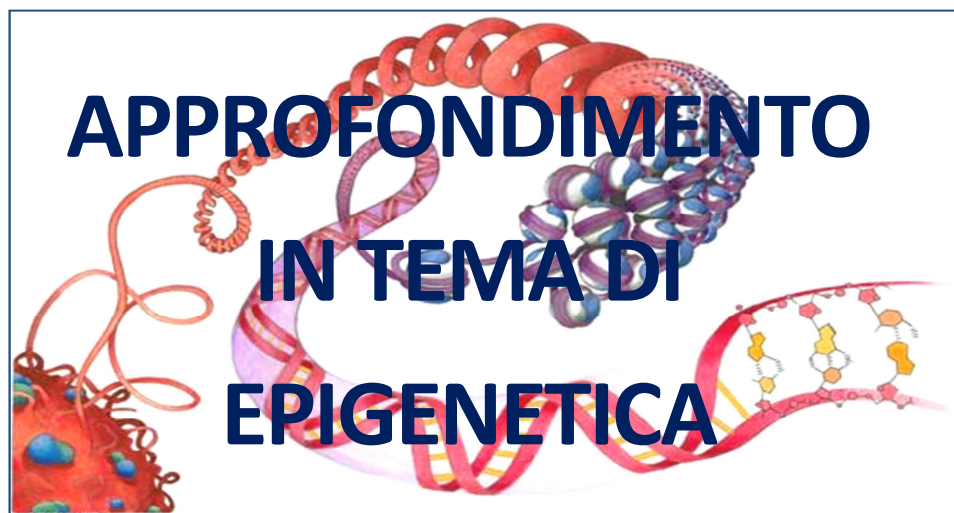


**INAIL**

## **“Biotecnologie: Ricerca e Produzioni Industriali”**



*Immagine grafica di Nicolas Bouvier*

**Corso di formazione per gli studenti del IV e V anno**

**Roma, 14 Marzo 2013**

Atti del Corso a cura della Dott.ssa Elena Sturchio.

*Progetto CCM 2011 finanziato dal Ministero della Salute: Promozione della sicurezza  
nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati.*

Pubblicazione realizzata da

## **INAIL**

Settore Ricerca Certificazione e Verifica, Dipartimento installazioni di produzione ed Insedimenti antropici

## **COORDINAMENTO SCIENTIFICO**

Elena Sturchio

## **AUTORI**

Elena Sturchio<sup>1</sup>, Priscilla Boccia<sup>1</sup>, Claudia Meconi<sup>1</sup>, Miriam Zanellato<sup>1</sup>, Silvia Gioiosa<sup>2</sup>.

## **CON LA COLLABORAZIONE DI**

Patrizia Di Stefano<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica, Dipartimento installazioni di produzione ed Insedimenti antropici (DIPIA).

<sup>2</sup> Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

<sup>3</sup> INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica, Dipartimento Certificazione e Conformità di Prodotti ed Impianti (DCC).

## **PER INFORMAZIONI**

INAIL, Dipartimento installazioni di produzione ed Insedimenti antropici

Via Alessandria, 220/E

00198 Roma

Tel +39 06 97892614 - +39 06 97892661

[e.struchio@inail.it](mailto:e.struchio@inail.it)

[www.inail.it](http://www.inail.it)

## INTRODUZIONE

### ***Dott.ssa Elena Sturchio***

Referente Scientifico del Progetto CCM

Nell'ambito delle attività relative al Progetto CCM 2011 finanziato dal Ministero della Salute dal titolo "Promozione della Sicurezza nei laboratori che fanno uso di Microrganismi Geneticamente Modificati" è stato realizzato un Corso sulle Biotecnologie per gli studenti degli Istituti di Istruzione Secondaria Superiore, al fine di realizzare una corretta politica di comunicazione dei risultati scientifici raggiunti nel settore. Il corso nasce infatti dall'esigenza di valorizzare e incentivare il notevole sforzo svolto dall'Europa ed anche dall'Italia, nel settore biotech. Le applicazioni in campo biomedico rappresentano l'ambito nel quale le biotecnologie hanno dato finora il contributo più significativo, sia in termini di prodotti (terapeutici, vaccini e diagnostici), sia nell'ambito della ricerca e dello sviluppo. Inoltre le aziende che utilizzano il biotech in campo agroalimentare e industriale sono in crescita, a conferma delle ampie potenzialità applicative di queste tecnologie.

Nel nostro paese le biotecnologie, in particolare quelle applicate all'agricoltura, sono da sempre oggetto di un acceso dibattito tra opinione pubblica, mondo della ricerca e istituzioni, spesso non basato su evidenze scientifiche ma su argomentazioni esclusivamente ideologiche ed emozionali prive di verifiche sperimentali. Poiché, per esprimere un'opinione e fare scelte consapevoli occorrono una corretta informazione e opportuni strumenti cognitivi, obiettivo del Corso è stato quello di fornire una panoramica sui diversi aspetti riguardanti le biotecnologie utile ai docenti ad elaborare una corretta visione sull'argomento.

Il progetto nasce dall'esperienza di un gruppo di ricercatori INAIL, che in collaborazione con diverse istituzioni governative, ha realizzato una serie di attività incentrate sulla divulgazione e sulla cultura della sicurezza, con particolare riguardo ai giovani che si affacciano al mondo del lavoro.

Queste attività sono maturate nel DIPIA in piena aderenza alle politiche INAIL di prevenzione e divulgazione, nella particolare e attuale prospettiva di avvicinamento dei giovani al mondo della Ricerca, finalizzate all'acquisizione di competenze e alla maturazione di sensibilità culturale sulla sicurezza, grazie a un rapporto diretto con i tecnici e gli esperti del settore e alla proposta di contenuti specialistici, attraverso un linguaggio comprensibile, esauriente e completo, che si avvalga di moderne strategie di divulgazione.



# “Biotecnologie: Ricerca e Produzioni Industriali”

*Roma, 14 Marzo 2013*

## PROGRAMMA DEL CORSO

- 9.30**    **Introduzione al concetto di biotecnologie (mediche, ambientali, agroalimentari)**  
*Dott.ssa Elena Sturchio INAIL, Direttore del Corso*
- 10.00**   **Aggiornamenti in tema di Biotecnologie (Epigenetica e microRNA).**  
*Dott.ssa Miriam Zanellato*
- 10.30**   **Pausa**
- 10.45**   **Prevenzione e sicurezza a partire dall'impiego delle biotecnologie nei laboratori (MOGM) fino alle sue applicazioni cliniche (vaccini).**  
*Dott.ssa Barbara Ficociello*
- 11.15**   **OGM e rilascio deliberato nell'ambiente.**  
*Dott.ssa Laura Nicolini*
- 11.45**   **Pausa**
- 12.00**   **L'agricoltura sostenibile, possibile alternativa all'agricoltura convenzionale e alle agrobiotecnologie**  
*Dott.ssa Laura Casorri*
- Test finale e questionario di gradimento.**
- Consegna degli attestati agli studenti.**



## RELATORI

### **Elena Sturchio**

*INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica (DIPIA)*

*Via Alessandria 220/E, 00198 Roma.*

[e.sturchio@inail.it](mailto:e.sturchio@inail.it)

### **Barbara Ficociello**

*INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica (DIPIA)*

*Via Alessandria 220/E, 00198 Roma.*

[b.ficociello@inail.it](mailto:b.ficociello@inail.it)

### **Miriam Zanellato**

*INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica (DIPIA)*

*Via Alessandria 220/E, 00198 Roma.*

[m.zanellato@inail.it](mailto:m.zanellato@inail.it)

### **Laura Nicolini**

*ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'*

*Direttore Settore Biologico*

*Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.*

[laura.nicolini@iss.it](mailto:laura.nicolini@iss.it)

### **Laura Casorri**

*INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica (DIPIA)*

*Via Alessandria 220/E, 00198 Roma.*

[l.casorri@inail.it](mailto:l.casorri@inail.it)

#### **DIRETTORE DEL CORSO**

**Elena Sturchio**, INAIL – Settore Ricerca, Certificazione e Verifica, DIPIA

#### **SEGRETERIA SCIENTIFICA**

**Elena Sturchio**, INAIL– Settore Ricerca, Certificazione e Verifica, DIPIA

**Claudia Meconi**, INAIL – Settore Ricerca, Certificazione e Verifica, DIPIA

**Priscilla Boccia**, INAIL – Settore Ricerca, Certificazione e Verifica, DIPIA

#### **SEGRETERIA ORGANIZZATIVA**

**Pier Francesco Benvenuto**, INAIL, Direttore Ufficio Amm.vo Gestionale DPO

**Chiara Varese**, INAIL, Unità Amministrativa-Gestionale DPO

**Patrizia Di Stefano**, INAIL, Settore Ricerca, Certificazione e Verifica, DCC



## **CLASSI CHE HANNO PARTECIPATO AL CORSO**

*IIIAC - settore Industria del Nuovo Ordinamento*

*IVAC - indirizzo chimico-biologico*

*VIBC - indirizzo chimico-biologico*

*VAC - indirizzo chimico-biologico*

*VBC - indirizzo chimico-biologico.*

## **DOCENTI**

**Patrizia Belloni**

**Ascensina Evangelista**

**Andrea Mercuri**

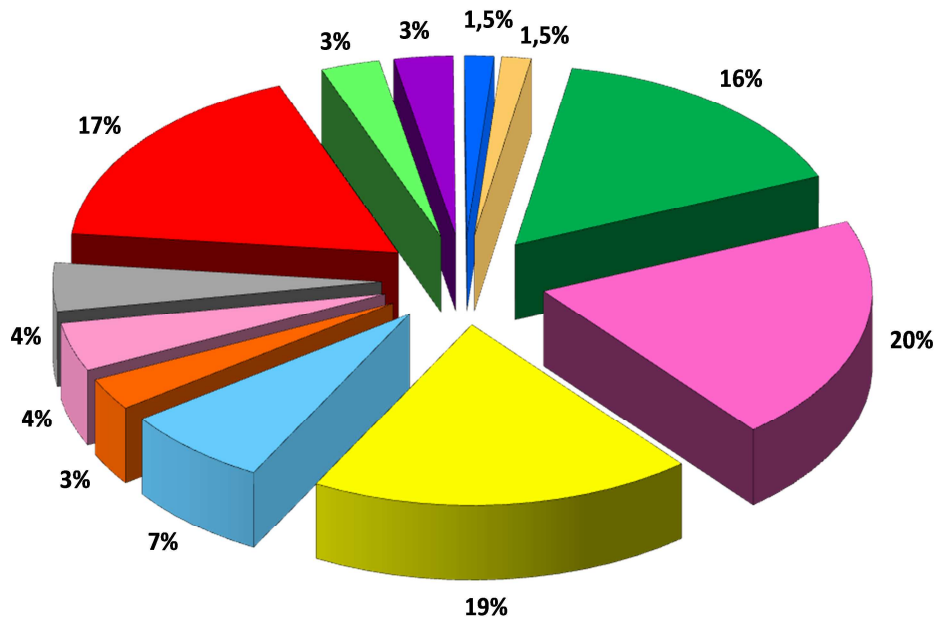
**Alberto Russo**

**Stefania Stabile**

**Istituto di Istruzione Superiore “ARMANDO DIAZ” – ROMA**



## QUESTIONARIO DI GRADIMENTO



- Approfondimento sulla tematica OGM
- Approfondimento sull'Epigenetica
- Nessun suggerimento
- Durata del corso più breve
- Miglioramento di alcuni aspetti trattati
- Miglioramento dell'aspetto grafico
- Noioso
- Piena soddisfazione
- Approfondimento sul DNA
- Approfondimento Vaccini e sistema immunitario
- Approfondimento tecniche alternative alla sperimentazione sugli animali
- Utilizzo di video durante la spiegazione



*L'epigenetica ha suscitato particolare interesse negli studenti in occasione del Corso "Biotecnologie: Ricerca e Produzioni Industriali", come si evince dal questionario di gradimento. Pertanto è stato realizzato un approfondimento sull'epigenetica dai contenuti specialistici e con un linguaggio comprensibile ai ragazzi. Nel testo sono stati inseriti specifici riferimenti a siti web sulla tematica dell'epigenetica quali utili e moderni strumenti di didattica multimediale on-line per i docenti.*

## **Approfondimento in tema di Epigenetica**



## EPIGENETICA

Dott.ssa Priscilla Boccia<sup>1</sup>

Dott.ssa Claudia Meconi<sup>1</sup>

Dott.ssa Miriam Zanellato<sup>1</sup>

Dott.ssa Silvia Gioiosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INAIL - Settore Ricerca Certificazione e Verifica, DIPIA, Via Alessandria 220/E, 00198 Roma.

<sup>2</sup> Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

### **Introduzione: Che cos'è l'Epigenetica?**

Nel nostro corpo esistono centinaia di tipi di cellule, con caratteristiche e funzioni anche molto diverse tra di loro. Basti pensare, ad esempio, alla differenza che intercorre tra un neurone ed una cellula epatica. Eppure ogni cellula discende dal medesimo stato iniziale. Come può accadere ciò? Cosa, al procedere della divisione cellulare, definisce il destino delle singole cellule?

La spiegazione risiede nel comportamento dei geni che può cambiare radicalmente da una generazione all'altra senza che si verifichino alterazioni della sequenza del DNA, ma che invece è dovuto a processi di regolazione dell'espressione genica, come ad esempio attivazione o silenziamento selettivo dei geni stessi.

In questo fenomeno un ruolo chiave lo hanno i **fattori epigenetici**. Proprio come un direttore d'orchestra decide la dinamica dell'esecuzione di una sinfonia, i fattori epigenetici regolano l'interpretazione del DNA all'interno di ciascuna cellula vivente. La mappa genetica, al pari di una complessa partitura musicale, rimane senza vita in mancanza di un'orchestra di cellule (gli orchestrali) e di epigenotipi (gli strumenti) in grado di renderla manifesta.

Ma cos'è l'**epigenetica**?

Il termine *epigenetica* risale al 1942 quando Conrad Waddington lo coniava per designare "*la branca della biologia che studia le interazioni causali fra i geni e il loro prodotto cellulare e pone in essere il fenotipo*" (Waddington, 1942). Oggi, per epigenetica si intende **lo studio delle modifiche genetiche stabili che danno luogo a cambiamenti nella funzione e nell'espressione genica senza un'alterazione nella sequenza del DNA corrispondente**(<http://nihroadmap.nih.gov/roadmap15update.asp>; Aguilera et al. 2010).

In pratica si tratta di quei fenomeni in cui il fenotipo è determinato non tanto dal genotipo in sé, quanto dalla sovrapposizione al genotipo stesso di "un'impronta" che

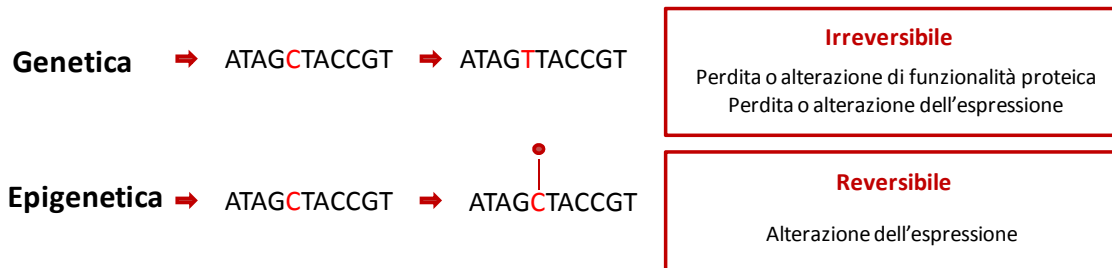
ne influenza il comportamento funzionale. Questa impronta è detta segnale epigenetico, ovvero un qualsiasi cambiamento che sia in grado di alterare l'attività di un gene ma non la sequenza nucleotidica.

Per chiarire il concetto, può essere utile leggere cosa scriveva a riguardo Thomas Jenuwein, direttore dell'istituto di Immunobiologia ed Epigenetica "Max Planck" (Freiburg, Germania): *"La differenza tra genetica ed epigenetica può essere paragonata alla differenza che passa fra leggere e scrivere un libro. Una volta scritto il libro, il testo (i geni o le informazioni memorizzate nel DNA) sarà identico in tutte le copie distribuite al pubblico. Ogni lettore potrà tuttavia interpretare la trama in modo leggermente diverso, provare emozioni diverse e attendersi sviluppi diversi man mano che affronta i vari capitoli. Analogamente l'epigenetica permette interpretazioni diverse di un modello fisso (il libro o il codice genetico) e può dare luogo a diverse letture, a seconda delle condizioni variabili con cui il modello viene interrogato"*.

