

# Epigenomica: un “nuovo codice” oltre la sequenza di basi

Martina Collotta

Candiolo Cancer Institute - FPO, IRCCS, Candiolo, Torino

Eccoci alla terza puntata del nostro viaggio nel mondo delle scienze “omiche”. In questo numero vedremo come oltre la sequenza di basi del DNA, esiste un “altro codice”, quello epigenetico, che è responsabile della regolazione dell’espressione dei geni e sta alla base dei fisiologici processi di differenziazione cellulare e di molte patologie multifattoriali, come quelle cardiovascolari. Daremo dunque uno sguardo ai meccanismi molecolari dell’epigenetica, per poter comprendere la patogenesi di alcune malattie e la diversa risposta ai farmaci, permettendo così al clinico di cogliere l’utilità delle scoperte della ricerca scientifica in questo campo.

## Un solo genoma, diverse cellule: epigenetica della differenziazione cellulare

Nelle precedenti “puntate” di questa rubrica abbiamo visto come l’ereditarietà dell’informazione genetica contenuta nel nostro DNA sia stata studiata a lungo nel corso degli ultimi 60 anni, fino al culmine del *Progetto Genoma Umano*. Frutto del progetto è stato non solo il sequenziamento e la mappatura dei geni umani, ma anche una prima iniziale comprensione del loro funzionamento a livello molecolare.

Sappiamo, infatti, che il genoma è condiviso da tutte le cellule di uno stesso organismo, ad esempio, di quello umano. È evidente, tuttavia, che esistono tipi cellulari molto diversi, generati da un processo di *differenziazione e specializzazione* necessario a far fronte alle funzioni superiori. Ma come può un determinato tipo cellulare, per esempio una cellula muscolare, “sapere” di essere diversa e dunque “comportarsi” diversamente da un altro tipo cellulare, per esempio un neurone, se tutte le cellule contengono il medesimo genoma?

Una parte della differenziazione cellulare viene controllata da *fattori di trascrizione*, proteine in grado di attivare la trascrizione di alcuni geni lasciando altri silenti, ma questo non spiega come la cellula possa “ricordare” di dover dare origine ad altre cellule unicamente dello stesso tipo quando

essa si riproduce: ciò che viene ereditato è il genoma, identico per tutte le cellule, non i fattori di trascrizione specifici! Sembra paradossale: un medesimo genoma, diversi “risultati”, ovvero diversi *fenotipi* corrispondenti a diversi tipi cellulari.

È la *regolazione dell’espressione genica* che permette tutto questo, e i meccanismi molecolari che intervengono a livello epigenetico ne sono i principali protagonisti. Dello studio di essi si occupa l’*epigenetica* che, per rispondere alla domanda precedente, è responsabile tra le altre cose, di meccanismi molecolari in grado di mantenere l’identità e la funzione cellulare specifica delle diverse linee cellulari dell’organismo.

L’estensione omica dell’epigenetica, è l’*epigenomica*, che guarda all’intero genoma dell’organismo o della cellula con le sue modificazioni a livello epigenetico.

## Epigenetica: una definizione difficile

Il termine *epigenetica* non è facilmente definibile, poiché viene riferito a una molteplicità di fenomeni biologici, generando una certa confusione.

Nel 1942 (pensiamo allora a quanto poco si sapesse dei geni!), il biologo Conrad Waddington, fu il primo a utilizzare il termine in riferimento ad una *“branca della biologia che studia le interazioni causali tra i geni e i loro prodotti, al fine di determinare*

*il fenotipo”*. Senza dubbio, agli occhi di un moderno biologo molecolare questa definizione appare quanto mai ampia!

Attualmente, infatti, la definizione di epigenetica più ampiamente condivisa è quella di *“studio dei cambiamenti della funzione genica che sono mitoticamente o meioticamente ereditabili e che non implicano un cambiamento della sequenza del DNA”*.

Vediamo ora di chiarirne il significato.

