HAT e HDAC contribuisce a determinare la regolazione dell'espressione genica. La ridotta espressione o funzione degli HAT può portare a disfunzione neuronale associata a una diminuzione dell'acetilazione degli istoni, come osservato in diversi modelli di malattie neurodegenerative e disturbi dei cicli sonno-veglia. La perdita di sonno influenza le modificazioni degli istoni, influenzando così la trascrizione genica. L'orologio circadiano è, infatti, strettamente legato allo stato epigenetico della cromatina e la cooperatività tra HAT e HDAC regola la trascrizione ritmica dei geni bersaglio dell'orologio. In particolare, la proteina CLOCK, uno dei più importanti regolatori del ritmo circadiano, è un fattore di trascrizione e un'istone acetiltransferasi insieme agli istoni H3 e H4, substrati primari per l'acetilazione. La proteina CLOCK può anche acetilare direttamente le proteine coinvolte nella funzione circadiana, tra cui BMAL1, favorendo così il reclutamento della proteina CRY1 nel complesso eterodimero CLOCK/BMAL1 il quale può reclutare sirtuina 1 (SIRT1) per facilitare l'acetilazione ritmica degli istoni al promotore del gene *Dbp* portando all'espressione del fattore di trascrizione PAR BZIP (*Dbp*), coinvolto nella

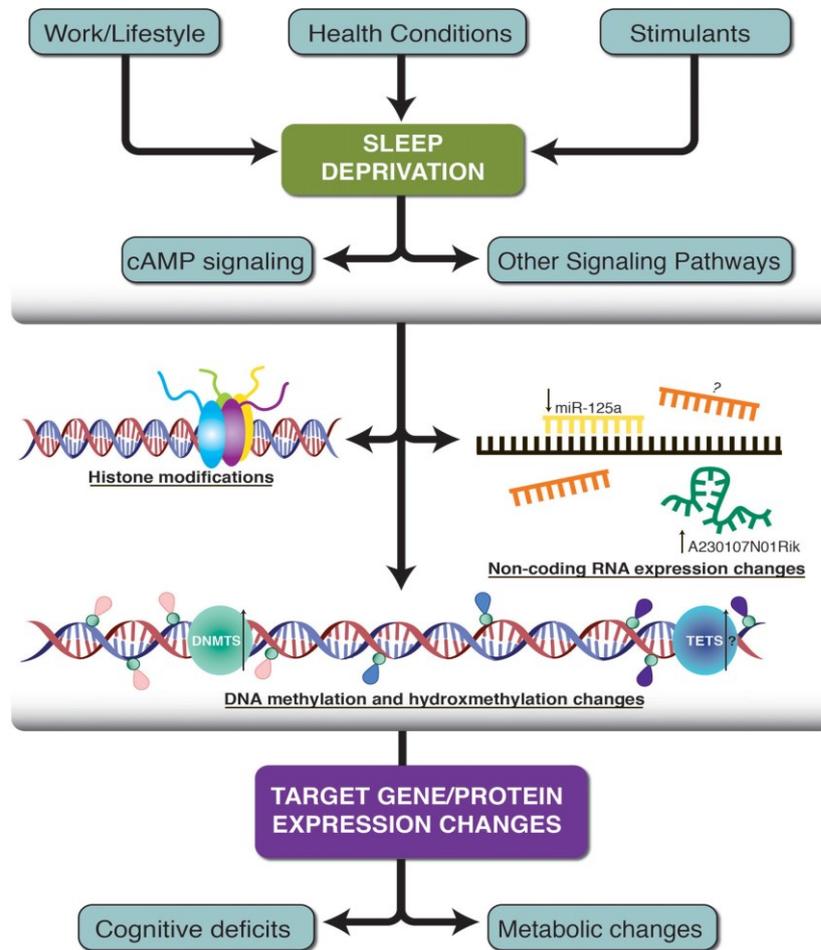
regolazione dei ritmi circadiani. Diversi studi suggeriscono che le modificazioni degli istoni, in particolare nell'ippocampo, sono associate, oltre che alla privazione del sonno, anche ai deficit cognitivi come la compromissione della memoria (Gaine ME et al., 2018).

### **3.4.3. RNA non codificanti**

Una parte sostanziale del genoma è costituito da RNA non codificanti, molecole attivamente trascritte dal DNA ma che non codificano per le proteine. Nel contesto del sonno vengono presi in considerazione due dei molteplici tipi di RNA non codificanti, ossia i lcnRNA (long non-coding RNA) e i microRNA. I lcnRNA sono più grandi dei microRNA (>200 coppie di basi) e hanno diversi ruoli, tra cui il reclutamento di componenti epigenetici e regolatori per colpire i loci genomici e la regolazione dello splicing e della traduzione. Alcuni lcnRNA sono anche in grado di codificare piccole proteine, chiamate micropeptidi, mettendo in discussione la loro iniziale definizione. Gli lcnRNA sono collegati al meccanismo circadiano, ad esempio, la delezione dell'lcRNA 116HG causa una disregolazione dei geni circadiani Clock, Cry1 e Per2, così come la privazione del sonno comporta un'espressione differenziale di diversi lcnRNA. I microRNA maturi, invece, sono piccole molecole a filamento singolo (~22 nucleotidi) che si trovano prevalentemente nel citoplasma e originariamente vengono trascritti come trascritti primari più lunghi e poi tagliati, anche se alcuni possono restare policistronici (Gaine ME et al., 2018).