Una metafora sfolgorante, pur nella sua semplicità. L'ermeneutica del codice genetico risiederebbe, pertanto, nell'epigenetica.

## Basi molecolari e meccanismi epigenetici

I segnali epigenetici determinano cambiamenti nell'espressione genica senza modificazioni della sequenza nucleotidica del genoma.



Si tratta di processi dinamici in grado di rispondere ai segnali estrinseci sia di natura ambientale (esposizione a xenobiotici) che sociale (es. abitudini alimentari, stili di vita), nonché a quelli intrinseci dell'organismo. Tali segnali consistono in modificazioni chimiche ereditabili mitoticamente e meioticamente, ma anche in alterazioni stabili ma non necessariamente ereditarie (Ficociello et al , 2010).

I meccanismi più rilevanti che provocano effetti epigenetici attraverso l'attivazione o la disattivazione dei geni consistono in:

- Rimodellamento della cromatina dovuta sia a processi di metilazione del DNA che a modificazione degli istoni
- Silenziamento genico dovuto all'alterazione del pathway dei piccoli RNA non codificanti (microRNA)

Questi processi alterano l'accessibilità fisica alle regioni del genoma sulle quali si legano proteine e enzimi deputati all'espressione genica e quindi alterano l'espressione del gene.

### Rimodellamento della cromatina

La cromatina può assumere due diverse conformazioni. Quando essa è rilassata significa che è predisposta all'attività trascrizionale, mentre quando è condensata risulta disattivata temporaneamente o permanentemente. Questo *status* conformazionale dipende da vari fattori, tra cui anche la presenza di marcature epigenetiche ovvero "impronte chimiche" attaccate agli istoni oppure al DNA. Queste impronte indicano se i geni corrispondenti devono essere trascritti e quanto la cromatina dovrebbe essere addensata. (Figura 1) Un singolo gene potrebbe essere più o meno attivo in base alle marcature della cromatina (Il codice epigenetico della mente di Eric J.Nestler. [www.lescienze.it](http://www.lescienze.it)).

Le modifiche epigenetiche sono realizzate da una serie di enzimi, alcuni dei quali aggiungono le “impronte” ed altri le rimuovono.

Condizioni fisiologiche o patologiche e l'ambiente possono influenzare l'attività dei geni regolando il comportamento degli enzimi e di conseguenza la marcatura e la ristrutturazione della cromatina. Talvolta le marcature durano per poco tempo, magari per consentire alla cellula di rispondere rapidamente a una stimolazione intensa. Il più delle volte le “impronte” rimangono attaccate per mesi o per anni, o addirittura per tutta la vita dell'organismo.

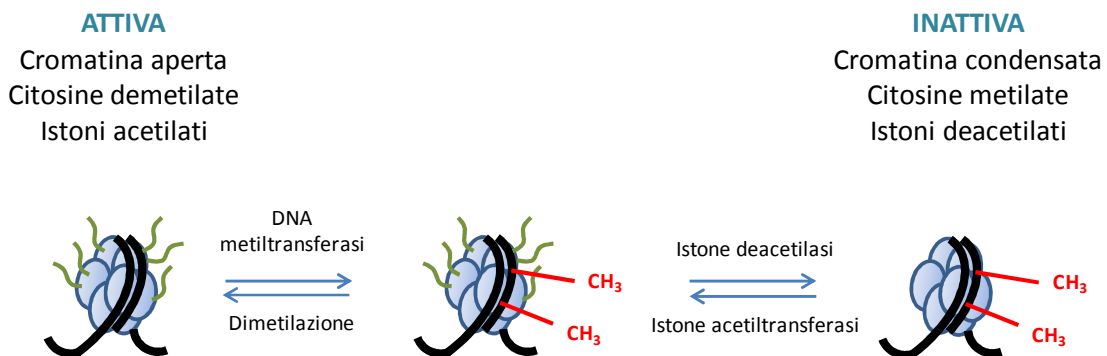
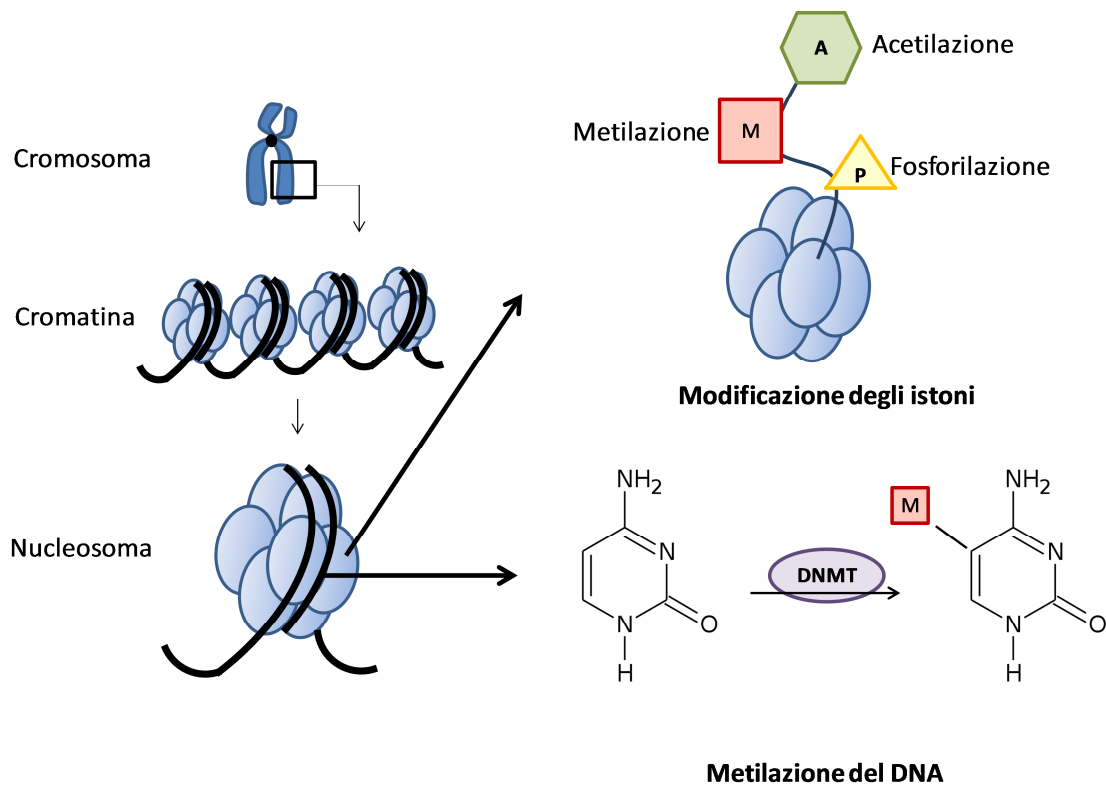


Figura 1. Il rimodellamento della cromatina.

### *Metilazione*

La metilazione del DNA è il più frequente meccanismo epigenetico e si verifica quasi esclusivamente attraverso il legame di un gruppo metile in posizione 5 dell'anello della citosina presente in sequenze nucleotidiche CpG del DNA, ad opera della famiglia di enzimi DNA metiltransferasi.

La metilazione del DNA sembra essere determinata da almeno tre DNA metiltransferasi (DNMT), DNMT1, DNMT3a, e DNMT3B, che catalizzano il trasferimento di un gruppo metilico dall' S-adenosil-L-metionina alla citosina del DNA, e che sono limitate a sequenze simmetriche CG nei mammiferi.

La metiltransferasi DNMT1 è la più abbondante rinvenuta nelle cellule somatiche ed è responsabile per il mantenimento della metilazione del DNA. Le altre due metiltransferasi DNMT3a e DNMT3B sono fondamentali nello sviluppo embrionale nei mammiferi e sono indispensabili per le metilazioni che avvengono "de novo" durante l'impianto embrionale. Tutti e tre gli enzimi non soltanto cooperano, ma possono partecipare nelle funzioni di formazione e di mantenimento della metilazione.

La 5-metil-citosina rappresenta il 2-5% di tutte le citosine presenti nei genomi dei mammiferi e si trova principalmente nelle sequenze di nucleotidiche CpG del DNA (Millar et al., 2003; Lister et al., 2009; Rossella et al., 2009).

La struttura cromatinica è correlata con lo stato di metilazione del DNA. Le regioni attive, dove i geni sono espressi, sono associate con l'ipometilazione delle regioni CpG, essendo queste regioni target dei fattori di trascrizione. Di contro, l'ipermetilazione comporta da una parte un'interferenza diretta sui residui metilici nelle regioni di legame dei fattori di trascrizione, e dall'altra parte la formazione di una configurazione "chiusa" della cromatina associata all'inattività genica (Jones PA, 2002; Ehrlich M, 2002; Casati L, 2010).

### *Modificazioni degli istoni*

Un altro meccanismo epigenetico ben studiato e più complesso è la modificazione degli istoni.

Il DNA nucleare è costituito da cromatina organizzata in nucleosomi formati da un *core* costituito da 8 proteine basiche detti istoni (due per ogni istone H2A, H2B, H3 e H4), intorno al quale si avvolge la doppia elica del DNA. Due nucleosomi sono intervallati dal DNA *linker* che interagisce con l'istone H1 per produrre un maggior compattamento cromatinico.

Gli istoni, oltre ad avere la funzione di assemblare il DNA e conferire la struttura alla cromatina, hanno il compito specifico di modulare l'accesso fisico dei fattori nucleari al DNA. L'associazione dell'ottamero istonico con il DNA è dinamica per permettere l'accesso al DNA ad altre proteine che devono mediare la regolazione della trascrizione ed è modulata da grossi complessi proteici di rimodellamento nucleosomico.

Inoltre le code N-terminali istoniche che sporgono dal nucleosoma possono subire una serie di modificazioni attraverso meccanismi di metilazione, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione che possono verificarsi su almeno 30 siti per ciascun nucleo soma. Ciò evidenzia la forte attività di modulazione che può essere prodotta dalle molteplici possibili combinazioni di modifiche che possono avvenire su una varietà di siti presenti negli istoni. L'acetilazione e la fosforilazione sono reversibili e dinamiche e determinano una riduzione delle cariche positive delle code istoniche; generalmente l'acetilazione degli istoni è associata all'attivazione trascrizionale, mentre i nucleosomi deacetilati sono caratteristici della cromatina condensata e trascrizionalmente inattiva.

La metilazione è una modificazione più stabile ed è coinvolta nel mantenimento a lungo termine dello stato di espressione. L'effetto della metilazione dipende dal tipo di istoni e dalla posizione della lisina nella code, anche se principalmente questa modificazione causa un blocco trascrizionale nelle regioni di eterocromatina.

In risposta ai segnali ambientali ed altro, i fattori di trascrizione specifici e i repressori trascrizionali reclutano gli enzimi che modificano gli istoni ai geni specifici e definiscono il profilo gene-specifico di modificazione degli istoni.

I processi di modificazione degli istoni e la metilazione del DNA sono interdipendenti e agiscono in modo combinato per modulare l'accessibilità al DNA attraverso l'alterazione della conformazione cromatinica, con conseguente esposizione dei siti di legame per i fattori di trascrizione che giocano un ruolo regolatore diretto nell'espressione genica (Casati et al 2010).

### **MicroRNA**

Oltre ai processi di rimodellamento della cromatina, esistono altri meccanismi che entrano in gioco nella modulazione dell'epigenoma. Si tratta dell'azione dei microRNA (miRNA), piccole molecole di RNA non codificanti (circa 20-30 nucleotidi) che sono in grado di regolare i livelli di espressione genica a livello post-trascrizionale.

I microRNA sono presenti in tutti gli eucarioti superiori e in alcune specie di lievito. Alcuni miRNA vengono codificati da specifici loci genici, mentre altri sono contenuti all'interno di regioni introniche di geni che codificano proteine.

Sono espressi nel nucleo in forma di precursori più lunghi detti pri-miRNAs che vengono successivamente processati da un'endo-ribonucleasi di tipo III detta Drosha in frammenti di 70-100 nucleotidi detti pre-miRNA. (Figura 2)

A loro volta, i pre-miRNA, vengono esportati nel citoplasma e maturati in miRNA da parte di un'altra RNasi di tipo III nota come Dicer. Un singolo filamento di questi miRNA viene poi caricato nel complesso di silenziamento RNA-indotto (RISC), insieme ad una o più proteine Argonauta (Ago), ed indirizzato sul suo bersaglio col quale si lega

per complementarità delle basi, garantendo in tal modo un'estrema specificità di azione.

A questo punto i miRNA possono regolare l'espressione genica in diversi modi (Sturchio et al. 2008):

- la degradazione dell'mRNA bersaglio nota anche come RNA interference o iRNA,
- il blocco della traduzione dell'mRNA bersaglio,
- l'inibizione della trascrizione

La scelta tra inibizione della traduzione e degradazione del trascritto bersaglio dipende dal livello di complementarità di sequenza tra il miRNA e mRNA; nel caso in cui ci sia un perfetto appaiamento avviene il taglio dell'mRNA mediato dallo stesso pathway dell'RNA interference (Bartel, 2004).

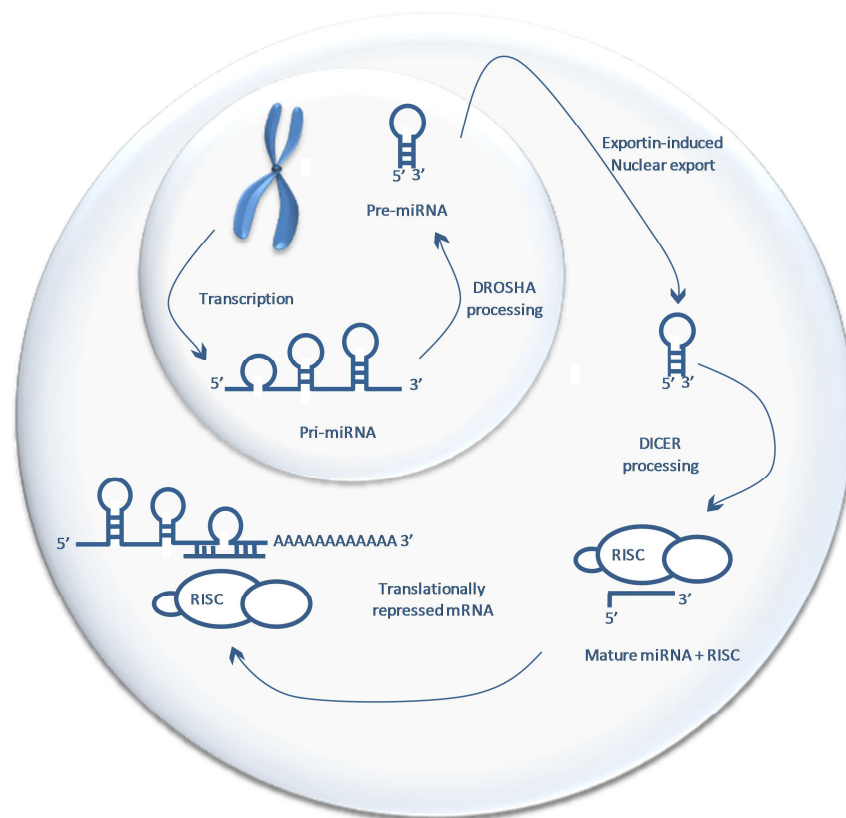


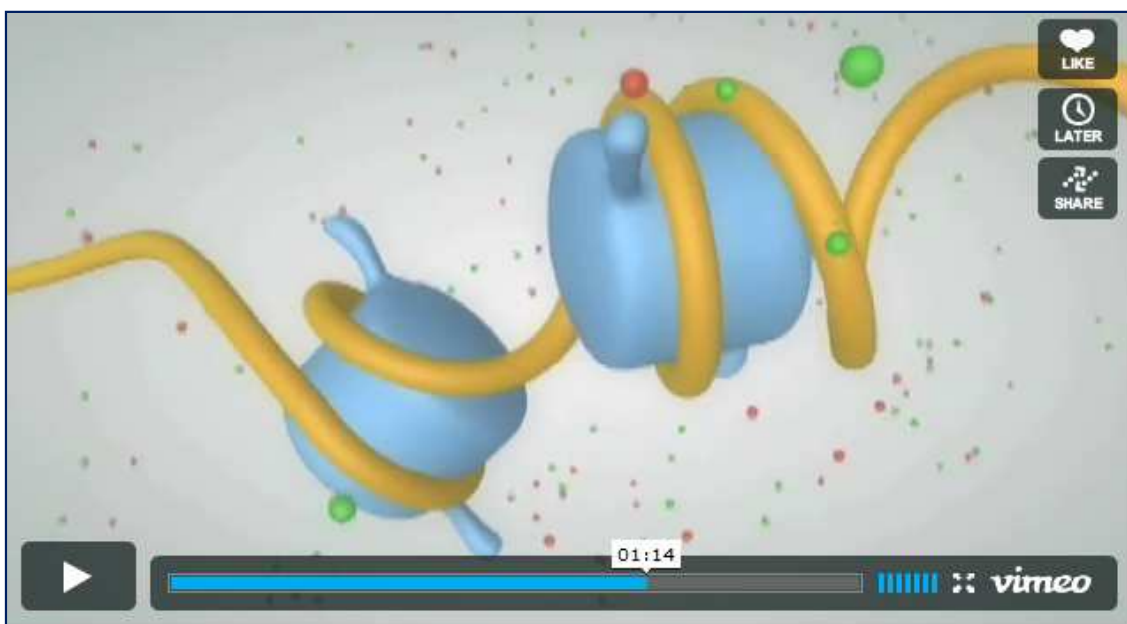
Figura 2. Biogenesi e processamento dei microRNA.