A prima vista questa definizione sembra contrastare tutto quanto sostenuto dai tradizionali principi della genetica che affermano che sono i *geni*, le sequenze di basi del DNA, a essere ereditati. Qui, invece, si dice che a essere ereditati sono i *cambiamenti della funzione genica*: i geni, cioè, rimangono gli stessi, ma si eredita (attraverso i processi di mitosi o meiosi) una loro diversa *espressione* e, dunque, *funzione*. I geni non espressi sono silenziati, sono non funzionali e hanno un assetto epigenetico diverso rispetto a quelli attivamente trascritti e, dunque, funzionali.

Da notare che, quando si parla di epigenetica, non possiamo parlare di *mutazione* quando riscontriamo una variazione rispetto ad un riferimento, ma di *alterazione*: le mutazioni, infatti, riguardano la sequenza di basi del DNA, mentre quando ci spostiamo nel campo dell’epigenetica dobbiamo parlare di alterazioni.

Anche quest’ultima definizione, tuttavia, è un *“work in progress”*: anche le sequenze

non codificanti del DNA, infatti, sono soggette a meccanismi di regolazione di tipo epigenetico, non solo i geni (sequenze di DNA codificanti proteine)!

## I marker epigenetici

Il termine epigenetica ci suggerisce qualcosa che è al di là del tradizionale studio della genetica, una sorta di controllo addizionale o esterno, che non origina direttamente dalla sequenza nucleotidica del DNA, e che permette la regolazione della funzione dei geni.

Tale controllo può essere ottenuto attraverso svariati meccanismi (Fig. 1) che, in linea generale, includono modificazioni semi-reversibili delle basi azotate o delle proteine con cui il DNA è associato nel nucleo cellulare.

## Principali meccanismi di regolazione epigenetica

### Metilazione del DNA

Consiste nell'aggiunta di un *gruppo metil-*

le al carbonio 5 della citosina a dare la *5-metilcitosina*, una base azotata modificata, che conserva la caratteristica di appaiarsi con la guanina, complementare alla citosina non metilata.

In generale, il significato della metilazione delle citosine dei promotori dei geni è quello di *silenziarli*, inibendo la trascrizione. Concordemente a questo, la metilazione del DNA è maggiormente presente nelle zone di cromatina condensata (*eterocromatina*), normalmente non trascritta.

### Modificazioni delle code istoniche

Gli *istoni*, proteine basiche che, in ottameri, costituiscono i *nucleosomi* attorno ai quali il DNA è avvolto, possiedono delle *code* che protrudono oltre la struttura globulare del nucleosoma.

Modificazioni come l'*acetilazione* e la *metilazione* delle code, in residui amminoacidici specifici di specifici istoni, hanno significato attivante o inibente la trascrizione, secondo un vero e proprio *codice istonico* che non è ancora del tutto compreso (Fig. 2).

## Modificazioni della struttura della cromatina

Nel nucleo delle cellule in interfase il DNA è assemblato insieme a proteine in *cromatina*, forma in cui gli acidi nucleici si trovano nelle cellule.

La cromatina può essere più o meno "compatta" e, dunque, rispettivamente meno o più accessibile ai fattori di trascrizione e agli enzimi necessari per trascrivere il DNA in RNA (Fig. 3).

I geni attivamente trascritti si trovano generalmente in zone di cromatina *aperta* (*euromatina*), con il DNA meno strettamente avvolto intorno alle proteine strutturali; i geni che devono restare silenti, invece, si trovano in zone di cromatina *chiusa*, più "compatta" (*eterocromatina*).

Proteine e sistemi molecolari specifici si occupano di modificare lo *stato della cromatina*, spostando, rimuovendo o aggiungendo i nucleosomi, le unità fondamentali della cromatina costituite da ottameri istonici e intorno a cui la molecola di DNA è avvolta.

### Altri meccanismi

Gli istoni esistono in diverse *isoforme*; la presenza di determinate isoforme correla con stati di attivazione della trascrizione e apertura della cromatina o, al contrario, con zone di cromatina chiusa trascrizionalmente silenti. Gli *RNA non codificanti*, come alcuni *long non-coding RNA*, possono associarsi alle zone di eterocromatina, come accade, ad esempio, in uno dei due cromosomi X che viene inattivato nelle femmine.