Diversi studi hanno dimostrato che i microRNA sono associati all'espressione circadiana e al sonno, ciò include: miR-132 regolato da CREB e miR-291-1 regolato da CLOCK/BMAL1, che sono stati associati alla temporizzazione circadiana; il cluster miR-192/194, che reprime Per1-3; e miR-142-3p, che può modulare l'espressione della proteina BMAL1. I microRNA sono abbondanti nel cervello, possono essere trovati all'interno delle spine dendritiche e sono stati associati a molti processi neurologici, tra cui la plasticità sinaptica. È stato anche scoperto che i numerosi microRNA presenti nel cervello sono espressi in modo differenziale in specifiche regioni, suggerendo che il sonno può incorrere in una regolazione tessuto-specifica dell'espressione dei microRNA. Questi RNA sono quindi in grado di contribuire alla regolazione del ciclo sonno-veglia, influenzando

i livelli delle proteine dell'orologio circadiano modulando la stabilità e la traduzione degli mRNA corrispondenti (Gaine ME et al., 2018).



**Figura 3.** Schema dei tre meccanismi epigenetici primari che risultano alterati in seguito alla privazione del sonno, ossia la metilazione o acetilazione/deacetilazione del DNA e ncRNA. Il lavoro e lo stile di vita, le condizioni di salute e gli stimolanti possono portare alla privazione del sonno che provoca conseguenti alterazioni neurobiologiche. Le etichette rosa rappresentano le citosine metilate, le etichette blu rappresentano le citosine non metilate e le etichette viola rappresentano le citosine idrossimetilate. I cerchi verdi e blu rappresentano gli enzimi DNA metiltransferasi (DNMT) e traslocazione Ten-undici (TET). Le frecce nere indicano la direzione dell'espressione (Gaine ME. Et al., 2018).

Pertanto, anche i geni legati al ciclo sonno-veglia sono controllati da modificazioni epigenetiche fondamentali per il mantenimento del ritmo circadiano e dell'omeostasi del sonno.

## **4. Regolazione epigenetica**

Il termine epigenetica è stato coniato nel 1942 dal filosofo e scienziato inglese Conrad Hal Waddington (1905-1975) il quale la definì come "la branca della biologia che studia le interazioni causali fra i geni e il loro prodotto cellulare e pone in essere il fenotipo". Con epigenetica ci si riferisce a tutte le modificazioni ereditabili che sono in grado di alterare l'espressione genica, il genotipo, senza modificarne la sequenza di DNA e quindi il fenotipo. L'assenza di cambiamenti nel genotipo implica l'intervento di fattori extra-genomici, l'effetto dell'ambiente risulta quindi centrale nella regolazione. Questi cambiamenti sono reversibili e possono essere modificati o cancellati in risposta a diversi stimoli, tra cui i fattori ambientali (Treccani enciclopedia). Tutte le molecole che contribuiscono alle modificazioni epigenetiche che avvengono all'interno del nostro organismo possono essere racchiuse in quello che i ricercatori definiscono epigenoma, che si differenzia dal genoma, insieme di tutti i geni che compongono il nostro organismo.

### **4.1. Influenze epigenetiche nei clock genes**

I geni dell'orologio circadiano subiscono una regolazione epigenetica tramite i meccanismi di rimodellamento della cromatina.

#### **4.1.1. BMAL1**

Il gene BMAL1 viene influenzato dalla metilazione del DNA nel suo promotore. Quando la metilazione è ridotta il gene BMAL1 è più attivo e, essendo un gene fondamentale nel circuito di feedback della regolazione circadiana, promuove l'espressione degli altri geni dell'orologio. Quando, invece, la metilazione è estesa questa è in grado di reprimere l'espressione del gene BMAL1. La metilazione del DNA colpisce il promotore di BMAL1 e più in particolare i molteplici siti CpG al suo interno. Queste regioni sono regioni promotrici che contengono anche elementi E-box, ossia siti di legame per il complesso CLOCK-BMAL1. La metilazione dei siti CpG, quindi, impedisce il legame tra il DNA e i fattori di trascrizione, riducendo la trascrizione del gene BMAL1. Anche le regioni enhancer distali possono essere influenzate da modificazioni epigenetiche, queste regioni si trovano solitamente a migliaia di basi dal promotore ma possono interagire fisicamente con esso grazie al rimodellamento della cromatina che comporta la formazione di un "loop" che

avvicina le due zone. La regolazione di BMAL1 non è, quindi, solo immediata in seguito alla metilazione del suo promotore, ma deriva anche da un controllo a lunga distanza ad opera delle regioni enhancer. L'interazione tra enhancer e promotore regola la trascrizione del gene BMAL1 aumentando la sua espressione in specifici momenti del ciclo circadiano, e di conseguenza degli altri geni dell'orologio, per sincronizzare la sua attività col ciclo luce-buio. Un'altra modificazione epigenetica che influenza la trascrizione del gene BMAL1 è l'acetilazione degli istoni, in particolare, l'acetilazione degli istoni H3 e H4 facilita l'apertura della cromatina che circonda BMAL1, rendendo più semplice il legame tra DNA e fattori di trascrizione, come il complesso eterodimero CLOCK-BMAL1 (Papazyan R. et al, 2016). L'espressione di BMAL1 viene influenzata anche dall'interazione del suo promotore con i ncRNA, in particolare con i lncRNA. Questi sono in grado di reclutare complessi come PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), in grado di metilare specifici residui di lisina sugli istoni come H3K27 e silenziare l'espressione genica di BMAL1. I lncRNA possono operare anche a livello delle regioni enhancer e vengono detti enhancer-associated lncRNA (elncRNA). Questi elncRNA contribuiscono all'espressione ritmica dei geni dell'orologio in determinati periodi della giornata in base ai diversi segnali ambientali come il ciclo luce-buio (Cao J., 2014).