Se le due molecole non sono esattamente complementari si ha l'inibizione reversibile della traduzione. Generalmente un miRNA inibisce la traduzione di più geni e ogni gene

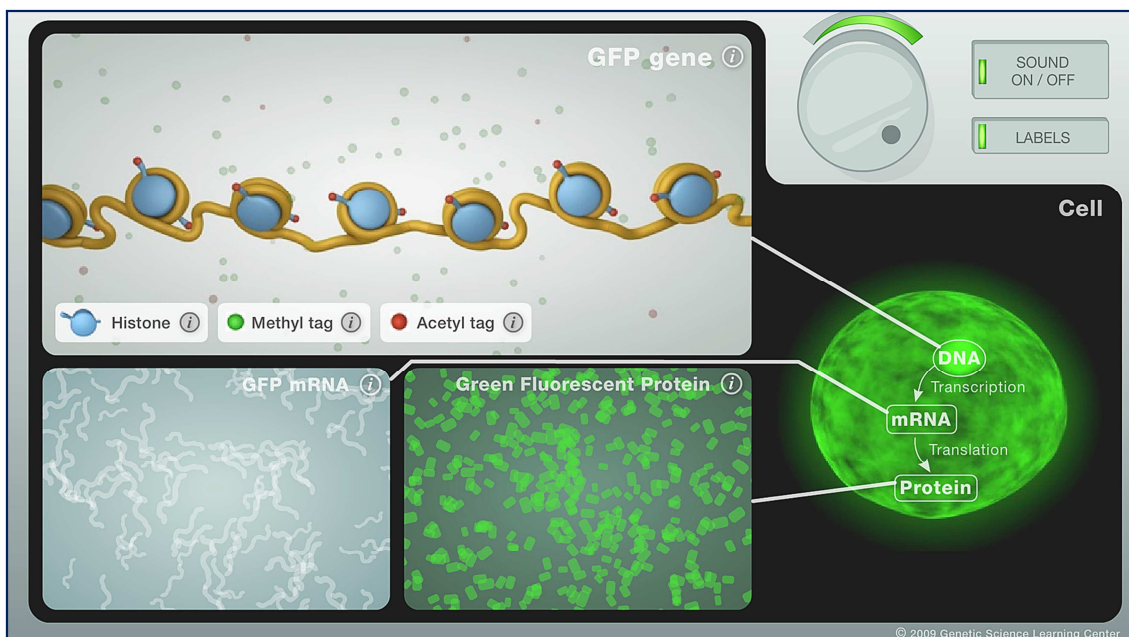
è regolato da più miRNA a formare un pattern complesso e combinatoriale di regolazione dell'espressione genica (Lai, 2002).

Oltre al loro ruolo di regolatori dell'espressione genica, infatti, sembra che i miRNA abbiano anche un ruolo importante sia nel controllo della metilazione del DNA, avendo come potenziali target anche gli RNA messaggeri di enzimi deputati alla metilazione del DNA, sia nella regolazione della struttura della cromatina apportando delle modificazioni a livello degli istoni (Lyle R, 2000; Ying SY, 2005). A sua volta l'espressione dei miRNA può essere regolata da fattori epigenetici in quanto è possibile che i miRNA presenti negli introni possano essere trascritti da promotori presenti in regioni CpG regolate dalla metilazione del DNA.

È importante sottolineare come la relazione tra espressione dei miRNA e fattori epigenetici possa mediare l'impatto della riprogrammazione epigenetica in risposta a segnali specifici su un gruppo di altri geni, e come i miRNA stessi possano agire modificando a loro volta la struttura della cromatina al punto da essere considerati regolatori dei meccanismi di metilazione del DNA e delle modificazioni degli istoni (Chuang JC, 2007).



**Figura 3.** Video introduttivo disponibile sul sito <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/intro/>.  
L'epigenetica in breve.



**Figura 4.** Video interattivo disponibile sul sito <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/control/>. Muovendo la manopola si può vedere come il diverso grado di compattamento della cromatina influenza poi l'espressione genica di una cellula.

## ***Epigenetica e ambiente***

Evidenze scientifiche indicano che sia nell'uomo sia nelle piante l'epigenoma è un target importante delle modificazioni ambientali. Le piante ad esempio, pur non avendo un vero e proprio sistema nervoso, possono "memorizzare" i cambiamenti stagionali e in alcune specie biennali questa capacità è fondamentale per produrre fiori durante la primavera. Anche l'esposizione al freddo durante la stagione invernale induce delle modifiche a livello della cromatina che silenziano i geni coinvolti nella fioritura. Durante la stagione primaverile, quando ci sono le condizioni migliori per la riproduzione, tali geni sono riattivati.

Nell'uomo l'adattamento del materiale genetico ai cambiamenti ambientali può predisporre ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo di malattie e all'invecchiamento. Le alterazioni epigenetiche possono verificarsi anche durante tutto l'arco della vita sebbene la programmazione epigenetica sia stabilita all'inizio della vita e di conseguenza, il periodo evolutivo rappresenta la fase di massima sensibilità alle influenze ambientali. Anche l'ambiente post-natale ha un impatto importante sulla salute e svolge un ruolo cruciale nel generare la vulnerabilità per lo sviluppo di malattie croniche. E' ormai riconosciuto che uno stato avverso socio-economico durante l'infanzia rende l'organismo vulnerabile allo sviluppo di malattie croniche in età adulta, relative, ad esempio, alla pressione sanguigna, al colesterolo, ai valori del fibrinogeno e a sintomi depressivi (Power et al 2007).

Anche l'esposizione del feto durante la vita intrauterina può determinare dei cambiamenti nella programmazione genica: per esempio, la cura materna nel ratto può influenzare il termine di programmazione di espressione nel recettore del gene glucocorticoide nell'ippocampo (Weaver et al. 2001).

Diversi fattori ambientali potrebbero essere coinvolti, da soli o in combinazione, nel produrre cambiamenti nei profili epigenetici degli individui. Per esempio recentemente è stato dimostrato che coppie di anziani gemelli eterozigotici, che vivono separatamente in luoghi diversi, sono esposti a differenze epigenetiche in misura maggiore rispetto a coppie di gemelli monozigotici allevati insieme. La dimostrazione delle modificazioni epigenetiche che si accumulano con l'invecchiamento supporta l'ipotesi della perdita del normale pattern epigenetico (età e ambiente-correlata) come un possibile meccanismo per il tardo insorgere delle malattie comuni (Casati et al. 2010) (Figura 5).

Per capire l'impatto dell'ambiente sull'epigenoma, è necessario prendere in considerazione due scenari: 1) lo sviluppo embrionale e 2) la vita adulta. La necessità di differenziare tra la vita prenatale e postnatale nasce dall'impatto differenziale che una variazione epigenetica può avere sull'organismo. In generale, i cambiamenti epigenetici che si verificano durante lo sviluppo embrionale avranno un impatto molto

maggiore sul totale stato epigenetico dell'organismo, in quanto le alterazioni che si verificano nelle cellule staminali embrionali singole possono essere trasmesse nelle divisioni mitotiche consecutive e interesseranno molte più cellule rispetto alle alterazioni che si verificano in cellule staminali adulte e / o somatiche durante lo sviluppo postnatale. Anche se questa possibilità è plausibile, resta da confermare. In finale il tipo di modifica e la posizione genomica di tali cambiamenti epigenetici possono determinare un diverso stato clinico, accanto ad altre variabili casuali e al background genetico del singolo organismo (Aguilera et al. 2010).

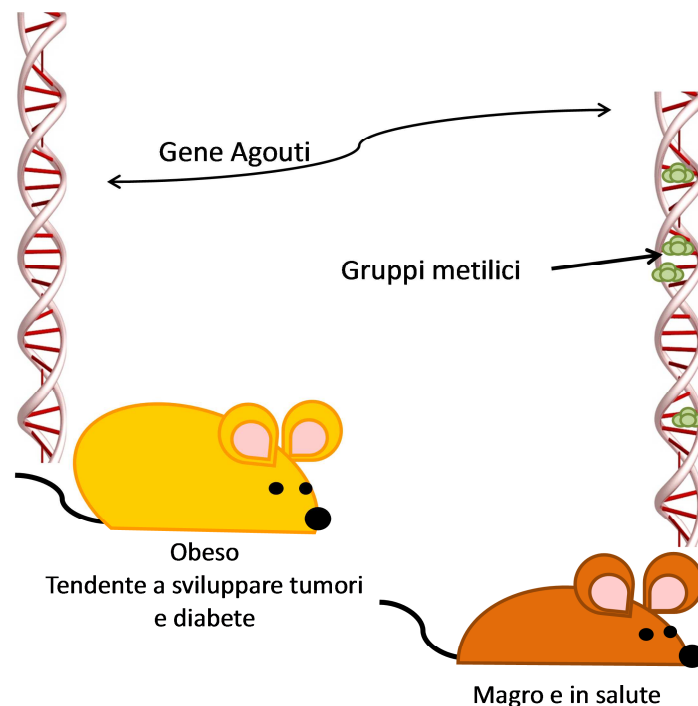


Figura 5. Video disponibile sul sito <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/twins/> relativo all'epigenetica di gemelli identici.

In teoria, le condizioni ambientali durante lo sviluppo embrionale possono portare a modificazioni epigenetiche permanenti (Fauque et al. 2007) e possono essere determinate principalmente da due fattori: 1) il fenotipo specifico della madre all'interno della placenta, le caratteristiche, quali la dimensione dell'utero e la disponibilità di nutrienti, e 2) lo stile di vita della madre, che determina i fattori ambientali a cui l'embrione è esposto.

Anche se poco è attualmente noto riguardo le modalità con cui il fenotipo della madre e la placenta possano influenzare gli epigenotipi della prole [è stato suggerito che l'obesità materna può portare a specifiche alterazioni epigenetiche della progenie (Waterland et al. 2008), vi è una grande quantità di informazioni riguardanti le condizioni ambientali della donna durante la gravidanza che influenzano i fattori

epigenetici specifici della prole. La condizione ambientale maggiormente studiata nella madre che interessa l'epigenotipo della prole è la dieta materna. Recenti esperimenti condotti sui topi hanno dimostrato che il colore del pelo, che può essere marrone, giallo o a chiazze, secondo il grado di metilazione del gene agouti durante lo sviluppo embrionale, è influenzato dalla dieta (Aguilera et al. 2010). L'allele agouti regola la produzione di pigmento nei follicoli del pelo del topo. Topi gialli e pezzati sono obesi e soggetti a diabete e cancro, in contrasto con i topi completamente agouti, noti come pseudoagoutis, magri e non diabetici. Il fenotipo dei topi agouti dipende dall'espressione della proteina agouti, che è regolata dallo stato di metilazione di una regione di DNA ripetuto nella zona del promotore agouti (Morgan et al. 1999). Se prima e durante la gravidanza le madri vengono nutrite con supplementi a base di acido folico o vitamina B12, che sono ricchi in gruppi metilici, la progenie presenterà soprattutto pelo di colore marrone, mentre le madri nutrite normalmente (senza supplemento) avranno progenie con pelo giallo. Aumenta permanentemente in questo modo la metilazione tessuto-specifica del gene agouti nella prole (Waterland et al 2003; Waterland et al 2006) (Figura 6). In linea con tale osservazione, anche l'esposizione in utero ad una dieta ad alto contenuto di grassi modifica il pattern di metilazione di promotori leptina e ER nel ratto (Milagro et al. 2009; Yenbutr et al. 1998).



**Figura 6.** Il gene agouti regola la produzione di pigmento nei follicoli del pelo dei topi, e durante lo sviluppo embrionale, è influenzato dalla dieta.

Altri esempi di modulazione epigenetica in risposta a fattori ambientali includono la down-regolazione di geni coinvolti nella funzione delle cellule B pancreatiche in ambienti anormali intrauterini (Simmons et al 2005) e specifici profili di metilazione del DNA della progenie associati alla dieta materna (Lillycrop et al. 2005; Lillycrop et al. 2008).

Alcuni ricercatori hanno dimostrato che, sia la malnutrizione sia una dieta limitata di proteine in ratte gravide e topi possono causare cambiamenti stabili nella regolazione epigenetica del recettore dei glucocorticoidi e di alcuni geni perossisomiali nel fegato della prole giovanile (Lillycrop et al. 2005; Lillycrop et al. 2008) e degli adulti (Burdge et al 2007). È interessante notare che cambiamenti epigenetici dieta-dipendente sono associati con un'alterata espressione di RNA messaggero di questi geni e dei loro geni bersaglio.

Nell'uomo, Heijmans e collaboratori dimostrano che una sfida nutrizionale nella prima infanzia può provocare un cambiamento di metilazione del DNA che è rilevabile 60 anni dopo, suggerendo, come negli studi su animali, l'ambiente nelle prime fasi di vita può indurre alterazioni a lungo termine per la regolazione epigenetica di geni. Heijmans e collaboratori hanno riferito ipometilazione del promotore del fattore di crescita-2 insulino-simile nel DNA genomico isolato da sangue intero da individui che sono stati esposti in utero durante la carestia olandese rispetto ai fratelli non esposti dello stesso sesso (Heijmans et al. 2008). Lo stesso gruppo aveva dimostrato che il promotore del fattore di crescita insulino-simile era ipometilato in individui le cui madri erano state esposte a carestie (Tobi et al. 2009).

L'effetto di fattori ambientali specifici sulla status epigenetico di organismi adulti è stato ampiamente studiato tuttavia i meccanismi molecolari relativi all'alterazione dei segnali epigenetici indotti da agenti ambientali sono ancora poco compresi e rappresentano un affascinante campo di studi (Feinberg et al. 2007, Feinberg et al. 2006).

Nell'uomo i fattori ambientali che possono influire sullo stato epigenetico durante la vita adulta possono essere divisi in quattro gruppi: la dieta, il luogo di vita e/o i luoghi di lavoro, i trattamenti farmacologici, e le abitudini malsane (Figura 7).

Per capire in che modo i fattori ambientali possono influenzare l'epigenotipo di un organismo, è importante considerare che gli organismi superiori sono costituiti da più tessuti e che, gli effetti dei fattori ambientali sulla epigenotipo di un organismo possono essere tessuto o cellula-specifico (perché lo specifico stato epigenetico di un tessuto rende questo tessuto più resistente alle alterazioni epigenetiche ambientalmente indotte). Il grado di esposizione di un tessuto a uno specifico fattore ambientale può anche determinare la sua capacità di indurre alterazioni epigenetiche specifiche all'interno di tale tessuto. Ad esempio, è facile immaginare che, se le radiazioni UV hanno un effetto specifico su un particolare fattore epigenetico, allora

questo sarebbe molto più evidente nella pelle, poiché è esposta alla radiazione solare, piuttosto che nel muscolo, che non lo è.