## L'importanza dell'epigenetica

La conoscenza dei meccanismi di controllo della funzione genica potrebbe sembrare unicamente di interesse dei biologi, un insieme di astrusi meccanismi molecolari senza effettive ricadute pratiche. Eppure, basta citare un argomento ben noto anche ai profani, per renderci conto del contrario: gli *effetti degli stili di vita sulla nostra salute*. Al clinico, ovviamente, questo interessa ancora di più!

Come è possibile che le nostre abitudini arrivino a influenzare il funzionamento dei nostri geni?

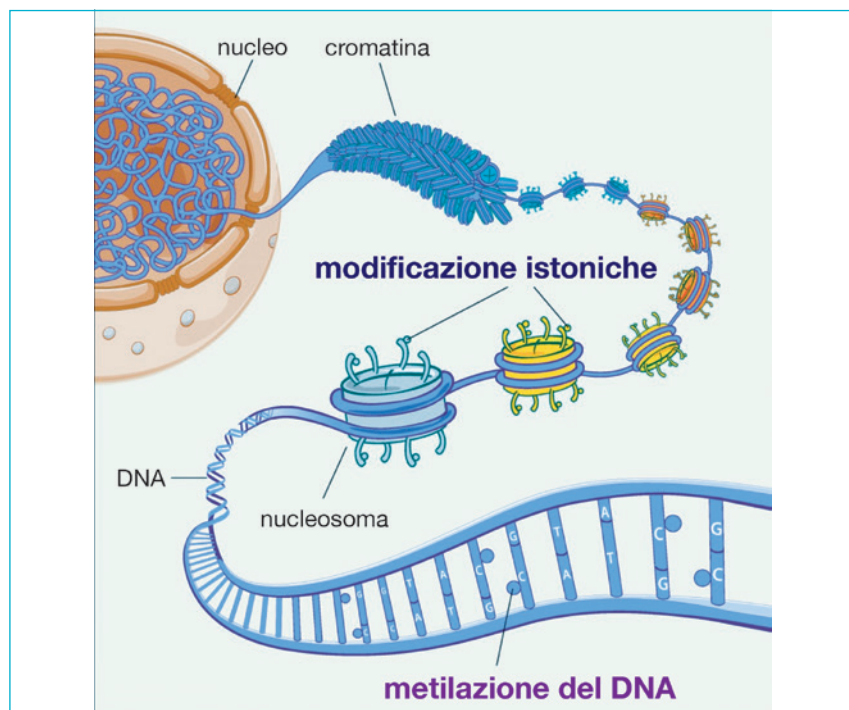
Citiamo un esempio storico.

Nel 1944 ci fu una carestia nei Paesi Bassi

## FIGURA 1.

*Meccanismi di regolazione epigenetica.*

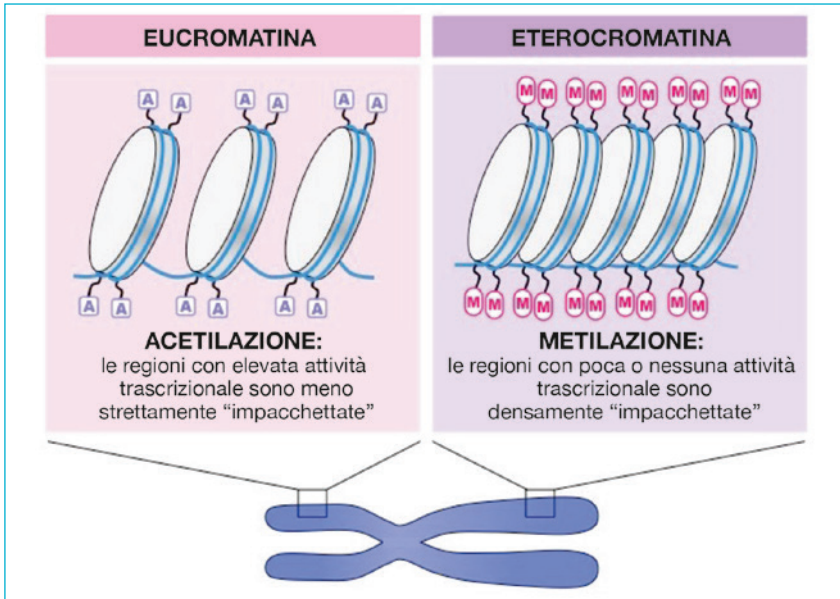
*Metilazione del DNA, modificazioni delle code istoniche e dello stato della cromatina, sono i principali meccanismi di regolazione dell'espressione genica che avvengono a livello epigenetico.*