#### **4.1.2. CLOCK**

Il gene CLOCK è noto per funzionare in coppia col gene BMAL1 formando l'eterodimero CLOCK-BMAL1. Il gene CLOCK subisce delle modificazioni epigenetiche, come l'acetilazione e la metilazione, che influenzano la sua capacità di legarsi al DNA, condizionando di conseguenza l'espressione degli altri geni dell'orologio. La metilazione del DNA avviene, come per BMAL1, a livello del promotore e quando cospicua riduce i livelli di espressione di CLOCK. Questo processo opera insieme alla deacetilazione degli istoni, questi due meccanismi regolano negativamente la trascrizione di CLOCK per mantenere un equilibrio tra l'attivazione e la repressione del gene nel corso del ciclo circadiano. Acetilazione e deacetilazione degli istoni sono processi che modificano la struttura della cromatina: mentre l'acetilazione rilassa la struttura del DNA rendendolo più accessibile ai fattori di trascrizione, la deacetilazione spezza il legame tra un gruppo

acetile  $\text{CH}_3\text{CO}^-$  e una molecola facendo sì che il legame tra istoni e DNA divenga più stretto, impedendo così l'intervento dei fattori di trascrizione e reprimendo l'espressione genica di CLOCK (Treccani). La deacetilazione degli istoni ad opera di enzimi come le "istone deacetilasi" (HDAC) compatta, infatti, la struttura della cromatina, impedendo il legame tra la regione di DNA ed il complesso CLOCK-BMAL1 e reprimendo la trascrizione dei geni dell'orologio sotto il controllo di CLOCK. CLOCK è noto anche per interagire con co-attivatori ad attività istone acetiltransferasica (HAT), come CBP/p300, i quali aggiungendo gruppi acetilici agli istoni rilassano la struttura della cromatina facilitando il legame al DNA. Inoltre, anche alcune regioni introniche di CLOCK contengono sequenze regolatorie soggette a modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA e, in particolare, la trimetilazione (aggiunta di 3 gruppi metilici) dell'istone 3 lisina 27 (H3K27me3) che rende la cromatina più densa e meno accessibile ai fattori di trascrizione diminuendo di conseguenza l'attività trascrizionale di CLOCK (Papazyan R. et al, 2016).

Anche i microRNA, piccole molecole di RNA non codificante, sono in grado di regolare l'espressione genica post-trascrizionale dei geni dell'orologio legandosi a mRNA target. In particolare, il microRNA miR-132 è in grado di modulare l'espressione del gene CLOCK nel SCN, il pacemaker centrale del ritmo circadiano nei mammiferi, dimostrando l'importanza dei microRNA nella regolazione temporale dei geni circadiani (Mongrain V. et al., 2011).

Inoltre, lo stato di acetilazione della proteina CLOCK, codificata dal gene omonimo, è influenzato dall'attività enzimatica delle sirtuine, famiglia di regolatori epigenetici deacetilasi. La loro attività dipende dalle concentrazioni di  $\text{NAD}^+$  cellulare: quando i livelli di  $\text{NAD}^+$  sono elevati, l'attività delle sirtuine aumenta e comporta una riduzione dell'acetilazione di CLOCK; quando i livelli di  $\text{NAD}^+$  diminuiscono, avviene l'acetilazione del gene (Nakahata Y, Kaluzova M, 2008).

#### **4.1.3. PER**

I geni Period PER1, PER2, PER3 sono soggetti a modificazioni epigenetiche a livello delle loro regioni promotrici. Metilazione e deacetilazione degli istoni avvengono a livello degli elementi E-box e D-box all'interno dei promotori. Questi meccanismi comportano la compattazione della cromatina (eterocromatina)

riducendo l'accessibilità del DNA ai fattori di trascrizione, reprimendo di conseguenza l'espressione dei geni PER e limitando la loro espressione a particolari periodi del ciclo circadiano. Anche i geni PER, come CLOCK, subiscono una regolazione temporale ad opera di regioni enhancer e silencer distali grazie alle modificazioni della struttura del DNA. Questi elementi contribuiscono alla repressione temporalizzata di PER, per far in modo che sia attivo solo in determinati periodi del ciclo luce-buio (Papazyan R. et al, 2016). Anche i lncRNA contribuiscono al controllo epigenetico dei geni PER, legando regioni promotrici o enhancer e reclutando complessi che operano la metilazione degli istoni, rendendo così la cromatina più compatta e meno accessibile. Questa regolazione negativa rientra nella fase repressiva del ciclo di feedback circadiano (Cao J., 2014).