Uno degli esempi più evidenti di come il tipo di dieta possa influenzare i fattori epigenetici è l'assunzione di folati.

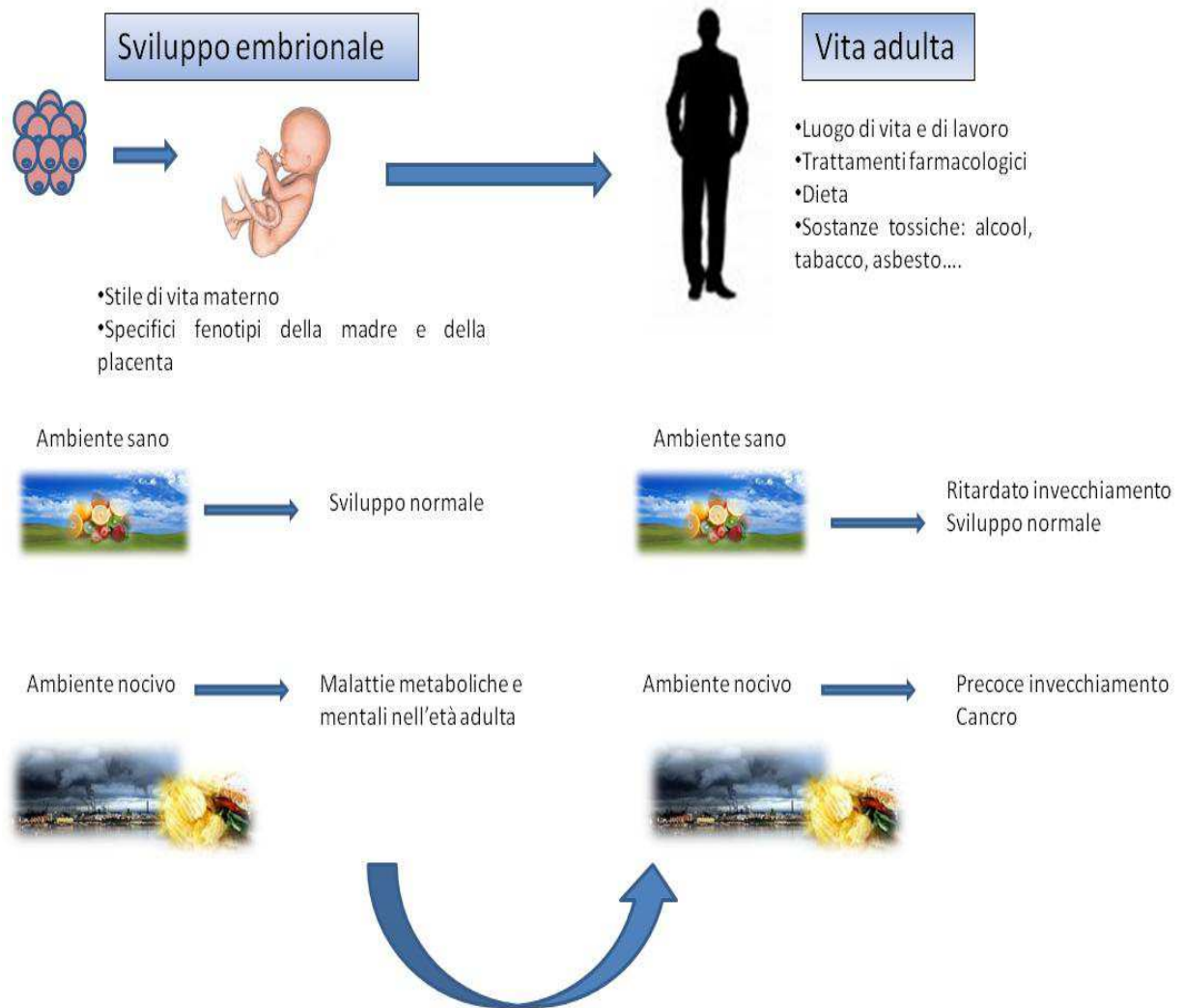
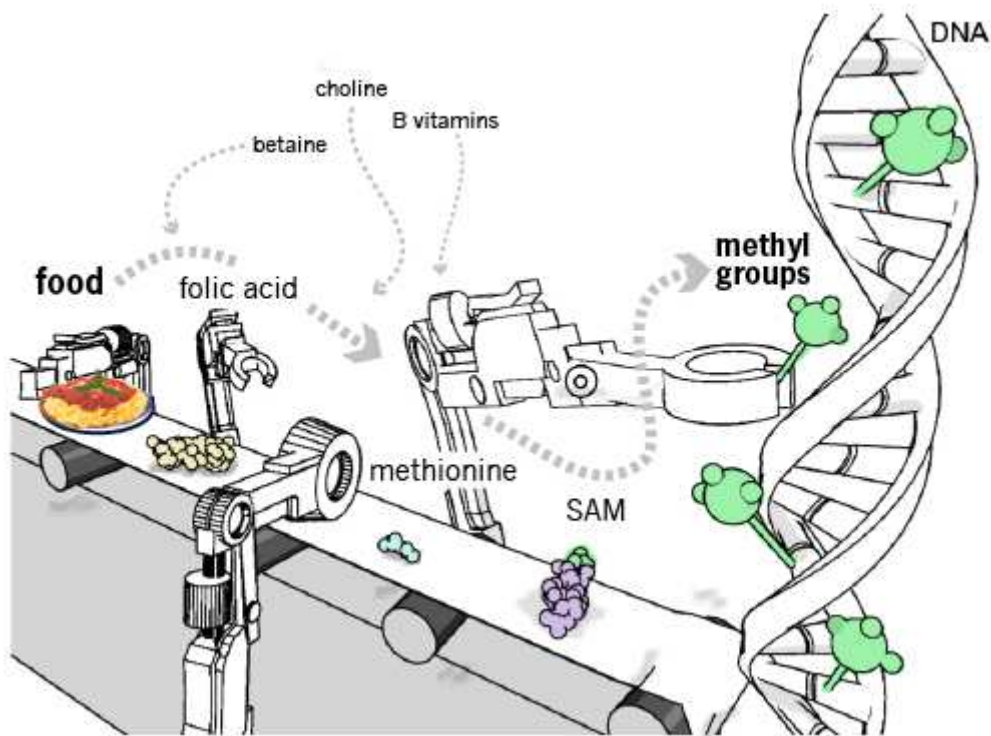


Figura 7. Epigenetica e ambiente.

L'acido folico (vitamina B9) è importante per l'epigenetica, perché è necessario per la rimetilazione dell'omocisteina, una reazione chimica chiave della via metabolica che sintetizza la S-adenosil metionina, il gruppo donatore metilico degli istoni e delle reazioni di metilazione del DNA. La quantità di assunzione di folato nella dieta può essere associata con lo stato epigenetico dell'organismo (Keyes et al. 2007, Kotsopoulos et al. 2008) e, carenze alimentari da folati provocano numerose

alterazioni della salute che sono più evidenti quando si verificano durante lo sviluppo embrionale (Poulsen et al. 2007). Nei ratti, la restrizione proteica materna durante la gravidanza porta, nella prole, ad una perdita di metilazione del promotore del gene associato al metabolismo del glucosio, nei tessuti quali fegato, polmone e fegato (Burdge et al. 2007). La metionina, un altro composto dietetico coinvolto nella via metabolica che sintetizza la S-adenosil metionina (SAM), è anche coinvolto nelle malattie epatiche epigenetica-dipendenti (Avila et al 2002). La SAM introdotto dalla dieta, è il donatore metilico universale per transferasi metilici ed è esclusivamente fornita dal metabolismo del carbonio folato-mediata. Pertanto una dieta arricchita o povera di folato può influenzare l'attività della DNA metiltrasferasi e del profilo di metilazione del DNA, di conseguenza influenzando anche l'espressione genica (Figura 8).



**Figura 8.** I nutrienti provenienti dalla dieta sono trasformati in gruppi metilici attraverso un pathway, costituito da diversi fattori che manipolano tali molecole e trasferiscono in ultimo i gruppi metilici sul nostro DNA (dal sito <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/>)

Il Selenio è una sostanza alimentare che modifica lo stato epigenetico di un organismo a livello della metilazione del DNA e della modificazione degli istoni (Xiang et al. 2008). Certi polifenoli alimentari, come l'epigallocatechina-3-gallato di tè verde e genisteina della soia possono prevenire il cancro per mezzo di meccanismi epigenetici.

Recentemente, altre sostanze presenti in natura in alcuni alimenti, come il butirrato in formaggi, il disolfuro di diallile in aglio e sulforafano nei broccoli, sono state identificate come inibitrici dell'Istone Deacetilasi (HDAC), e un ruolo putativo per alcuni di questi è stato proposto in chemioprevenzione attraverso l'interruzione della progressione del ciclo cellulare incontrollata o dall'induzione dell'apoptosi attraverso una maggiore acetilazione e derepressione di geni, come P21 e BAX. L'effetto della dieta sullo stato epigenetico di un organismo può essere così importante che è stato anche descritto che una dieta ricca di grassi può essere associata con ipermetilazione di specifici promotori di DNA di geni oncosoppressori.

I fattori epigenetici possono essere alterati da sostanze farmacologiche sebbene l'evidenza per quest'ultima sia limitata. Un esempio è il dietilstilbestrolo, un farmaco usato da milioni di donne in gravidanza per prevenire aborti spontanei e molti altri disturbi in gravidanza, che è attualmente associata ad un aumentato rischio di cancro al seno, adenocarcinoma a cellule chiare della vagina e della cervice, e ad anomalie riproduttive. E' stato proposto che gli effetti sulla salute drammatici del dietilstilbestrolo possono essere mediati da meccanismi epigenetici, poiché questo farmaco è stato dimostrato alterare l'espressione della DNA metiltransferasi e della metilazione del DNA genomico.

Il luogo di vita e / o di lavoro può determinare il livello di esposizione a molti fattori ambientali che sono potenzialmente in grado di alterare lo stato epigenetico. Ad esempio, è ovvio che la composizione chimica degli xenobiotici dell'atmosfera e dell'acqua in una città è diversa da quella di un ambiente rurale. Anche se non è del tutto certo che questi fattori ambientali siano responsabili di alterazioni epigenetiche, forti associazioni tra questi elementi sono stati riscontrati. Uno dei migliori esempi a questo proposito è la recente osservazione che, nel tessuto pleurico, almeno 24 loci CpG hanno alterazioni legate alla metilazione dell'amianto, ognuno dei quali è rappresentato da un aumento di metilazione. Altri tipi di composti chimici che sono noti alterare la metilazione dei livelli di DNA sono gli ioni metallici. Per esempio, gli inquinanti ambientali come il cromo, cadmio, nichel e arsenico nonché radiazioni ionizzanti e ultraviolette sono stati tutti associati con alterazione nei profili epigenetici e hanno dimostrato ridurre i livelli di metilazione attraverso l'inibizione dell'attività della DNA metiltransferasi.

I migliori modificatori studiati dell'epigenoma sono gli interferenti endocrini, un ampio gruppo di composti ambientali con un ampio spettro di azioni che perturbano diversi sistemi endocrini e che non solo sono in grado di influenzare l'epigenoma in animali esposti in utero, ma tali alterazioni, qualora si verificano in cellule germinali, possono essere trasmesse di generazione in generazione.

Strumenti farmacologici e altre forme d'intervento possono potenzialmente modificare il naturale modello epigenetico o l'inversa programmazione epigenetica, che può

essere deleteria. In effetti, diversi farmaci epigenetici sono attualmente nella fase dei test clinici per la cura del cancro e di malattie psichiatriche. Ulteriori agenti ambientali in grado di alterare il profilo dell'epigenoma, le infezioni, le tossine ambientali, i distruttori endocrini, il deperimento e il fumo sono i più studiati. Alterazioni alcol-indotte dell'epigenoma si riferiscono alla loro capacità di aumentare la metilazione nei promotori genici: queste sono state associate al silenziamento indotto dalla metilazione di geni oncosoppressori in cancro del colon-retto. Anche il fumo è stato dimostrato aumentare la metilazione di geni oncosoppressori in studi caso-controllo umani e nei topi e ridurre lo stato di metilazione di oncogeni nel cancro umano in linee cellulari. Il profilo epigenetico di un animale ospite può essere direttamente modificato da un'infezione batterica, aumentando o diminuendo la metilazione, a seconda dell'agente infettivo. La metilazione aberrante dei geni della mucosa gastrica è un riscontro comune negli esseri umani infettati con *Helicobacter Pylori* ed è un evento precoce nella carcinogenesi gastrica. Il cambiamento nel profilo epigenetico in risposta ad infezione può giocare un ruolo nello sviluppo di disturbi immunitari correlati e tumori precedentemente associati con agenti infettivi. Anche se la metilazione del DNA genomico viene cancellato più tra fecondazione e pre-impianto, molte modificazioni epigenetiche, acquisite in gravidanza o nel periodo fetale in cellule germinali, possono essere trasmesse di generazione in generazione.

Il bisfenolo A è associato con una maggiore massa corporea, la funzione riproduttiva ridotta e specifici cambiamenti nella metilazione del DNA in topi agouti: queste alterazioni del DNA sono presenti anche in cellule germinali e sono trasmesse in modo trans generazionale. Inoltre la prole maschile di ratti, esposta nel periodo perinatale al bisfenolo A mostra un spermatogenesi alterata a partire dalla prima fino alla terza generazione. Tale riduzione sembra essere legata ad una perturbazione dell'espressione proteica del profilo di coregolatori dei recettori steroidei (ad esempio recettore steroide coattivatore-1, SRC-1, o 300/CBP /proteine cointegrator-associata, p / CIP) coinvolti nella regolazione della spermatogenesi (Casati et al 2010).

### *Il caso Arsenico*

L'Arsenico (As) è un metalloide poliedrico rinvenuto in molti ambienti terrestri ed acquatici sia nelle sue forme inorganiche (iAS) che organiche. La principale causa della sua presenza è da attribuire principalmente a fattori naturali, quali i processi di pedogenesi, l'attività biologica e quella vulcanica (Smedley e Kinniburgh, 2002) e attività antropiche, tra cui quella mineraria, combustione di rifiuti, produzione di energia con combustibili fossili, uso di pesticidi e fertilizzanti a base di arsenico che hanno contribuito ad incrementare l'inquinamento da arsenico di suoli ed acque.

L'accumulo ambientale di arsenico, seguito dalla sua naturale mobilitazione, è uno dei principali argomenti in materia di salute pubblica. L'Arsenico inorganico, infatti, è stato classificato dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) come Gruppo 1, ovvero "Cancerogeno per gli umani" a causa della sua capacità di indurre cancro alla pelle, polmoni, fegato, vescica e reni.

Il meccanismo di cancerogenesi indotto dall'iAs non è noto, ma sembra essere legato a fenomeni di diversa natura quali lo stress ossidativo, co-cancerogenesi con altri tossici ambientali e fenomeni epigenetici che alterano la metilazione del DNA influenzando la programmazione nelle fasi precoci della vita e l'esordio delle malattie nelle fasi tardive. Per quanto riguarda i fenomeni epigenetici, studi sperimentali recenti mostrano che l'esposizione ad iAs è associata sia ad ipermetilazione che ipometilazione a seconda della concentrazione del metallo, della durata dell'esposizione e del tipo di organismo, tessuto o cellula coinvolti. In particolare l'esposizione ad iAs può alterare i livelli di metilazione del DNA sia globale che di promotori genici, apportare modificazioni istoniche (acetilazione, metilazione, fosforilazione) e modificare l'espressione di miRNAs (Ren 2010).