**FIGURA 2.**

**Modificazioni istoniche e stati della cromatina.**

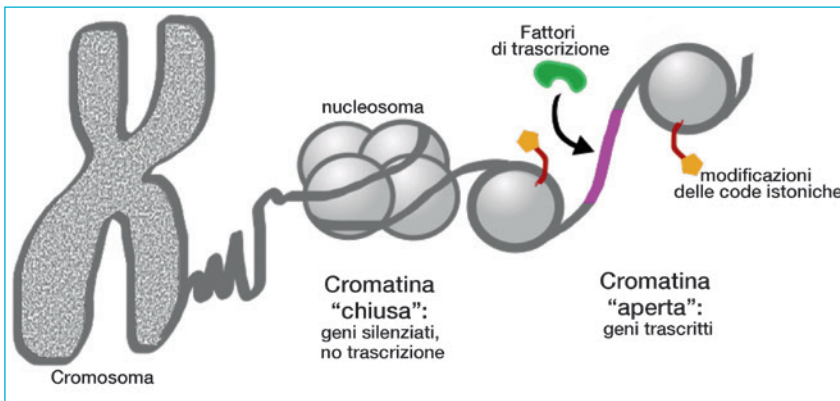
L'eucromatina, la cromatina aperta e attivamente trascritta, è associata ad acetilazione delle code istoniche, mentre la metilazione delle stesse è associata alla cromatina chiusa o eterocromatina, non trascritta. Questa è solo una regola generale, esistono infatti molte altre specifiche modificazioni di specifici residui amminoacidici delle code istoniche con significato di attivare o impedire la trascrizione. Questo ci permette di comprendere come tali modificazioni abbiano un impatto sia funzionale che strutturale sul DNA “impacchettato” nei cromosomi. Da notare nella figura la vicinanza o meno dei nucleosomi (rappresentati come cilindri intorno a cui è avvolto il DNA) che indica lo stato di apertura o chiusura della cromatina.



**FIGURA 3.**

**Accessibilità del DNA.**

La trascrizione di un gene può avvenire solo quando il DNA è “accessibile” ai fattori di trascrizione e agli enzimi come la RNA polimerasi. Le zone di cromatina “chiusa” non sono accessibili, il DNA è strettamente avvolto intorno agli istoni che formano i nucleosomi, la trascrizione non può iniziare. Nelle zone di cromatina “aperta”, il DNA è accessibile all'apparato trascrizionale perché avvolto più lassamente intorno al core istonico del nucleosoma, e i geni possono essere attivamente trascritti.



dovuta sia al gelido inverno sia al blocco dei rifornimenti di cibo da parte della Germania nazista. Il fatto storico, documentato, rivela che i figli di donne che erano state gravide

durante il periodo della carestia, mostravano una maggiore incidenza di patologie come il diabete, le malattie cardiovascolari, l'obesità e la schizofrenia. Più sorprenden-

temente, anche i nipoti di queste donne avevano una simile suscettibilità a tali malattie. Tutto questo sembra suggerire che la dieta della madre (e della nonna perfino!) possa influenzare la salute di diverse generazioni a seguire, suggerendo che il suo “adattamento” all'ambiente, scarso di cibo, abbia prodotto un tratto ereditabile.