#### **4.1.4. CRY**

I geni Cryptochrome CRY1 e CRY2 agiscono come repressori dell'eterodimero CLOCK-BMAL1 e sono anch'essi regolati a livello epigenetico tramite modifiche della struttura della cromatina. A livello dei promotori di CRY 1 e CRY2 la metilazione del DNA è in grado di reprimere la trascrizione dei geni; la compattazione della cromatina può infatti impedire il legame tra DNA e fattori trascrizionali, inibendo di conseguenza la trascrizione del complesso CLOCK-BMAL1 e dei restanti geni del meccanismo circadiano. L'acetilazione degli istoni, invece, aumenta l'espressione di CRY e avviene in particolare a livello degli istoni H3 e H4 nei pressi del promotore. Anche gli enhancer di CRY sono influenzati, oltre che dall'acetilazione degli istoni, la quale aumenta l'espressione del gene in modo specifico durante il giorno, anche da cofattori epigenetici. Quest'ultimi sono proteine particolari che modificano indirettamente la struttura della cromatina mediante il reclutamento di enzimi come le "istone acetiltransferasi" (HAT), le quali rilassano la cromatina e facilitano la trascrizione di CRY (Papazyan R. et al, 2016). Anche i lncRNA influiscono nell'attivazione o nella repressione della trascrizione dei geni CRY, possono infatti favorire l'espressione di CRY promuovendo l'acetilazione degli istoni vicini al promotore del gene, oppure la sua inibizione mediante l'interazione con complessi repressori epigenetici (Cao J., 2014). Tutti questi meccanismi modulano l'espressione di CRY in relazione agli

altri geni dell'orologio e ai fattori ambientali esterni, in particolare il ciclo luce-buio.

#### **4.1.5. REV-ERB**

REV-ERB è un regolatore negativo del ciclo circadiano e influenza, in particolare, l'espressione di BMAL1 tramite meccanismi epigenetici come la metilazione del DNA e la deacetilazione degli istoni che ne reprimono o promuovono l'attività trascrizionale. In particolare, REV-ERB recluta particolari enzimi come le "istone deacetilasi" (HDAC) che deacetilano gli istoni a livello del promotore di BMAL1. Questo processo compatta la cromatina e la rende meno accessibile per il legame con il DNA, contribuendo così alla repressione di BMAL1. Vengono regolate epigeneticamente anche regioni a valle del promotore di REV-ERB come regioni silencer ed enhancer distali che contribuiscono alla repressione temporalizzata del gene BMAL1 in base al ciclo circadiano (Papazyan R. et al, 2016). Sempre con la stessa finalità operano anche i lncRNA reclutando il complesso PRC2 a livello del promotore, il quale metila il DNA a livello dell'istone H3K27 e silenzia, di conseguenza, l'espressione del gene. Se i lncRNA si legano invece alle regioni enhancer favoriscono l'espressione di REV-ERB in risposta ai segnali ambientali, contribuendo appunto alla regolazione dei ritmi circadiani (Cao J., 2014).

#### **4.1.6. NPAS2**

Il gene NPAS2 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'espressione dei geni dell'orologio centrale mediante l'interazione con BMAL1. Anche NPAS2 subisce un controllo epigenetico ad opera sia della metilazione del DNA a livello di siti specifici CpG all'interno della regione del promotore NPAS2, sia dell'acetilazione e deacetilazione istoniche le quali influiscono negativamente o positivamente nell'espressione del gene. Studi hanno dimostrato che un'interruzione del normale ciclo di trascrizione di NPAS2 può essere collegato a diversi problemi di salute, tra cui il cancro. Un'altra modificazione epigenetica che influenza l'espressione di NPAS2 riguarda gli RNA non codificanti, in particolare i lncRNA. Questi sono in grado di interagire con la cromatina nei pressi del promotore del gene e reclutare complessi enzimatici in grado di modificare la struttura degli istoni, modificando di conseguenza l'accessibilità al DNA.

Reclutando complessi enzimatici come il complesso PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), operante la metilazione degli istoni H3K27, i lncRNA sono in grado di silenziare o attivare NPAS2. Alcuni lncRNA possono, inoltre, influire direttamente sulla trascrizione del gene agendo sulle regioni enhancer, controllando finemente l'espressione del gene in relazione al ciclo circadiano (Reszka E, Zienolddiny S, 2018).