Nell'uomo il metabolismo dell'iAs prevede una conversione della forma pentavalente (iAsV) in quella trivalente (iAsIII), con successiva metilazione da parte dell'arsenico-metiltransferasi (AS3MT) a forme arsenicali monometilate e dimetilate (MMA, DMA, rispettivamente), escrete infine nelle urine. Le reazioni di riduzione e metilazione richiedono la disponibilità di gruppi metilici per la formazione di S-adenosil-metionina (SAM) che trasferisce gruppi metilici all'arsenico nel suo stato trivalente, e richiedono la presenza di glutatione per la riduzione di arsenico pentavalente (Sturchio et al. 2010) Il meccanismo proposto con cui l'arsenico influenza la metilazione del DNA, e quindi i meccanismi epigenetici, consiste nella competizione della metiltrasferasi per la SAM. In pratica, in presenza di un eccesso di arsenico, la SAM viene consumata per la detossificazione del metallo e l'impoverimento di tale cofattore può imporre limitazioni sul suo normale utilizzo nelle reazioni di metilazione cellulare, tra cui la metilazione del DNA ad opera della DNMTs e la metilazione istonica ad opera dell'istone metiltransferasi.

Tuttavia gli studi riguardanti i pattern di metilazione del DNA indotti dall'esposizione ad arsenite non sono sempre coerenti e le discrepanze riscontrate riguardanti la metilazione globale del DNA sono ancora in fase di chiarimento.

Non sono ancora stati effettuati studi sistematici di epigenomica in popolazioni umane esposte ad arsenico o in pazienti con cancro arsenico-associato. Tali studi potrebbero aiutare a chiarire la relazione tra l'esposizione all'arsenico, la disregolazione epigenetica, e la carcinogenesi e i recenti progressi tecnologici stanno permettendo l'acquisizione di nuove informazioni a riguardo (Ren, 2010).

## Funzioni

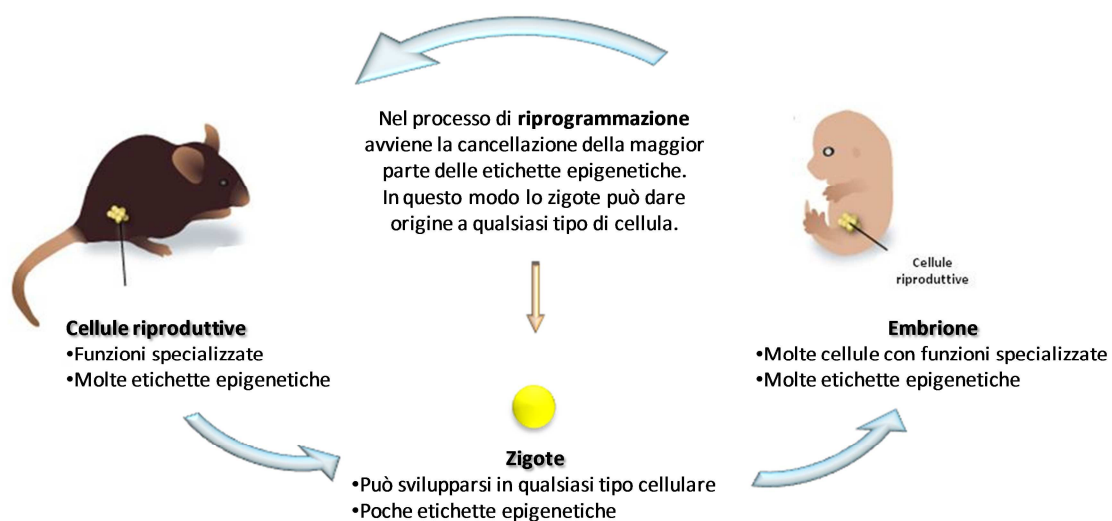
### Sviluppo

Lo sviluppo dei mammiferi inizia a partire dallo zigote totipotente, che dà luogo ad un organismo con centinaia di tipi cellulari diversi. La differenziazione cellulare dipende da modifiche nell'espressione dei geni che si realizzano durante lo sviluppo.

I diversi fenotipi cellulari, quindi, derivano dalla stessa sequenza genomica attraverso il controllo di sottoinsiemi di geni, che vengono espressi in modo specifico in ciascun tipo di cellula (Cortessis VK et al., 2012).

In genere i geni tessuto specifici nei tessuti in cui non devono essere espressi sono metilati, mentre gli stessi geni sono demetilati nei tessuti in cui vengono espressi. Molti geni costitutivi invece (geni housekeeping) sono preceduti da isole CpG che in genere rimangono demetilate (Casati L et al., 2010).

La differenziazione cellulare avviene grazie alla cancellazione e alla creazione di markers epigenetici (etichette chimiche) specifici per ogni linea cellulare, in un processo chiamato "riprogrammazione epigenetica" (Cortessis VK et al., 2012) (Figura 9).



**Figura 9.** Il processo di riprogrammazione resetta l'epigenoma dell'embrione precoce in modo che possa formare ogni tipo di cellula del corpo. Per essere trasmessi alla generazione cellulare successiva, le etichette epigenetiche non devono essere cancellati durante la riprogrammazione.

I pattern di metilazione del DNA infatti subiscono una riprogrammazione in coincidenza con due punti principali del ciclo di sviluppo, immediatamente dopo la fecondazione nello zigote e durante la formazione delle cellule germinali primordiali (PGC), che sono i progenitori diretti di spermatozoi e ovociti.

Dopo la formazione dello zigote si verifica un primo processo di demetilazione globale, che ripristina il potenziale evolutivo e solo in seguito riprende il processo di metilazione del DNA con l'impegno verso un destino cellulare distinto. (Seisenberger S et al., 2012)

I pattern di metilazione del DNA relativi agli spermatozoi e agli ovociti vengono riprogrammati nello zigote dopo la fecondazione, ma i genomi contribuito da ciascun genitore, impacchettati indipendentemente nei pronuclei, seguono percorsi distinti e separati che coinvolgono un ampio rimodellamento epigenetico; le dinamiche di metilazione del DNA sono ben visibili nell'asimmetria tra questi pronuclei. Il genoma paterno è spogliato di gran parte della sua metilazione in un processo globale e mentre il genoma materno è invece parzialmente demetilato.

Le caratteristiche "epigenetiche" (o la loro mancanza) definiscono lo sviluppo dello zigote e promuovono la differenziazione verso un distinto destino cellulare nelle future generazioni di cellule (Hemberger M et al., 2009).

L'identità cellulare in seguito viene stabilmente ereditata da una divisione cellulare all'altra, attraverso il sistema di mantenimento della metilazione del DNA, che avviene attraverso il processo di mitosi (Seisenberg S. et al., 2012).

Sono state fornite descrizioni dettagliate della metilazione del DNA durante lo sviluppo dei tessuti, nel corso di studi condotti nel topo, che costituisce un utile modello nello studio della riprogrammazione epigenetica dello sviluppo dei mammiferi (Trasler, 2009).

Si ritiene che questi estesi cambiamenti dell'assetto epigenetico consentono allo zigote di cancellare le marcature epigenetiche ereditate dai gameti (ad eccezione dell'imprinting parentale) e quindi riprendere la totipotenza dello sviluppo.

La riprogrammazione dello sviluppo può portare a profonde differenze epigenetiche tra i due alleli.

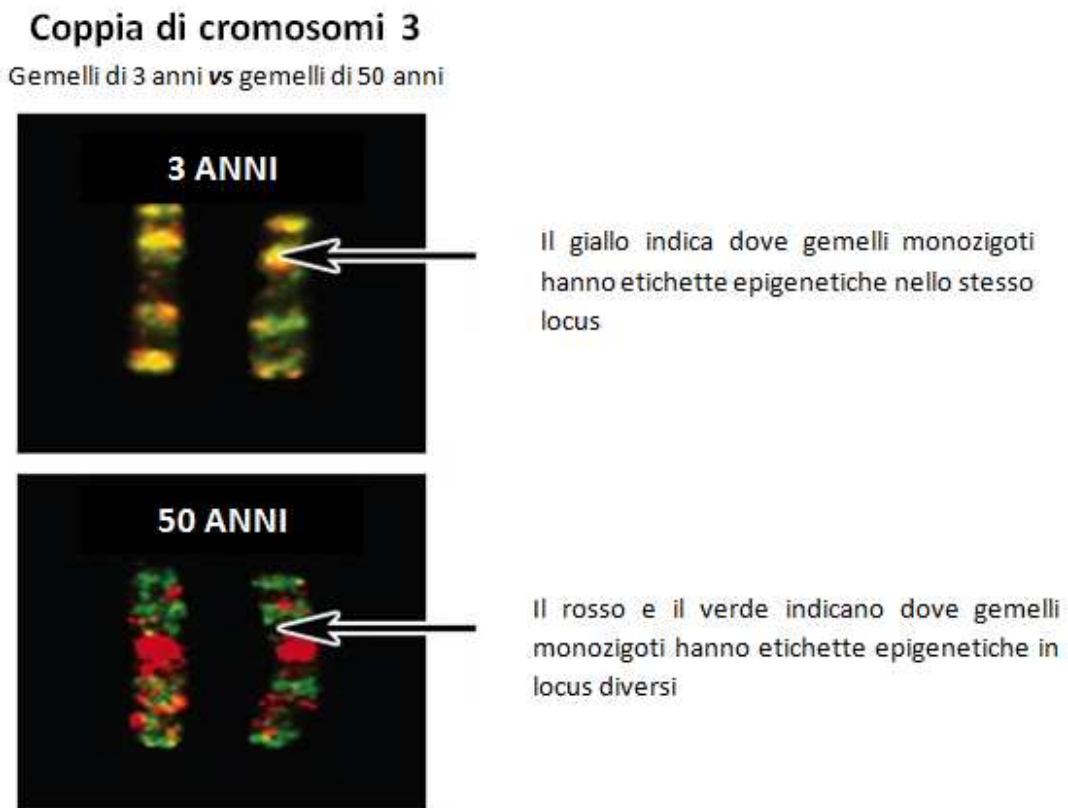
L'associazione tra l'espressione genica mono allelica e la metilazione del DNA è stata riconosciuta, sia nel processo di inattivazione dell'X nelle femmine (Boggs et al., 2002; Sharp et al., 2011), sia nell'imprinting genomico parentale (Ferguson-Smith, 2011), ma ora ci sono evidenze del suo coinvolgimento anche nell'espressione mono allelica di loci autosomici non soggetti ad imprinting (Harris et al., 2010; Tarutani Y and Takayama S, 2011).

Il pattern epigenetico della cromatina che si instaura durante lo sviluppo può influenzare la propensione a successivi cambiamenti epigenetici.

Un esempio di questo è la predisposizione dei geni ai quali si legano le proteine dei complessi Polycomb (inibiscono l'espressione di specifici geni bersaglio) nelle cellule staminali all'acquisizione di anomalie di metilazione del DNA nei processi di invecchiamento e nel cancro (Ohm et al., 2007; Schlesinger et al., 2007; Teschendorff et al., 2010; Widschwendter et al., 2007).

Fino a poco tempo fa si credeva che il pattern dell'epigenoma si stabilizzasse nelle prime fasi dello sviluppo fetale, ma da studi recenti si è visto che cambia in risposta all'ambiente per tutta la vita dell'individuo.

Si riscontrano differenze epigenetiche significative in coppie di gemelli monozigoti (genoma identico) e la discordanza cresce con il crescere dell'età e con la diversificazione delle abitudini e degli ambienti di vita (Fraga et al., 2005) (Figura 10).



**Figura 10.** In giallo le regioni dove i gemelli hanno marcature epigenetiche nella stessa posizione, in rosso e verde dove le marcature sono in posizione diversa. A 50 anni la diversità è molto evidente.

### *Imprinting genomico e inattivazione del cromosoma X*

L'Imprinting genomico e l'inattivazione del cromosoma X, sono meccanismi presenti nei mammiferi e costituiscono dei tipici esempi di asimmetria parentale dell'epigenoma.

La complementazione funzionale tra epigenotipi paterno e materno è necessaria per il normale sviluppo, la crescita e il comportamento, perché i geni espressi paternamente e/o maternamente (PEGs e MEGs) giocano un ruolo essenziale in questi processi (Renfree et al., 2013; Kelsey and Feil, 2013).

L'imprinting genomico è un meccanismo di regolazione genica, che instaura una sorta di memoria cellulare per cui uno dei due alleli di un gene viene escluso selettivamente dall'attivazione, in base al genitore (madre o padre) da cui l'allele è stato ricevuto.

Questo meccanismo riguarda un ristretto numero di geni, che hanno un ruolo rilevante nel differenziamento e nello sviluppo e viene attivato solo per un certo locus.

L'imprinting può avere origine materna, in questo caso viene silenziato l'allele materno ed espresso l'allele paterno o origine paterna, se viene silenziato l'allele paterno ed espresso quello materno.

Queste specifiche modificazioni parentali avvengono durante la gametogenesi e consistono in fenomeni di metilazione del DNA e di modificazioni post-traduzionali degli istoni, che portano alla formazione di domini allele-specifico attivi e/o repressi nelle regioni di imprinting (Weaver et al., 2009).

La differente metilazione di un determinato locus genico ad esempio costituisce una sorta di "impronta", che impone l'espressione di uno solo dei due alleli di quel determinato locus genico, o quello materno o quello paterno. La metilazione del DNA rappresenta un marker per la distinzione delle due copie del gene altrimenti identiche. Lo schema di metilazione viene ereditato dopo la replicazione del DNA. Nei geni sottoposti a imprinting, quindi sarà sempre espresso o l'allele materno o paterno.

Nel caso in cui siano presenti, in un locus regolato attraverso l'imprinting, un allele normale soggetto ad imprinting e un allele mutato, ad esempio per una delezione, non soggetto ad imprinting, si osserverà nell'individuo che possiede questi alleli un fenotipo patologico. Viceversa, una mutazione in un gene che non sarà espresso perché sottoposto a imprinting potrebbe passare inosservata.

È stato stimato che nell'uomo circa 200 geni sono sottoposti a imprinting genomico.

L'inattivazione del cromosoma X è un processo che avviene esclusivamente nelle cellule femminili, consiste nella soppressione dell'attività di un cromosoma X dei due cromosomi X ereditati dalla madre ed è necessario per compensare il "dosaggio" dei geni ereditati dal padre (XY) e dalla madre (XX). In questo modo quindi il livello di espressione di geni localizzati sui cromosomi sessuali è paragonabile in entrambi i sessi, anche se maschi e femmine hanno un corredo diverso di cromosomi sessuali.

I fattori epigenetici in questo processo fondamentale per la vita della cellula giocano un ruolo chiave.

Il cromosoma X viene reso trascrizionalmente silente tramite impacchettamento in un'unità densa di etero cromatina, che forma una caratteristica struttura inerte definita corpo di Barr (Figura 11); il risultato di tale processo è un'attenuata espressione, in tutte le cellule, dei geni portati dai cromosomi X, e dei fenotipi da essi manifestati (i cosiddetti caratteri legati al sesso). Il cromosoma X inattivo risulta quindi avere il DNA fortemente metilato e istoni ipoacetilati rispetto all'omologo attivo.

L'inattivazione del cromosoma X, chiamata anche effetto Lyon o lyonizzazione, è un normale processo biologico che avviene in tutte le femmine di mammifero e che risulta essere fondamentale in quanto la trascrizione dei geni presenti in entrambi porterebbe ad una pericolosa overespressione dei loro prodotti, che viene così evitata inattivandone uno dei due.

Una volta che una cellula somatica ha inattivato un cromosoma X, quello stesso rimane inattivo nelle sue discendenti. L'inattivazione non avviene nelle cellule germinali, in quanto questo causerebbe la mancata espressione dei geni legati al sesso nello zigote.