Verrebbe spontaneo pensare che la malnutrizione materna, avesse danneggiato in qualche modo i geni del feto, causando mutazioni nel DNA in grado di dare i loro effetti solo più tardi nello sviluppo o nella vita adulta. In realtà, le evidenze più recenti, hanno rivelato una correlazione tra i *marker epigenetici* (in particolare la metilazione del DNA) legati al gene del fattore di crescita insulino-dipendente IGF2 e l'indice di massa corporea della madre, con ipometilazione di IGF2 presente nei figli delle madri malnutrite, fino a 60 anni dopo la loro nascita negli anni 1944-1945.

Vediamo ora un altro esempio.

Solo il 10% dei *tumori del seno* che mostrano una familiarità elevata sono riconducibili a mutazioni genetiche note: ci si aspetterebbe una percentuale molto più elevata nel caso del solo meccanismo di mutazione della sequenza nucleotidica! Nei ratti è stato dimostrato che la familiarità per tumore al seno, può essere causata anche dall'esposizione della madre gravida a una dieta ricca di grassi o a determinati agenti chimici (ad esempio l'etinilestradiolo); effetto che permane nella seconda e terza generazione.

Numerose sono le patologie che mostrano di avere una base epigenetica (vedi *Epigenetica e patologia*). Anche se non conosciamo con esattezza i meccanismi attraverso cui la dieta, l'esposizione ad agenti chimici o fattori non noti, possano alterare i meccanismi di regolazione epigenetici, è evidente che una loro migliore conoscenza permetterebbe di *prevenire* l'accumulo di cambiamenti dannosi e, di conseguenza, di *ridurre* il rischio di insorgenza di patologie, indipendentemente dalle esposizioni ambientali.

Non solo, ma il particolare pattern di modificazioni epigenetiche rilevato, potrebbe indirizzare verso una *terapia personalizzata*, influenzando la risposta a determinati farmaci (l'espressione della metiltransferasi MGMT, enzima responsabile della riparazio-

ne dei danni indotti al DNA da agenti alchilanti, in pazienti con glioma, è predittiva della risposta alla terapia con carmustina e temozolomide: se il promotore del gene codificante la MGMT è ipermetilato e il gene è conseguentemente ipoespresso, la capacità di riparare i danni indotti da alchilanti diminuisce, con conseguente sensibilità a questi chemioterapici).

## Epigenetica e patologia

### Malattie correlate all'imprinting

Per *imprinting genomico* si intende l'espressione monoallelica genitore-specifica che avviene per alcuni particolari geni dell'organismo umano. In generale, infatti, l'espressione genica è *biallelica* (allele materno e paterno sono entrambi espressi, ovvero i geni sono trascritti a partire da entrambi i cromosomi), tuttavia alcuni geni come l'IGF2 (*insulin-like growth factor*, fattore di crescita insulino-simile) sul cromosoma 15, hanno espressione uniparentale; nel caso dell'IGF2, paterna (imprinting paterno).

Il silenziamento genico che avviene nell'imprinting è solitamente mediato da *metilazione del DNA*.

L'importanza del fenomeno appare evidente quando si guarda alla patologia. Nel caso di una delezione del cromosoma 15 di origine paterno o di *disomia uniparentale* materna del medesimo cromosoma (duplice copia del cromosoma materno), si ha la sindrome di Prader Willi; nel caso di disomia uniparentale paterna si ha la sindrome di Angelman.

### Malattie cardiovascolari

Arteriosclerosi e ipertensione arteriosa sono solo due tra le patologie cardiovascolari che hanno un'etiologia dovuta almeno in parte a meccanismi di tipo epigenetico.

Come riferito nell'esempio storico della carestia olandese del 1944, i figli di madri che erano state gravide durante il tempo della carestia, mostrano ipometilazione di IGF2 e una maggiore incidenza di patologie cardiovascolari. Questo è stato provato attraverso esperimenti con ratti in regime ipoproteico: le generazioni nate da essi, mostrano variazioni nella metilazione di specifici geni correlati a patologie cardiovascolari, insulino-resistenza, ipertensione e obesità, oltre che in geni la cui normale

funzione è correlata al metabolismo dei lipidi e degli acidi grassi nel fegato.