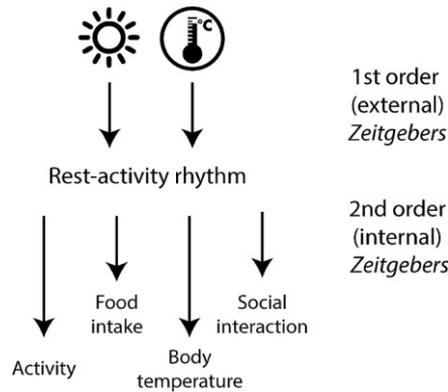
## **5. Fattori ambientali**

### **5.1. Zeitgeber**

Le variazioni ritmiche nei processi fisiologici e comportamentali che regolano la propensione al sonno sono mediate sia da fattori endogeni che esogeni. I fattori endogeni includono fattori biologici autosufficienti come fattori neuronali, neurotrasmettitoriali, ormonali e genetici. I fattori endogeni comprendono pacemaker biologici o orologi autosufficienti che, in assenza di forti influenze esterne, autosostengono i ritmi periodici in processi fisiologici e psicologici diversi, come la temperatura corporea interna, assunzione di cibo, prestazioni cognitive e umore (Piggins HD, 2002). Poiché il periodo endogeno dell'orologio circadiano è di circa 24 ore, deve essere coordinato al ciclo esterno di 24 ore ogni giorno. I segnali Zeitgeber sono quegli stimoli che possono reimpostare l'orologio circadiano. I principali segnali esterni, detti segnali del primo ordine, sono il ciclo luce-buio e le variazioni di temperatura esterna; mentre i segnali interni dello Zeitgeber, detti segnali del secondo ordine, assicurano la sincronizzazione di diversi orologi biologici tra loro e con l'ora esterna. I segnali interni più importanti sono l'attività locomotoria, i tempi di assunzione del cibo, la temperatura corporea e l'interazione sociale (Figura 4). Questi fattori influenzano le modificazioni epigenetiche relative ai geni del ciclo sonno-veglia, in particolare la metilazione del DNA (Husse J et al., 2015).

L'esercizio fisico influisce sui ritmi circadiani anche tramite l'interazione con processi metabolici, in particolare attraverso la regolazione di ormoni come il cortisolo e la melatonina che a loro volta possono alterare l'espressione dei geni circadiani. La temperatura corporea viene modificata da diversi fattori come

cambiamenti ambientali, alimentazione e attività fisica e può causare modificazioni epigenetiche nella regolazione dell'espressione dei geni del metabolismo e della risposta allo stress. Ed infine, l'interazione sociale influenza i ritmi circadiani in particolare grazie alla regolazione dei livelli ormonali, ad esempio della serotonina e del cortisolo, che avvengono in risposta a cambiamenti dell'umore e del benessere psico-fisico dettati dall'interazione con altri individui (Husse J et al., 2015).



**Figura 4.** Rappresentazione schematica degli Zeitgeber di primo e secondo ordine e la loro correlazione con la rispettiva regolazione del ciclo sonno-veglia e dell'attività locomotoria, della tempistica di assunzione del cibo, della temperatura corporea e dell'interazione sociale (Husse J. et al., 2015).

## 5.2. Influenze epigenetiche

I singoli geni dell'orologio circadiano subiscono modificazioni a livello epigenetico che permettono di regolare il ciclo sonno-veglia anche in risposta a stimoli ambientali, come l'alternanza luce-buio, l'alimentazione, l'attività fisica e le interazioni sociali. Questa complessa regolazione influenza profondamente i ritmi circadiani e il ciclo sonno-veglia degli individui.

I fattori ambientali influenzano l'accessibilità del DNA e la conseguente trascrizione dei geni dell'orologio, principalmente attraverso modificazioni della cromatina come l'acetilazione degli istoni e la metilazione del DNA (Papazyan R. et al, 2016).

### 5.2.1. Luce

Il cervello risponde a segnali luminosi per regolare i cicli sonno-veglia e i ritmi comportamentali e neuroendocrini quotidiani. La luce è il principale sincronizzatore del ritmo circadiano, questa colpisce la retina e attiva il

fotopigmento melanopsina. La melanopsina è una molecola presente sulla retina che svolge un ruolo fondamentale nell'inviare al cervello l'informazione della presenza di luce o di buio e, sotto una luce intensa, è in grado di sopprimere l'ormone melatonina responsabile della regolazione del sonno (Mure LS et al., 2018). La melanopsina è contenuta in una popolazione specializzata di cellule gangliari retiniche intrinsecamente fotosensibili 'ipRGC' che trasmettono l'informazione luminosa attraverso il tratto retinoipotalamico per impostare la fase del SCN, che risponde generando pattern circadiani di potenziali d'azione. Il SCN è costituito da un cluster eterogeneo di circa 10.000 neuroni nell'ipotalamo ventrale che possono essere divisi in base alla loro espressione dei neuropeptidi arginina vasopressina (AVP) o di peptide intestinale vasoattivo (VIP). I neuroni che esprimono VIP nel "nucleo" ventrolaterale del SCN ricevono input sinaptici dagli ipRGC e si ritiene che la risposta di questi neuroni e degli astrociti sia importante per mantenere la sincronia all'interno del SCN. La risposta dei neuroni SCN ai segnali luminosi in arrivo coinvolge l'attivazione dei recettori NMDA sui neuroni SCN, l'attivazione del calcio di CAMKII e l'attivazione della trascrizione genica (Benazzi et al., 2021).