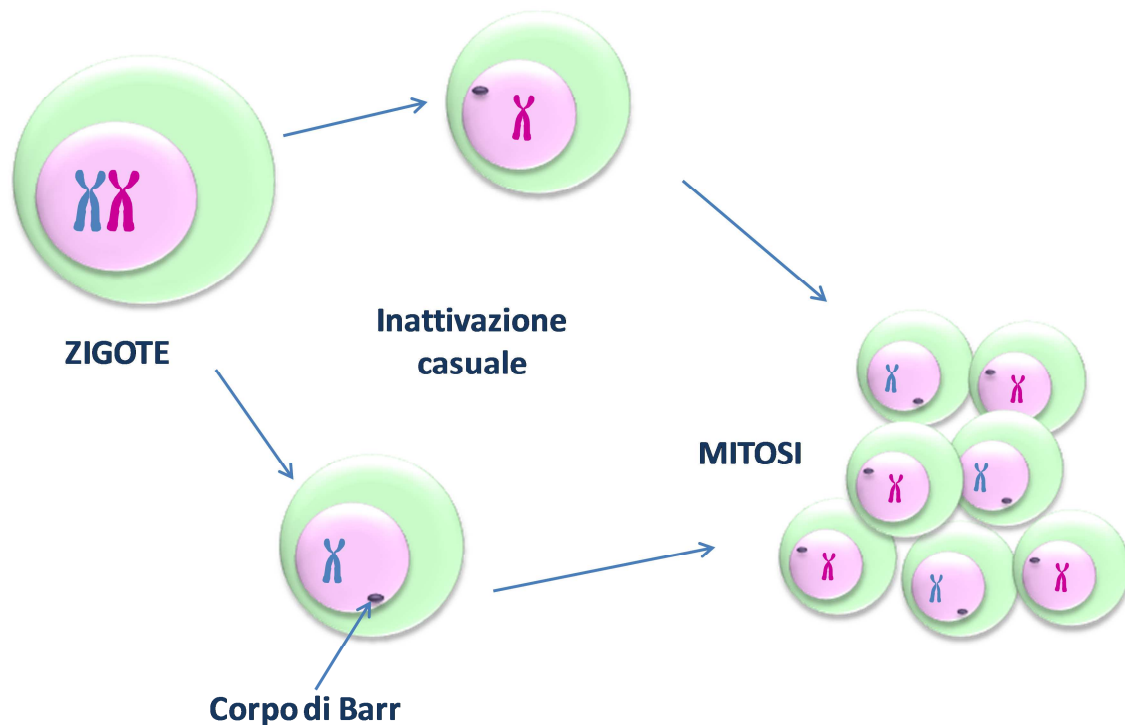


Figura 11. Inattivazione del cromosoma X.

Solo cellule pluripotenti, come le staminali (ES), le cellule embrionali pluripotenti indotte staminali (iPS) e le cellule germinali primordiali (PGC) hanno attivi due cromosomi X. (Maherali N et al., 2007; Chuva de Sousa Lopes SM et al., 2008)

Organismi non-mammiferi possono adottare altri meccanismi di compensazione del dosaggio del gene, ad esempio in *Caenorhabditis elegans* si verifica la downregolazione di ciascuno dei due cromosomi X femminili, mentre in *Drosophila melanogaster* una upregolazione del cromosoma X paterno (Kohda and Ishino, 2012).

La scelta di quale dei due cromosomi X debba essere inattivato è assolutamente casuale nella quasi totalità dei mammiferi e cellule diverse di uno stesso organismo

possono avere un differente X attivo (e, conseguentemente, l'espressione di alleli diversi per geni presenti in eterozigosi sui due cromosomi), ne risulta che tutte le femmine di mammifero sono dei mosaici (Okamoto et al., 2004).

Il tipico esempio del fenomeno dell'inattivazione dell'X è costituito dalla pezzatura del pelo di alcuni gatti, detti *gatti calico*, infatti è sul cromosoma X che si trova il gene che determina il colore del pelo.

I gatti *calico* sono sempre femmine, hanno quindi due cromosomi X in ogni cellula. Il gene del colore del pelo presenta due alleli che danno luogo rispettivamente a pelo di colore rosso o nero. Nei gatti di sesso femminile (XX), viene "spento" o represso un cromosoma X in ogni cellula e se una femmina eredita un allele di ciascun tipo (rosso e nero) avrà il manto a macchie di entrambi i colori (Figura 12).



Figura 12. Gatti calico. In questa cucciolata solo le femmine mostrano la pelliccia di tre colori.

Dato che il processo di inattivazione è casuale anche clonando un gatto *calico* non se ne otterrebbe mai un altro con il mantello uguale, nonostante i due individui siano geneticamente identici.

#### *Ruolo nell'evoluzione*

Negli organismi pluricellulari l'epigenetica viene ritenuta principalmente un meccanismo coinvolto nella differenziazione, ma gioca anche un ruolo molto importante nell'evoluzione.

Ci sono infatti numerosi studi che supportano l'idea di eredità epigenetica trans generazionale. Sono stati riportati infatti più di 100 casi di fenomeni di eredità

epigenetica transgenerazionale in una vasta gamma di organismi, tra procarioti, piante e animali. (Jablonka et al., 2009)

Sebbene la maggior parte di questi tratti epigenetici multigenerazionali vengano progressivamente persi nell'arco di più generazioni, rimane la possibilità che l'epigenetica multigenerazionale possa essere un aspetto dell'evoluzione e dell'adattamento.

L'epigenetica fornisce una spiegazione su come possano avvenire adattamenti immediati negli ambienti in continua evoluzione (Campbell et al., 2011; Dulac, 2010) e come questi adattamenti possano verificarsi per tutta la durata della vita. (Campbell et al., 2011)

Quando la sequenza del DNA della regione non è mutata questa modifica è reversibile. Si è osservato che i cambiamenti epigenetici possono verificarsi in risposta ad esposizioni ambientali, ad esempio topi trattati con alcuni integratori alimentari mostrano cambiamenti epigenetici che interessano l'espressione del gene Agouti, riguardante il colore della pelliccia, il peso e la propensione a sviluppare il cancro. (Cooney et al., 2002; Waterland and Jirtle, 2003)

L'avvento dell'epigenetica ha portato alcuni studiosi a rivalutare le teorie di Lamarck, tanto che si è arrivati a parlare di *rivincita di Lamarck*. Si è infatti osservato come il fenotipo di un individuo non sia solo l'espressione delle informazioni contenute nel DNA, ma sia fortemente influenzato anche dall'ambiente, che può agire sul genoma mediante meccanismi di tipo epigenetico; degli studi condotti evidenziano inoltre la possibilità di trasmettere alla progenie alcune modificazioni epigenetiche, quali quelle causate dalle infezioni virali o dalla nutrizione materna.

## ***Implicazioni***

I cambiamenti epigenetici sono necessari per il normale sviluppo dell'organismo e per mantenere lo stato di salute, in quanto controllano molte funzioni cellulari, ad esempio, come e quando alcuni geni devono essere attivati e disattivati per aiutare l'organismo a crescere e a svilupparsi (Simmons,2008; National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2008).

Allo stesso tempo però essi possono causare l'attivazione o il silenziamento alterato di alcuni geni durante le diverse fasi della crescita e dello sviluppo e quindi possono anche essere responsabili di alcuni stati patologici.

Ad esempio, alcuni geni che normalmente svolgono un'azione protettiva contro il cancro (geni oncosoppressori), possono essere silenziati attraverso alcuni segnali epigenetici, aumentando così il rischio di sviluppare il cancro. Gli scienziati ancora non capiscono fino in fondo, perché alcuni markers epigenetici spengono i geni di cui abbiamo bisogno per rimanere in buona salute, o accendono geni che possono causare le malattie (Aguilera et al, 2010).

Nel corso della vita, si accumulano diversi cambiamenti epigenetici e questo rende più o meno probabile che nel tempo alcuni geni vengano accesi o spenti. L'accumulo di cambiamenti epigenetici è parte del normale processo di invecchiamento, ma può anche aumentare la probabilità che alcuni geni vengano marcati in modo tale da portare allo sviluppo di malattie legate all'età, come ad esempio il cancro o il diabete (Aguilera et al, 2010).

Molte patologie sono causate da una combinazione di diversi tipi di cambiamenti in molti geni differenti. Come avviene per le mutazioni anche alcuni markers epigenetici possono essere trasmessi dai genitori ai figli (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2008).

Finora, gli scienziati sono stati in grado di collegare solo alcune patologie a modificazioni epigenetiche (Simmons,2008; Beaudet, 2003; Egger et al, 2004).

Si sta appena iniziando a scoprire i cambiamenti specifici che contribuiscono a tutte le varie malattie, dato che quasi ogni malattia complessa è probabilmente causata, in parte, da cambiamenti epigenetici.

La maggior parte delle malattie multifattoriali e le malattie ad eziologia non-mendeliana sono o potrebbero essere indotte da alterazioni dell'epigenoma. Fra queste, sono in primo piano i tumori, le sindromi neurodegenerative, l'autismo, le sindromi che coinvolgono le instabilità cromosomiche e ritardo mentale e, in generale, le malattie associate all'invecchiamento, ma anche patologie come obesità, diabete e patologie cardiovascolari (Fuso, 2012).

Patologia	Sintomatologia	Eziologia
<b>Sindrome ATR-X</b>	Disabilità intellettiva, $\alpha$ -talassemia	Mutazioni nel gene ATRX, ipometilazione di sequenze specifiche e satelliti
<b>Sindrome dell'X fragile</b>	Instabilità cromosomica, disabilità intellettiva	Espansione e metilazione di ripetizioni CGC nel FMR1 5, metilazione del promotore
<b>Sindrome ICF</b>	Instabilità cromosomica, deficit intellettivo	Mutazione DNMT3b, ipometilazione del DNA
<b>Sindrome di Angelman</b>	Disabilità intellettiva	Deregolazione di uno o più geni soggetti ad imprinting al15q11-13 (materno)
<b>Sindrome di Prader Willi</b>	Obesità, disabilità intellettiva	Deregolazione di uno o più geni soggetti ad imprinting al15q11-13 (paterno)
<b>BWS</b>	Organomegalia	Deregolazione di uno o più geni soggetti ad imprinting al 11p15.5 (es. IGF2)
<b>Sindrome di Rett</b>	Disabilità intellettiva	Mutazione MeCP2
<b><math>\alpha</math>-talassemia (un caso)</b>	Anemia	Metilazione delle isole CpG dell' $\alpha$ 2-globina, delezione dell'HBA1 e HBQ1
<b>Vari tipi di cancro</b>	Instabilità microsatelliti	Metilazione de novo di MLH1
	Interruzione del pathway di p53 e Rb, proliferazione incontrollata	Metilazione de novo di promotori di diversi geni
	Interruzione del complesso di rimodellamento della cromatina SWI-SNF	Mutazioni in SNF5, BRG1, BRM
	Overespressione di IGF2, silenzia mento di CDKN1C	Perdita dell'imprinting
<b>Leucemia</b>	Disturbi ematopoiesi	Traslocazioni cromosomiche che coinvolgono HATs e HMTs
<b>Sindrome di Rubinstein-Taybi</b>	Disabilità intellettiva	Mutazione nelle proteine di binding CREB (acetilazione degli istoni)
<b>Sindrome Coffin-Lowry</b>	Disabilità intellettiva	Mutazione di Rsk2 (fosforilazione degli istoni)

Modificata da Egger G. et al., Nature 2004 429, 459.

### *Disordini legati all'imprinting*

I fattori epigenetici regolano diversi processi fisiologici necessari il corretto sviluppo, tra cui come abbiamo visto sono alla base del fenomeno dell'imprinting genetico e una loro alterazione può portare ad alcune condizioni patologiche peculiari.

La condizione detta disomia uniparentale si verifica quando una persona riceve due copie di un cromosoma, o una parte di un cromosoma, da un genitore e nessuna copia dall'altro genitore. (Robinson, 2000)

In molti casi la disomia uniparentale probabilmente non ha alcun effetto sulla salute o sullo sviluppo, poiché la maggior parte dei geni non sono soggetti ad imprinting e non fa differenza se un gene è ereditato dalla madre o dal padre. Se però, i geni coinvolti dal fenomeno di disomia uniparentale sono sottoposti a imprinting genomico, il soggetto può mancare di tutte le copie attive di alcuni geni essenziali. Questa perdita di funzione del gene può portare a ritardo dello sviluppo, ritardo mentale, o altri disturbi (Beaudet, 2003).

Diverse malattie genetiche possono derivare da disomia uniparentale o da un alterato pattern epigenetico che interferisce con il normale imprinting genomico (Beaudet, 2003).

Le condizioni più note includono la sindrome di Prader-Willi, caratterizzata da un'alimentazione incontrollata e obesità, e la sindrome di Angelman, che causa ritardo mentale e disturbi del linguaggio. Entrambi questi disturbi possono essere dovuti alla stessa mutazione genetica, ovvero da disomia uniparentale oppure da altri errori di imprinting di geni che coinvolgono il braccio lungo del cromosoma 15 e la sindrome che il bambino svilupperà dipende dal fatto che abbia ereditato la mutazione dal padre o dalla madre (Knoll et al., 1989). Altre condizioni, come la sindrome di Beckwith-Wiedemann (un disturbo caratterizzato da una crescita accelerata e un aumento del rischio di tumori cancerosi), sono associati ad anomalie dei geni impressi sul braccio corto del cromosoma 11.

### *Cancro*

I cambiamenti epigenetici possono essere associati anche a diversi tipi di cancro, infatti il cancro è stata la prima patologia umana ad essere stata correlata a cambiamenti nei meccanismi epigenetici (Simmons, 2008).

Tuttavia è improbabile che le sole modifiche epigenetiche possano causare qualsiasi tipo di cancro, al contrario la maggior parte dei tumori sono causati dall'accumulo nel tempo di diverse mutazioni e cambiamenti epigenetici in molti geni diversi.

In diversi studi su cellule tumorali umane sono stati ampiamente evidenziati l'alterazione della metilazione del DNA, le modifiche degli istoni e i cambiamenti nei pattern dei miRNA (Kanwal and Gupta, 2011; Lovat et al., 2011; Sharma et al., 2010).

Nei tumori maligni il pattern di metilazione dei geni risulta alterato e si osserva una graduale ipometilazione del genoma, in concomitanza con un'ipermetilazione delle isole CpG che normalmente non sono metilate (Baylin and Jones, 2011; Feinberg, 2007).

L'ipermetilazione delle isole CpG nelle regioni del promotore di geni oncosoppressori è associata al loro silenziamento. Risulta essere un evento importante nella genesi di molti tumori ed è considerata un meccanismo frequente di inattivazione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA, nel metabolismo dei cancerogeni, nell'interazione cellula-cellula, nel differenziamento, nell'apoptosi e nell'angiogenesi.

Tipo di tumore	Disordine epigenetico
<b>Colon</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>hMLH1</i> , <i>p16<sup>INK4a</sup></i> , <i>p14<sup>ARF</sup></i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> e <i>WRN</i> ) Ipometilazione globale del genoma Ipermetilazione di microRNA (miR-124a) Perdita di imprinting di <i>IGF2</i> Mutazione di modificatori degli istoni ( <i>EP300</i> e <i>HDAC2</i> ) Diminuzione delle forme monoacetilate e trimetilate dell'istone H4
<b>Mammella</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>BRCA1</i> , E-caderina, <i>TMS1</i> e recettore degli estrogeni) Ipometilazione globale del genoma
<b>Polmone</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>p16<sup>INK4a</sup></i> , <i>DAPK</i> e <i>RASS1A</i> ) Delezione di <i>CBP</i> e del fattore di rimodellamento della cromatina <i>BRG1</i> Ipometilazione globale del genoma
<b>Glioma</b>	Ipermetilazione isole CpG (enzima di riparazione del DNA <i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> e <i>THBS1</i> )
<b>Leucemia</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>p15<sup>INK4b</sup></i> , <i>EXT1</i> e <i>ID4</i> ) Traslocazione di modificatori degli istoni ( <i>CBP</i> , <i>MOZ</i> , <i>MORF</i> , <i>MLL1</i> , <i>MLL3</i> e <i>NSD1</i> )
<b>Linfoma</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>p16<sup>INK4b</sup></i> , <i>p73</i> , enzima di riparazione del DNA <i>MGMT</i> ) Diminuzione delle forme monoacetilate e trimetilate dell'istone H4
<b>Vescica</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>p16<sup>INK4a</sup></i> , <i>TPEF/HPP1</i> ) Ipometilazione globale del genoma Ipermetilazione di microRNA (miR-127)
<b>Rene</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>VHL</i> ) Ipometilazione globale del genoma Perdita di imprinting di <i>IGF2</i>
<b>Prostata</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>GSTP1</i> ) Amplificazione genica della polycomb istone metiltransferasi <i>EZH2</i> Modificazione aberrante degli istoni H3 e H4
<b>Esofago</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>p16<sup>INK4b</sup></i> e <i>p14<sup>ARF</sup></i> ) Amplificazione genica di istone acetilasi <i>JMJD2C/GASC1</i>

<b>Stomaco</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>hMLH1</i> e <i>p14<sup>ARF</sup></i> )
<b>Fegato</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>SOCS1</i> e <i>GSTP1</i> ) Ipometilazione globale del genoma
<b>Ovaio</b>	Ipermetilazione isole CpG ( <i>BRCA1</i> )

Modificata da Esteller *N Engl J Med* 2008;358:1148-59

In molti tumori (pancreas, stomaco, prostata, colon) sono stati evidenziati processi anomali di metilazione e/o acetilazione che coinvolgono geni che codificano per gli enzimi che modificano gli istoni, quali acetiltransferasi istoniche, metiltransferasi, demetilasi, deacetilasi.