L'inappropriata proliferazione delle cellule muscolari lisce della placca arteriosclerotica, è correlata a ipermetilazione del promotore del gene del *recettore degli estrogeni di tipo  $\alpha$* .

Interessante sottolineare come *omocisteina*, *acido folico*, *vitamine B12 e B6*, fattori i cui livelli alterati predispongono all'insorgenza di aterosclerosi, siano tutti più o meno strettamente coinvolti con il metabolismo del monicarbonio attraverso cui avviene la metilazione del DNA e delle proteine.

### Diabete

In modelli animali di retinopatia diabetica sono state rilevate modificazioni epigenetiche del *fattore nucleare KB* (NFKB), notoriamente coinvolto nei processi di infiammazione anche vascolare.

Modificazioni epigenetiche del locus *Pdx1* (codificante il fattore di trascrizione essenziale delle cellule beta pancreatiche), come alterazioni nell'acetilazione e nella metilazione degli istoni, sono state associate a diabete di tipo II.

### Malattie renali

Così come per i pazienti con malattie cardiovascolari, anche i pazienti con malattia renale cronica o *end-stage*, presentano elevati livelli di *S-adenosilomocisteina* che, come abbiamo detto, è coinvolta nei processi biochimici di metilazione.

La microangiopatia renale è in parte dovuta ad alterazioni della regolazione epigenetica di alcune sub-unità dell'enzima *NADPH ossidasi*.

### Malattie neurodegenerative

A partire dalle osservazioni che modificazioni epigenetiche sono fisiologicamente coinvolte in *memoria e apprendimento*, sono stati condotti studi in modelli animali di *decadimento cognitivo* legato all'età e in pazienti con *Alzheimer*.

Nei primi sono state rilevate variazioni nei pattern di acetilazione degli istoni nei neuroni dell'ippocampo, nei secondi è stata constatata una ridotta metilazione del promotore dell'APP (*amyloid precursor protein*) con conseguente aumento della trascrizione, all'origine dell'aumento eccessivo e dell'accumulo della proteina, noto fattore

patogenetico della malattia di Alzheimer; lo stesso accade nel promotore del gene codificante per la *Tau*, anch'essa proteina coinvolta nella formazione degli aggregati di neurofibrille con ruolo patogenetico.

Nel *Parkinson* avviene una simile ipometilazione del promotore del gene dell' *$\alpha$ -sinucleina* che, a sua volta, implica una alterazione dell'acetilazione degli istoni; il trattamento con levodopa, ripristina il normale pattern di acetilazione istonica.

### Malattie psichiatriche

In soggetti affetti da *disturbo bipolare*, alcuni studi ipotizzano un'etiologia simile a quella delle malattie legate ad un alterato imprinting, data la trasmissione prevalentemente in linea materna; negli stessi soggetti il trattamento con *valproato* induce modificazioni epigenetiche responsabili del miglioramento del quadro clinico.

In pazienti con *depressione maggiore*, particolarmente se con storia di abusi nell'infanzia, mostrano un'alterazione del funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisario con conseguente innalzamento dei livelli di cortisolo, che sembra essere originato dalla deregolazione dell'asse a livello dei meccanismi di controllo epigenetici, indotti dallo stress.

### Cancro

L'ipermetilazione dei promotori dei *geni oncosoppressori* con conseguente inibizione della loro trascrizione o l'ipometilazione dei promotori degli *oncogeni* con aumentata trascrizione, sono solo due tra i possibili meccanismi di tumorigenesi legata a modificazioni epigenetiche.

L'esempio più noto è quello delle *patologie oncoematologiche*: ad esempio la risposta alla terapia con azacitidina o decitabina nella cura delle sindromi mielodisplastiche o leucemiche, dipende dall'inibizione degli enzimi di metilazione indotta da questi chemioterapici, poiché il 95% dei pazienti presenta un quadro di ipermetilazione del DNA.

### Bibliografia di riferimento

- Armstrong L. *Epigenetics*. Garland Science 2014.  
 Hesman Saey T. *From great grandma to you*. Science News 2013.  
 Hackett JA. *Beyond DNA: programming and inheritance of parental methylomes*. Cell 2013.  
 Thayer ZM. *Biological memories of past environments: epigenetic pathways to health disparities*. Epigenetics 2011.