Nello specifico, la risposta ai cambiamenti nel ciclo luce-buio influenza la metilazione del DNA negli SCN (nuclei soprachiasmatici), questa modificazione epigenetica è catalizzata dalla famiglia di enzimi chiamati DNA metiltransferasi (DNMT) e comporta l'aggiunta di un gruppo metilico alla posizione 5' dei residui di citosina. Il ruolo di questa modificazione epigenetica nella regolazione della trascrizione dei geni dell'orologio (subiscono tutti un controllo epigenetico mediante i meccanismi di rimodellamento della cromatina come la metilazione del DNA) è quello di modulare la loro espressione in relazione al ciclo luce-buio, ad esempio, l'ipometilazione del promotore e l'ipermetilazione del corpo genico influenzano positivamente la trascrizione, mentre la metilazione del promotore generalmente induce la repressione della trascrizione. È stato dimostrato in topi che l'esposizione ad un ciclo di luce di 22 (topi 22-h) ore anziché di 24 (topi 24-h) comporta alterazioni nella metilazione del DNA nei promotori dei geni legati a SCN. Lo stato di metilazione dei geni dell'orologio ha mostrato alterazioni specifiche nei geni dei topi 22-h rispetto a quelli 24-h d che erano correlate con i cambiamenti trascrizionali. In particolare, aumenti delle metilazioni dei promotori

Per2 e Cry1 sono stati accompagnati da diminuzioni della trascrizione SCN, mentre la diminuzione della metilazione del promotore Clock sono state accompagnate da un aumento della trascrizione. Queste modificazioni epigenetiche indotte dalla luce non sono permanenti, una volta ristabilita la corretta esposizione alla luce nel ciclo di 24 ore i ritmi circadiani vengono ristabiliti (Azzi A. et al., 2014).

Il processo di condizionamento dell'orologio principale da parte della luce avviene in una finestra temporale di fotosensibilità (per lo più notturna) durante la quale l'esposizione alla luce può spostare l'orologio, al contrario dell'ora odierna (di solito, intorno a mezzogiorno), durante la quale la luce non ha effetti di ripristino di fase o ha effetti di ripristino di fase minoritari. Questa particolare sensibilità dell'orologio principale all'intensità della luce ambientale è un elemento chiave nel sistema di temporizzazione circadiana che consente agli animali di essere in fase con un cambiamento giornaliero altamente prevedibile nell'ambiente (Challet E., 2015).

### **5.2.2. Metabolismo**

La dieta ed il metabolismo possono influenzare il controllo dei meccanismi epigenetici che contribuiscono alla regolazione dei geni circadiani. L'acetilazione degli istoni è influenzata dai livelli di acetil-CoA, metabolita prodotto durante il metabolismo dei carboidrati e dei grassi. Una dieta ricca di grassi e zuccheri comporta un maggior apporto di acetil-CoA, la quale promuove l'acetilazione degli istoni a livello dei promotori dei clock genes facilitando quindi il legame tra fattori di trascrizione e geni target. La metilazione del DNA è influenzata dal metabolismo dell'acido folico (vitamina B9) e della metionina, i quali influiscono nella disponibilità di gruppi metili, substrati essenziali per il processo. L'apporto eccessivo di cibi che li contengono come verdure a foglia verde, frattaglie, latte, uova e frutta secca contribuisce ad incrementare la metilazione dei siti CpG dei geni circadiani, favorendo la repressione della loro trascrizione.

Anche le sirtuine, regolatori epigenetici deacetilasi dipendenti dal NAD<sup>+</sup>, sono in grado di modulare l'espressione dei geni dell'orologio come CLOCK e BMAL1 e sono influenzate dalla dieta e dal metabolismo energetico. Uno scarso apporto calorico, infatti, aumenta i livelli di NAD<sup>+</sup>, incrementando l'attività delle sirtuine e di conseguenza influenzando l'espressione dei geni circadiani (Sato T., Sassone-Corsi P., 2022).

### **5.2.3. Stress ed Esercizio fisico**

La secrezione dell'ormone dello stress, il cortisolo, segue un ritmo circadiano e viene stimolata in seguito all'esposizione a situazioni stressanti. Il cortisolo regola la trascrizione di diversi geni, principalmente attraverso l'attivazione del recettore dei glucocorticoidi (GR). In particolare, i geni *Period* contengono i GRE (recettori dei glucocorticoidi) nei loro promotori, dove i GR possono legarsi e regolare la trascrizione. Questa regolazione sfrutta anche i meccanismi epigenetici di rimodellamento della cromatina influenzando sia l'espressione di miRNA, che influiscono sull'attività del gene *Per2*, sia l'acetilazione e la metilazione degli istoni modulando l'attività dei geni dell'orologio. È stato, inoltre, dimostrato che la somministrazione di glucocorticoidi e l'esposizione allo stress psicosociale comportano un aumento dell'espressione dei geni *Period* (Yurtsever T. et al., 2019). Diversi studi sottolineano che anche l'esercizio fisico influisce nelle modificazioni epigenetiche come modulatore dell'acetilazione degli istoni, in particolare H3 e H4, e della produzione di miRNA, promuovendo la modificazione della cromatina che può portare alla trascrizione selettiva o all'inibizione di diversi geni, tra cui quelli legati ai ritmi circadiani (Grazioli E. et al., 2017).