Recenti studi infine hanno dimostrato che i profili di espressione di microRNA differiscono tra tessuti sani e tessuti tumorali e tra vari tipi di tumore. La down-regolazione dei sottogruppi di microRNA potrebbe produrre la perdita della funzione di oncosoppressore per microRNA, come mostrato ad esempio per gli oncogeni RAS e BCL2.

L'ipermetilazione del DNA nella regione regolatrice dei miRNA invece è un meccanismo alla base della down-regolazione dei microRNA nei tumori.

#### *Ereditarietà*

*“L'ereditarietà “forte” è determinata dalla sequenza delle basi del DNA. La trasmissione dei caratteri connessa all'epigenetica è un processo invece “soft”, perché può essere instabile a causa dell'ambiente. E' un meccanismo lento ma costante, che viene determinato giorno dopo giorno.” (Sir David Charles Baulcombe professore della Royal Society e capo del Dipartimento di Scienze Botaniche presso l'Università di Cambridge).*

L'epigenetica fornisce una memoria molecolare della nostra esperienza passata e gli effetti dell'ambiente in cui viviamo possono essere trasmessi ai figli. Evidenze scientifiche infatti dimostrano che i cambiamenti epigenetici possono essere trasmessi nelle generazioni successive così come avviene per le mutazioni. In particolare, gli effetti di epigenetica possono essere trasmessi dai genitori ai figli attraverso la meiosi (Campbell IC, 2011; Rakyán VK, 2012) e la mitosi (Lim AL, 2012).

La relazione tra ambiente e geni e la possibilità che i cambiamenti epigenetici possano essere trasmessi alla progenie aprono un importante capitolo sull'ereditarietà delle malattie.

Infatti non solo la sequenza del DNA, sulla quale l'individuo non ha possibilità di intervenire, può determinare il rischio di malattia di figli e nipoti, ma anche l'ambiente in cui si vive e gli stili di vita che si adottano.

Alcuni ricercatori consultando i registri delle nascite e dei decessi della città di Overkalix (Nord della Svezia) hanno dimostrato che gli effetti di un ambiente negativo si riflettono sulle generazioni future. Gli episodi di carestia che si sono verificati durante la vita dei nonni influenzano infatti l'aspettativa media di vita dei nipotini, dimostrando così che un effetto ambientale può essere ereditato (Pembrey et al., 2006).

Alla luce di questo ne deriva l'importanza dello stile di vita che si conduce e dal momento che la predisposizione e l'origine di patologie come il cancro (ma anche di determinanti della longevità) può essere attribuita anche a mutazioni epigenetiche ogni individuo avrà una responsabilità in più nel condurre la propria vita in modo sano e nell'aderire ai consigli di prevenzione.

Questo cambia radicalmente le nostre idee (non solo sul cancro) e i ricercatori iniziano a pensare che le mutazioni epigenetiche e quelle del DNA rispettino una precisa gerarchia, e non è detto che sia il DNA al primo posto. Per questo motivo molti gruppi di ricerca nel mondo stanno cercando di capire il peso reale dell'epigenetica.

Considerando che le mutazioni epigenetiche, probabilmente presenti in tutti i tumori, sono farmacologicamente reversibili si può pensare di intervenire efficacemente, e questo potrebbe condurre a risultati importanti nella lotta contro diverse forme tumorali.

## ***Epigenetica e comportamento***

Gli studi sull'epigenetica vengono molto considerati anche nell'ambito della psicologia, in quanto possono fornire elementi utili a comprendere come l'espressione dei geni, influenzata non solo dall'ambiente, ma anche dalle esperienze, (Champagne and Mashoodh, 2012) possa portare a differenze individuali nei comportamenti, nella cognizione, nella personalità e nella salute mentale.

I cambiamenti epigenetici infatti non si verificano solo nel feto, ma anche in tutti gli individui cumulativamente per tutta la durata della vita (Campbell et al., 2011.) Dal momento che le modifiche epigenetiche possono essere trasmesse anche da una generazione a quella successiva (Goto T et al., 1998), gli psicologi evuzionisti concordano sul fatto che i moderni tratti e comportamenti umani possono essere considerati come il frutto di adattamenti vantaggiosi all'ambiente (Kail et al., 2011).

Ad esempio possono essere tramandati alcuni cambiamenti epigenetici che derivano dalla crescita in un ambiente caratterizzato dalla presenza o meno di cure parentali (Oz et al., 2009). Le cure parentali precoci rivestono un ruolo centrale nello sviluppo psicologico umano, ed al tempo stesso, abusi e abbandono precoce possono portare ad una vasta gamma di disturbi cognitivi ed emotivi (Masterpasqua, 2009).

Studi sugli animali mostrano che le prime cure materne possono influire sull'espressione di alcuni geni e che le cure materne precoci influenzano la reattività della prole allo **stress**. In particolare, in uno studio condotto su topi, sono stati esaminati gli effetti della toelettatura tramite leccamento della mamma nei confronti dei cuccioli. Un frequente leccamento dei piccoli da parte della mamma ha comportato un effetto positivo a lungo termine sulla reattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Il frequente leccamento è stato correlato alla diminuzione della metilazione a livello della citosina e degli istoni del promotore del gene del recettore per i glucocorticoidi (GR) dell'ippocampo e alla riduzione dei livelli di ACTH nelle ghiandole surrenali con diminuzione dei livelli di cortisolo. Al contrario le minori cure parentali si traduce in aumento del rilascio di cortisolo (Masterpasqua, 2009).

L'aumentato rilascio di cortisolo, attraverso l'asse HPA, come reazione allo stress psicologico è ormai un fenomeno conosciuto e consolidato (Guyton, 2000; Parkinson et al., 1997).

Da questo studio emerge che i cuccioli che avevano ricevuto meno cure parentali erano più inclini a sviluppare stress.

La ricerca ha dimostrato che esclusivamente l'ambiente di cura parentale precoce ha influenzato l'espressione genica e la risposta allo stress, al prescindere dal genotipo materno.

Quando alcuni cuccioli sono stati tolti a madri più distratte e affidati a madri più amorevoli sono stati invertiti i cambiamenti epigenetici legati a una maggiore risposta

allo stress e viceversa. Questa ricerca fornisce la prova che esiste un meccanismo epigenetico di fondo su come la risposta allo stress nella prole è stata determinata dalla madre adottiva, non dalla madre genetica (Masterpasqua, 2009).

Variazioni epigenetiche stabili nelle cure parentali possono essere tramandate da una generazione a quella successiva, dalla madre alla prole femminile, infatti le femmine che hanno ricevuto maggiori cure parentali sono diventate a loro volta madri più amorevoli. Viceversa, le femmine che hanno ricevuto meno cure parentali diventano madri meno attente e più stressate (Figura 13).

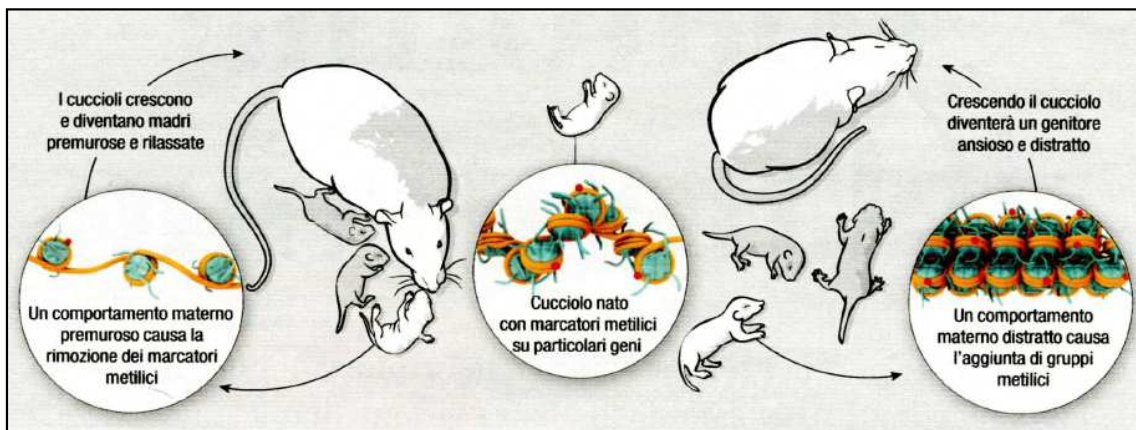


Figura 13. Studio condotto su topi in cui sono stati esaminati gli effetti della toelettatura tramite leccamento. Modificata da Eric Nestler, "Il codice epigenetico della mente", *Le Scienze*, Febbraio 2012.

La ricerca ha evidenziato nei cuccioli allevati da madri più amorevoli la presenza di metilazione del DNA correlata una maggiore espressione di un gene del recettore degli estrogeni nella regione mediale preottica dell'ipotalamo che è l'area del cervello collegata al nutrimento materno e la cura (Champagne et al., 2006).

Dal momento che gli esseri umani mostrano la stessa risposta del cortisolo allo stress (Baum et Contrada, 2010) i modelli animali hanno forti implicazioni per gli esseri umani (Szyf et al., 2008).

Negli esseri umani è stata dimostrata la relazione tra esposizione prenatale all'umore materno ed espressione genica, con l'aumento di reattività allo stress nella prole. Sono stati esaminati tre gruppi di bambini: quelli nati da madri trattate per la depressione con inibitori della ricaptazione della serotonina, quelli nati da madri con depressione non in trattamento, e quelli nati da madri non affette. L'esposizione prenatale all'umore depresso/ansioso della mamma era associato ad un aumento della metilazione del DNA del gene del recettore glucorticoidi. A sua volta, questo era legato alla maggiore reattività dell'asse HPA allo stress, misurata come aumento di cortisolo

salivare in bambini di tre mesi di età, dal momento che l'aumento dei livelli di cortisolo è associato all'aumento dello stress (Oberlander et al., 2008; Parkinson et al., 1997).

I risultati erano indipendenti dal fatto che le madri fossero trattate farmacologicamente per la depressione (Oberlander et al., 2008).

Numerosi studi condotti dimostrano che l'ambiente influenza cambiamenti epigenetici legati alla cognizione, come **apprendimento** e **memoria**. (Miller, 2010; Fischer et al., 2007) Studi condotti utilizzando topi con una vasta neurodegenerazione e con perdita sinaptica nel cervello anteriore ha indicato che l'arricchimento di stimoli ambientali ha contribuito a ripristinare l'apprendimento spaziale e le memorie a lungo termine (Fischer et al., 2007).

Altri studi hanno dimostrato il ruolo dell'epigenetica anche nel declino della memoria associato all'età (Miller, 2010), infatti topi anziani mostrano maggiori cambiamenti epigenetici (diminuzione dell'acetilazione degli istoni ed espressione genica ridotta) nell'ippocampo che è la zona del cervello legata all'apprendimento.

Utilizzando degli agenti chimici per aumentare l'acetilazione degli istoni si ottiene un miglioramento delle prestazioni nei ratti anziani (Peleg et al., 2010).

Le influenze ambientali ed epigenetiche sembrano lavorare insieme anche per aumentare il rischio di **dipendenza** (Wong et al., 2011). Ad esempio, è stato dimostrato che lo stress ambientale è alla base di un aumentato rischio nell'uso di sostanze (Andersen et Teicher, 2009), dato che alcol e farmaci possono essere utilizzati come via di fuga per far fronte allo stress (Carver, 2010).

Una volta che l'uso della sostanza comincia, tuttavia, le alterazioni epigenetiche possono aggravare ulteriormente i cambiamenti biologici e comportamentali associati con la dipendenza (Wong et al., 2011).

Anche l'uso della sostanza a breve termine può produrre cambiamenti epigenetici duraturi nel cervello, attraverso la metilazione del DNA e la modificazione degli istoni (Wong et al., 2011).

In diversi studi sull'uso di alcol, nicotina, cocaina, anfetamine e oppiacei sono stati osservati cambiamenti epigenetici in grado di modificare l'espressione genica, che a sua volta aumenta la vulnerabilità dell'individuo e il ricorso all'uso ripetuto di sostanze. Inoltre, l'aumento dell'uso di queste sostanze risulta in ancora maggiori cambiamenti epigenetici nelle aree piacere-ricompensa del cervello (Wong et al., 2011; Renthal et Nestler, 2008).

Pertanto, i cambiamenti nelle aree di piacere-ricompensa contribuiscono alla comparsa di cambiamenti neurali e comportamentali duraturi, connessi con l'aumento della probabilità di dipendenza, il mantenimento della dipendenza e la ricaduta (Wong et al., 2011).

È stato anche dimostrato che il consumo di alcol può produrre cambiamenti epigenetici che provocano l'aumento del desiderio di alcol e svolgere un ruolo nella progressiva perdita di controllo del consumo di alcol (Naassila, 2011).

Alcune alterazioni possono essere anche a lungo termine, come si evidenzia nei fumatori che mostrano cambiamenti epigenetici connessi con l'assunzione di nicotina anche dieci anni dopo la cessazione dell'assunzione (Launay et al., 2009).

Pertanto, le modificazioni epigenetiche (Wong et al., 2011) possono essere alla base di alcuni cambiamenti comportamentali che generalmente sono associati alla dipendenza. Questi includono: le abitudini ripetitive che aumentano il rischio di malattia e di problemi personali e sociali che hanno bisogno di gratificazione immediata, alti tassi di recidiva dopo il trattamento e la sensazione di perdita di controllo (Marlatt et al., 1988).

La prova della presenza di cambiamenti epigenetici correlati all'assunzione di alcool, nicotina ed oppiacei è derivato da studi condotti direttamente sull'uomo (Bönsch et al., 2004). Utilizzando modelli animali invece sono stati condotti studi sui cambiamenti epigenetici legati all'assunzione di anfetamine e cocaina.

Da questi studi è emerso che l'assunzione di queste sostanze da parte dei padri ha influenzato negativamente la prole in termini di memoria spaziale più povera, diminuzione dell'attenzione e diminuzione del volume cerebrale (He et al., 2006).

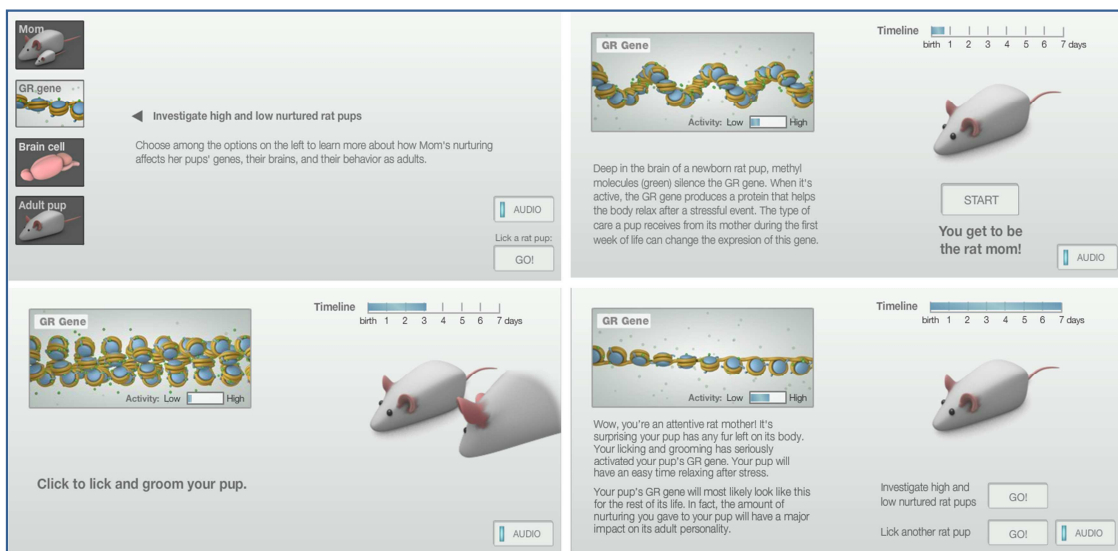


Figura 14. Gioco interattivo disponibile sul sito <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/rats/>.