# La professione di genere

a cura di Martina Musto, Gabriella Pesolillo, Antonio Votino

Società Italiana di Medicina Generale e delle Cure Primarie, SIMG

Le donne medico rappresentano una quota significativa all'interno del Sistema Sanitario e con il passare del tempo il loro numero è destinato a crescere. Tra le generazioni più giovani la percentuale femminile è costantemente superiore a quella maschile; nonostante una lieve flessione delle nuove iscritte (dati ENPAM), la percentuale di "camici rosa" è da tempo attorno al 60 per cento. A che si deve questo sorpasso? A una migliore attitudine tra i banchi di scuola? O al fatto che la professione medica, un tempo appannaggio del sesso maschile, abbia perso il suo antico prestigio, perdendo attrattiva tra gli uomini che hanno quindi sgomberato il campo lasciandolo libero alla "occupazione" femminile? In effetti alcuni ambiti della professione risultano ancora, se non preclusi, quantomeno ostici e poco accoglienti nei confronti delle donne, pensiamo al difficile accesso a ruoli dirigenziali.

È opinione comune che, per le donne, carriera e famiglia siano due mondi raramente conciliabili e che il prezzo di questa scelta ricada sempre unicamente su di loro, sia questo prezzo la rinuncia ad essere madri o, di contro, la rinuncia all'autonomia economica e alla soddisfazione professionale o, infine, la rinuncia a qualsiasi spazio personale in quei casi in cui in qualche modo riescano a barcamenarsi tra lavoro e famiglia.

La realtà è che in un contesto professionale modellato sulla dominanza maschile, anche a livello organizzativo, nessuno è disposto a condividere una parte di questo peso, cosicché la quotidianità di una donna medico è caratterizzata dalla costante ricerca di equilibrio tra attività lavorativa e carichi familiari, aspettative personali e collettive, progetti e doveri.

Per le colleghe che operano nelle Cure Primarie la condizione è, se vogliamo, ancora più complessa. Soprassediamo sulla scarsa tutela della maternità (sia per le giovani colleghe in formazione che su quelle già in convenzione), mentre è d'obbligo denunciare le condizioni di assenza di sicurezza in cui operano molte colleghe di continuità assistenziale (e che prezzo stanno pagando le vittime dei numerosi casi di violenza, anche recente?). Anche in ambulatorio sono costrette a faticare di più per superare i pregiudizi dei pazienti (e ahimè persino delle pazienti!), non sempre disposti a dare subito fiducia a un medico donna, soprattutto se giovane.

Eppure le donne dovrebbero essere considerate un valore aggiunto per il futuro della nostra categoria, rappresentano il grosso delle nuove generazioni, sono le nuove risorse intellettuali, le intelligenze più fresche a disposizione del sistema. Tradizionalmente gli viene riconosciuto

un approccio più emotivo nel lavoro, una maggiore empatia ed una naturale propensione all'ascolto ed alla sfera relazionale. La loro validità però non è legata solo a queste caratteristiche intrinseche, il motivo principale resta la bravura. Uno studio osservazionale realizzato all'*Harvard Medical School* di Boston e pubblicato sul *Journal of American Medical Association* nel dicembre 2016 dimostrò che i pazienti presi in carico da donne medico sono curati meglio. Ragione di questo maggiore successo clinico: un più assiduo utilizzo delle evidenze scientifiche, un'adesione più scrupolosa alle linee guida, la prescrizione di più interventi preventivi ed una formazione più recente.

Una competizione fra uomini e donne non ha nessuna utilità ai fini di una crescita professionale e del miglioramento dei processi di cura, neppure evidenziarne le differenze, che non sono attribuibili al solo genere. Molto più utile l'integrazione, la collaborazione, la messa in comune dei diversi punti di vista. In fondo anche quelle caratteristiche che possono sembrare innate possono essere apprese e usate dagli uomini, lo hanno dimostrato le donne con l'ingresso in occupazioni un tempo prerogativa maschile.