## **6. Disturbi del sonno**

Il sonno è una componente essenziale della salute umana in generale, ma è così strettamente regolato che, se interrotto, può causare o peggiorare alcuni disturbi. I disturbi del ritmo circadiano includono il disturbo della fase del sonno ritardata, il disturbo della fase avanzata del sonno, il jet lag, il disturbo del lavoro a turni, il ritmo sonno-veglia irregolare e la sindrome sonno-veglia non di 24 ore. I sintomi di questi disturbi includono insonnia, difficoltà a svegliarsi al mattino, perdita di sonno, depressione, scarso rendimento lavorativo o scolastico e incapacità di soddisfare gli obblighi sociali (Vasey et al., 2021). Le alterazioni epigenetiche che derivano dalla perdita di sonno possono avere effetti duraturi, contribuendo appunto ai disturbi del sonno e ad un aumento della probabilità di sviluppare patologie legate a disfunzioni circadiane, come disturbi del sonno cronici, depressione e disturbi metabolici. La metilazione del DNA a livello del gene *CRY1*, ad esempio, è correlata a disturbi del ciclo sonno veglia che aumentano la probabilità di sviluppare

disturbi metabolici, come il diabete di tipo 2. La perdita di sonno causa anche una riduzione dell'acetilazione degli istoni nei geni dell'orologio *Per1* e *Per2*, in questa situazione la cromatina si trova più condensata e meno accessibile al legame di *BMAL1/CLOCK* e ciò compromette la loro capacità di legarsi al DNA in corrispondenza dei geni target riducendo la loro espressione e, di conseguenza, alterando i ritmi circadiani e la regolazione del ciclo sonno-veglia (Mongrain V. et al., 2011). Inoltre, ad uno dei sintomi più comuni tra i diversi disturbi del sonno, ossia l'ipersonnolenza, definita come un'eccessiva sonnolenza diurna spesso accompagnata da una prolungata durata del sonno, sono stati associati anomali livelli di metilazione del DNA in nove siti CpG associati ai geni *PAX8* e *PAX8-AS1* (Plante DT. et al., 2021).

## **7. Conclusione**

Il ciclo sonno-veglia è regolato in maniera complessa da diversi fattori ambientali e genetici ed è facilmente soggetto a perturbazioni che possono nuocere alla salute umana. Soprattutto nella società odierna, la necessità di spostarsi in diverse parti del mondo e l'avvento della tecnologia hanno comportato esposizioni anomale ai diversi *Zeitgeber* portando le persone a cambiare coscientemente le loro abitudini senza preoccuparsi delle conseguenze. Tuttavia, grazie ai diversi studi fatti in merito alla regolazione dei sistemi circadiani, oggi con strategie come la fototerapia, la regolazione all'esposizione alla luce e il crono-esercizio, si possono ripristinare i corretti ritmi. Inoltre, la comprensione delle modifiche epigenetiche della cromatina legate alla perdita di sonno offre nuove prospettive per lo sviluppo di trattamenti mirati che possano correggere i disallineamenti circadiani. Potenziali interventi potrebbero includere farmaci che modulano l'acetilazione degli istoni o che promuovono il legame dei fattori di trascrizione ai geni dell'orologio (Mongrain V. et al., 2011).

## 8. Bibliografia

Azzi A, Dallmann R, Casserly A, Rehrauer H, Patrignani A, Maier B, Kramer A, Brown SA. Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation. *Nat Neurosci*. 2014 Mar;17(3):377-82. doi: 10.1038/nn.3651. Epub 2014 Feb 16. PMID: 24531307.

Benazzi S, Gorini S, Feraco A, Caprio M. *Ritmi circadiani e variabili metaboliche*. *L'Endocrinologo*. 2021;22(6):533–43. Italian. doi: 10.1007/s40619-021-00983-5. Epub 2021 Nov 5. PMID: PMC8569496.

Cao J. *The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics*. *Biol Proced Online*. 2014 Sep 15; 16:11. doi: 10.1186/1480-9222-16-11. PMID: 25276098; PMID: PMC4177375.

Carskadon, M.A., & Dement, W.C. (2011). *Monitoring and staging human sleep*. In M.H. Kryger, T. Roth, & W.C. Dement (Eds.), *Principles and practice of sleep medicine*, 5th edition, (cap.2, pp 16-26). St. Louis: Elsevier Saunders.

Challet E. *Keeping circadian time with hormones*. *Diabetes Obes Metab*. 2015 Sep;17 Suppl 1:76-83. doi: 10.1111/dom.12516. PMID: 26332971.

Chauhan S, Norbury R, Faßbender KC, Ettinger U, Kumari V. *Beyond sleep: A multidimensional model of chronotype*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2023 May; 148:105114. doi: 10.1016/j.neubiorev.2023.105114. Epub 2023 Mar 1. PMID: 36868368.

Cox KH, Takahashi JS. *Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism*. *J Mol Endocrinol*. 2019 Nov;63(4): R93-R102. doi: 10.1530/JME-19-0153. PMID: 31557726; PMID: PMC6872945.

Enciclopedia Treccani online: [www.treccani.it/vocabolario](http://www.treccani.it/vocabolario)

Falup-Pecurariu C, Diaconu Ş, Țiņţ D, Falup-Pecurariu O. *Neurobiology of sleep* (Review). *Exp Ther Med*. 2021 Mar;21(3):272. doi: 10.3892/etm.2021.9703. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33603879; PMID: PMC7851648.

Gaine ME, Chatterjee S, Abel T. *Sleep Deprivation and the Epigenome*. *Front Neural Circuits*. 2018 Feb 27; 12:14. doi: 10.3389/fncir.2018.00014. PMID: 29535611; PMID: PMC5835037.

Gallicchio L, Kalesan B. Sleep duration and mortality: a systematic review and meta-analysis. *J Sleep Res*. 2009 Jun;18(2):148-58. doi: 10.1111/j.1365-2869.2008.00732.x. PMID: 19645960.

Granada AE, Bordyugov G, Kramer A, Herzel H. *Human chronotypes from a theoretical perspective*. *PLoS One*. 2013;8(3): e59464. doi: 10.1371/journal.pone.0059464. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23544070; PMID: PMC3609763.

Grazioli E, Dimauro I, Mercatelli N, Wang G, Pitsiladis Y, Di Luigi L, Caporossi D. Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. *BMC Genomics*. 2017 Nov 14;18(Suppl 8):802. doi: 10.1186/s12864-017-4193-5. PMID: 29143608; PMCID: PMC5688489.

Husse J, Eichele G, Oster H. *Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time*. *Bioessays*. 2015 Oct;37(10):1119-28. doi: 10.1002/bies.201500026. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26252253; PMCID: PMC5054915.

Kalmbach DA, Schneider LD, Cheung J, Bertrand SJ, Kariharan T, Pack AI, Gehrman PR. *Genetic Basis of Chronotype in Humans: Insights From Three Landmark GWAS*. *Sleep*. 2017 Feb 1;40(2): zsw048. doi: 10.1093/sleep/zsw048. PMID: 28364486; PMCID: PMC6084759.

Le Bon O. *Relationships between REM and NREM in the NREM-REM sleep cycle: a review on competing concepts*. *Sleep Med*. 2020 Jun; 70:6-16. doi: 10.1016/j.sleep.2020.02.004. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32179430.

Mongrain V, La Spada F, Curie T, Franken P. *Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK, and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex*. *PLoS One*. 2011;6(10): e26622. doi: 10.1371/journal.pone.0026622. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22039518; PMCID: PMC3200344.

Mure LS, Hatori M, Ruda K, Benegiamo G, Demas J, Panda S. *Sustained Melanopsin Photoresponse Is Supported by Specific Roles of  $\beta$ -Arrestin 1 and 2 in Deactivation and Regeneration of Photopigment*. *Cell Rep*. 2018 Nov 27;25(9):2497-2509.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.008. PMID: 30485815; PMCID: PMC6396282.

Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 2008 Jul 25;134(2):329-40. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002. PMID: 18662547; PMCID: PMC3526943.

Papazyan R, Zhang Y, Lazar MA. *Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription*. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Dec 6;23(12):1045-1052. doi: 10.1038/nsmb.3324. PMID: 27922611; PMCID: PMC5497498.

Piggins HD. *Human clock genes*. *Ann Med*. 2002;34(5):394-400. doi: 10.1080/078538902320772142. PMID: 12452483.

Plante DT, Papale LA, Madrid A, Cook JD, Prairie ML, Alisch RS. *PAX8/PAX8-AS1 DNA methylation levels are associated with objective sleep duration in persons with unexplained hypersomnolence using a deep phenotyping approach*. *Sleep*. 2021 Oct 11;44(10): zsab108. doi: 10.1093/sleep/zsab108. PMID: 34145460.

Reszka E, Zienolddiny S. Epigenetic Basis of Circadian Rhythm Disruption in Cancer. *Methods Mol Biol.* 2018; 1856:173-201. doi: 10.1007/978-1-4939-8751-1\_10. Erratum in: *Methods Mol Biol.* 2018;1856:C1. doi: 10.1007/978-1-4939-8751-1\_18. PMID: 30178252.

Sato T, Sassone-Corsi P. Nutrition, metabolism, and epigenetics: pathways of circadian reprogramming. *EMBO Rep.* 2022 May 4;23(5): e52412. doi: 10.15252/embr.202152412. Epub 2022 Apr 12. PMID: 35412705; PMCID: PMC9066069.

Siegel JM. *Sleep function: an evolutionary perspective.* *Lancet Neurol.* 2022 Oct;21(10):937-946. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00210-1. PMID: 36115365; PMCID: PMC9670796.

Takimoto M, Hamada A, Tomoda A, Ohdo S, Ohmura T, Sakato H, Kawatani J, Jodoi T, Nakagawa H, Terazono H, Koyanagi S, Higuchi S, Kimura M, Tukikawa H, Irie S, Saito H, Miike T. *Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Nov;289(5): R1273-9. doi: 10.1152/ajpregu.00126.2005. Epub 2005 Jun 16. PMID: 15961535.

Vasey, Clayton, Jennifer McBride, and Kayla Penta. *Circadian rhythm dysregulation and restoration: the role of melatonin.* *Nutrients* 13.10 (2021): 3480.

Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. *Overview of circadian rhythms.* *Alcohol Res Health.* 2001;25(2):85-93. PMID: 11584554; PMCID: PMC6707128.

Voinescu, Bogdan I. *Clock genes, chronotypes and diseases.* *Human and Veterinary Medicine* 1.1 (2009): 19-35.

Yurtsever T, Streit F, Foo JC, Trifonova S, Kumsta R, Muller CP, Turner JD, Meyer J, Schote AB. Temporal dynamics of cortisol-associated changes in mRNA expression of glucocorticoid responsive genes FKBP5, GILZ, SDPR, PER1, PER2 and PER3 in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Apr; 102:63-67. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.11.033. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30522007.