## ***Ruolo bioinformatico***

La bioinformatica è una scienza relativamente giovane applicabile a molteplici campi della biologia.

Come il nome stesso suggerisce, si tratta di una materia interdisciplinare che coniuga conoscenze e dati biologici all'informatica.

Senza l'utilizzo di strumenti computazionali e di potenti processori molti dati biologici prodotti da esperimenti di laboratorio non potrebbero mai essere analizzati e non arriverebbero mai ad avere un senso.

Per fare un esempio banale, quando si fa un esperimento di sequencing di RNA o DNA, la company a cui ci si affida per il sequenziamento produce in output dei file di dati raw grandi diverse decine di GB.

Dentro quei file c'è scritto quali sono le sequenze di RNA o DNA che abbiamo mandato a sequenziare, sequenze che possono andare dalle 50 ai 100 nucleotidi cadauna e che in qualche modo possono arrivare a coprire l'intero trascrittoma o frammenti d'interesse di genoma di intere cellule.

A dirla così potrà sembrare poco ma in realtà ogni cellula possiede quantità enormi di DNA, finemente "impacchettato" in strutture tondeggianti dette nucleosomi, che servono a condensarlo in qualcosa di infinitamente piccolo. I nucleosomi sono poi intervallati da sequenze di DNA nudo, detto linker, a formare una collana di perle in cui il DNA è la catenina e le perle sono I nucleosomi.

Se noi volessimo immaginariamente "spacchettare" i nucleosomi troveremmo dinanzi a noi una collana senza perle incredibilmente lunga, capace di arrivare a coprire una distanza pari a quella che c'è tra la terra e il sole, andata e ritorno, per svariate volte!

Ecco spiegata l'importanza dei nucleosomi, riuscire a comprimere qualcosa di incredibilmente lungo, il DNA, in qualcosa di incredibilmente piccolo, la cellula.

In realtà la funzione dei nucleosomi è anche un'altra: rendere più o meno accessibile certi frammenti di DNA al macchinario della Polimerasi che serve per la trascrizione dello stesso. Immaginate questi nucleosomi come una sorta di ingombro fisico che rendono più o meno facile alla Polimerasi il transito sull'autostrada del DNA, ecco spiegato cosa sono le regioni di cromatina più aperta o chiusa.

Ma chi è che contribuisce a rendere tali "ingombri" più o meno presenti, più o meno by-passabili? I fattori che modellano la cromatina.

Essi operano in sinergia con altri fattori, proteine, piccoli RNA, lunghi RNA non codificanti in modo da creare infinite combinazioni di modificazioni delle code istoniche dei nucleosomi, influenzando così la condensazione del DNA, l'accessibilità o meno di certe zone, la trascrizione o il silenziamento di certi geni, il destino cellulare, infine il destino stesso dell'essere umano.

Tutto parte dal piccolo per estendere la propria influenza a macchia d'olio su tutto il resto, come increspature nell'acqua in cui dalla caduta di un piccolo sasso possono derivare movimenti lontani.

Ecco che la bioinformatica entra in gioco per dare un senso a tutto ciò.

Se io volessi studiare in laboratorio, con determinati esperimenti, in che modo e dove precisamente un certo fattore “x” (che noi sappiamo modificare la cromatina) si lega al DNA, dovrei fare un esperimento chiamato ChIP-seq, ovvero immuno-precipitazione della cromatina seguita da sequencing. Può sembrare qualcosa di estremamente complicato (e in effetti lo è a livello pratico) ma vediamo nel dettaglio di che cosa si tratta: immunoprecipitare la cromatina vuole dire prendere un anticorpo che noi sappiamo legarsi al nostro fattore “x” di interesse che siede sul DNA. Tramite il legame specifico di questo anticorpo alla proteina “x” di interesse andiamo a selezionare solo determinate zone di DNA legate e influenzate dalla proteina stessa e non le altre. Quindi rompiamo e degradiamo il DNA che non è legato da “x” e che non c'interessa e mandiamo a sequenziare solo il DNA che originariamente era legato dalla proteina “x”. In questo modo avremo una “fotografia” precisa di quali sono le sequenze del DNA su cui “x” si lega, cercheremo di capire perchè “x” si lega proprio lì e non altrove, in che modo il legame di “x” influenza tutto il panorama circostante di nucleosomi e tante altre domande biologiche possono venire in mente allo sperimentatore. Spesso sono i dati stessi, che mentre vengono analizzati, suggeriscono nuovi interessanti spunti, è una ricerca continua di senso che non ha mai una fine perchè ogni punto di arrivo costituisce nuovi punti di partenza.

Ma torniamo al nostro sequenziamento. Avete le sequenze di DNA di interesse legate dal fattore “x”, cosa c'è scritto dentro? ATCGGCTTATGG o TAGAATTGCCATT o ancora TAAGTATGGATTT... e così all'infinito? Il numero di combinazioni possibili delle quattro lettere che compongono il DNA aumenta esponenzialmente all'aumentare della lunghezza delle vostra sequenze. Qui entrano in gioco le company di sequencing, voi gli spedite le vostre sequenze e attendete la risposta.

Dopo qualche settimana di trepidante attesa la company vi dice che i dati del vostro sequencing sono pronti e che i file di output sono stati depositati su un repository privato di cui solo voi conoscete la password oppure in alternativa qualche corriere sta per consegnarvi un hard disk contenente al suo interno i file.

Ora che avete finalmente scaricato sul vostro computer i file inizia la vera e propria analisi bioinformatica dei dati.

Prima di tutto bisogna vedere com'è venuto il sequencing. A volte può capitare che dopo tanto lavoro di laboratorio e tanta attesa il sequenziatore non abbia fatto appieno il suo lavoro e vi abbia restituito delle sequenze non completamente “pulite”, ovvero invece di dirvi che in posizione “n” del vostro DNA c'è una A o una T o una G o una C c'è una “N”.

“N” vuol dire che il sequenziatore non ha capito che nucleotide c'era in quella posizione e, per evitare di buttare via l'intera sequenza, ha messo una lettera “non identificata”.

Per avere un'indicazione della qualità dell'output si fa affidamento ad un programma bioinformatico `fastqc` (chiamato `Fastqc` (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)).

Tale programma ha anche un'interfaccia grafica oltre che la classica riga di comando (merce molto rara in campo bioinformatico) il che lo rende particolarmente amichevole da usare e di facile interpretazione.

Esso valuta quante sequenze di DNA avete, quanto sono lunghe, quanto sono pulite o sporche, la quantità di duplicati e tante altre informazioni tecniche.

Se il risultato del `Fastqc` non ci piace particolarmente, non è detto che dobbiamo buttar via tutto l'esperimento, semplicemente possiamo prendere particolare accortezze per ripulire un po' i nostri dati o ancora possiamo fare valutazioni delle nostre analisi alla luce dei campanelli di allarme che il quality check preliminare ci ha inviato.

Per fare un esempio pratico, se il `fastqc` ci dice che ognuna delle nostre sequenze è lunga 100 nt e che il sequenziamento è venuto bene fino all' 80esima posizione, mentre dall'81esima in poi iniziano ad apparire delle fastidiose “N”, noi possiamo utilizzare dei programmi di “Trimming” (ovvero di taglio) che tagliano dall' 80esima posizione in poi (es. <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic> oppure <http://code.google.com/p/cutadapt/>).

Non è un problema buttare via una parte della sequenza (purchè la porzione tagliata non superi di gran lunga la porzione che tratteniamo) e questo può essere un buon compromesso per continuare a lavorare sui nostri dati in maniera più tranquilla.

Un paio di programmi bioinformatici di trimming molto utilizzati sono “Trimmomatic” e “Cutadapt”, essi vanno scaricati sul proprio pc e si corrono entrambi da riga di comando attraverso uno script che prevede l'immissione dell'input, le opzioni di taglio, in che formato voglio che sia il mio output ecc... Sono sempre disponibili on line i manuali con la spiegazione di ciascuna opzione utilizzabile.

A seconda di quanto sono grandi i vostri file di input impiegherete più o meno tempo per tagliare le vostre sequenze, se avete pochi piccoli file allora ve la sbrigherete in un paio d'ore, altrimenti se i vostri file sono tanti e grandi diverse decine di GB ciascuno non vi basterà una giornata di lavoro intera. Il lato positivo è che una volta che avete preparato il vostro script di taglio e lo avete reso eseguibile, potete lanciarlo da riga di comando, magari di sera prima di andare a dormire e il pc rimarrà acceso tutta la notte e farà il resto. Al mattino vi risveglierete con un output bello pronto e potrete continuare la vostra analisi.

A questo punto bisogna rispondere ad una domanda fondamentale: da dove derivano le sequenze che ho nei miei file?

Da quali cromosomi, da che posizioni, qual è la loro origine?

Qui entrano in gioco i programmi di "mapping" di cui il più famoso è Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) ma potrei citarvene tantissimi altri. Per semplificare, attraverso il famoso "Progetto genoma umano" di cui tanto si è parlato anche al telegiornale qualche anno fa, noi conosciamo la sequenza dell'intero genoma dell'essere umano. Ci sono voluti oltre 20 anni e sforzi sinergici provenienti da laboratori di tutto il mondo ma alla fine il puzzle è stato completato. Ora che abbiamo un'enciclopedia così vasta e completa qualunque bioinformatico può prendere i dati del proprio esperimento e andare a ricercare nel mare magnum delle sequenze dell'intero genoma umano da dove derivano quelle del proprio sequencing. È come se noi avessimo solo un campione di una popolazione molto più vasta, ma col nostro campione a far da esca possiamo risalire alle posizioni originali dei nostri frammenti di DNA legati dal famoso fattore "x" che abbiamo immunoprecipitato con l'anticorpo. Quindi finalmente possiamo dare un senso a tutto l'esperimento e rispondere alla domanda iniziale: dove si lega "x"?

x si lega a tali cromosomi, a tali posizioni, quindi modifica tali zone della cromatina. E se ci venisse in mente di sapere con chi collabora "x"? Magari, attraverso uno studio approfondito della letteratura riguardante "x", ci è venuto in mente di verificare una possibile interazione con "y"...

Potremmo quindi utilizzare altri strumenti bioinformatici tra cui i BedTools (<http://bedtools.readthedocs.org/en/latest/>) per incrociare i nostri dati di ChIP-seq di "x" con dati pubblici di ChIP-seq di "y" prodotti, nello stesso tipo di cellule su cui stiamo lavorando noi, da un altro laboratorio completamente indipendente dal nostro e depositati su database di fama mondiale come ad esempio UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Chi lo sa che non venga fuori qualcosa di interessante che possa suggerire un'interazione. Se il responso bioinformatico fosse "sì, qui potrebbe esserci collaborazione tra x e y..." allora la controparte sperimentale del laboratorio potrebbe ideare nuovi esperimenti da fare in laboratorio per verificare il tutto.

Quindi il bioinformatico non è da intendersi come puro analizzatore di dati che se ne sta al pc a scrivere strani codici tutto il giorno davanti ad uno schermo nero che sembra matrix, ma è anche una figura professionale con una profonda conoscenza della biologia, in grado di interpretare biologicamente i dati prodotti dal proprio team di ricerca e di indirizzare verso nuovi filoni esplorativi il gruppo stesso.

## **Bibliografia**

Waddington CH. (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.

<http://nihroadmap.nih.gov/roadmap15update.asp>

Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A. and Fraga MF. (2010) Epigenetics and environment: a complex relationship *J Appl Physiol* 109: 243–251.

Ficociello B, Sturchio E, Minoia C, Casorri L, Imbriani M, Signorini S. (2010) Epigenetica ed esposizione ambientale a xenobiotici. *G. Ital. Med. Lav. Erg.*; 32:1, 13-22.

Il codice epigenetico della mente di Eric J.Nestler. [www.lescienze .it](http://www.lescienze.it)

Millar D, Holliday R, Grigg G. (2003) Five not four: history and significance of the fifth base. In: Beck S, Olek A (eds). *The Epigenome, Molecular Hide and Seek*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA: Weinheim, pp 3–20

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315–322.

Rossella F, Polledri E, Bollati V, Baccarelli A, Fustinoni S. (2009) Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23: 2637–2646.

Ehrlich M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*; 21, 5400-13.

Jones PA. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.*; 3: 415-428.

Casati L, Colciago A, Celotti F. (2010) Epigenetic Mechanisms In Health And Diseases. *Brasilia Med.*, 48(2):209-218.

Sturchio E, Ficociello B, Minoia C, Biamonti G, Signorini S, Moccaldi A, Imbriani M. (2008) Espressione genica ed esposizione ambientale a xenobiotici: overview e applicazioni *G. Ital. Med. Lav. Erg.*; 30:2, 101-114

Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell.* 116: 281-297.

Lai EC. (2002) MicroRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30: 363-364.

Lyle R. (2000) The imprinted antisense RNA at the *Igf2r* locus overlaps but does not imprint *Mas1*. *Nat. Genet.* 25: 19-21.

Ying SY. (2005) Intronic microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 515-520.

Chuang JC. (2007) Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr. Res.* 61: 24R-29R.

- Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I, Martinez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ, Mato JM. S-adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol* 27: 163–167, 2002
- Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 97: 435–439, 2007
- Sturchio E, Casorri L, Masciarelli E, Bemporad E, Napolitano P, Marconi S, Beni C, Ferrazza P, Minoia C, Masotti A. (2010) “Arsenico: contaminazione ed esposizione ambientale”. ISBN 9788889415962.
- Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoché MA, Dandolo L, Vaiman D, et al. Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:116.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7: 21–33, 2006
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447: 433–440, 2007
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD et al. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 17046– 17049.
- Keyes MK, Jang H, Mason JB, Liu Z, Crott JW, Smith DE, Friso S, Choi SW. Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon. *J Nutr* 137: 1713–1717, 2007
- Kotsopoulos J, Sohn KJ, Kim YI. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. *J Nutr* 138: 703–709, 2008
- Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 135: 1382–1386, 2005
- Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br J Nutr* 100: 278–282, 2008
- Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65: 1–9, 2009.
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23: 314–318, 1999
- Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res* 61: 38R–42R, 2007

- Power C, Atherton K, Strachan DP, Shepherd P, Fuller E, Davis A, et al. Life-course influences on health in British adults: effects of socio-economic position in childhood and adulthood. *Int J Epidemiol.* 2007;36:532-9.
- Ren X, McHale CM, Skibola CF, Smith AH, Smith MT, Zhang L. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. Review. *Environ Health Perspect* 2011; 119(1): 11-19.
- Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab* 16: 390–394, 2005.
- Smadley PL, Kinniburgh DG. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 2002; 17: 517-568.
- Tobi EW, Lumey LH, Talens RP et al. (2009) DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 18, 4046–4053.
- Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at axin fused. *Genesis* 44: 401–406, 2006
- Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 32: 1373–1379, 2008.
- Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr* 136: 1706S–1710S, 2006
- Waterland RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr* 133: 238; author reply 239, 2003
- Weaver IC, La Plante P, Weaver S, Parent A, Sharma S, Diorio J, et al. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;185:205-18 30
- Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29: 2175–2181, 2008
- Yenbutr P, Hilakivi-Clarke L, Passaniti A. Hypomethylation of an exon I estrogen receptor CpG island in spontaneous and carcinogeninduced mammary tumorigenesis in the rat. *Mech Ageing Dev* 106: 93–102, 1998
- Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, Haile RW, Laird PW. (2012) Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. *Hum. Genet.*, 131:1565–1589. DOI 10.1007/s00439-012-1189-8
- Trasler JM. (2009) Epigenetics in spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 306:33–36
- Hemberger M, Dean W, Reik W. (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington’s canal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 10, 526–537. DOI 10.1038/nrm2727.

- Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. (2012) Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Phil Trans R Soc B* 368:20110330. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>
- Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat. Genet.*, 30:73–76.
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y, Antonarakis SE. (2011) DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res*, 21:1592–1600.
- Ferguson-Smith AC. (2011) Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat. Rev. Genet.*, 12:565–575.
- Harris RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, Downey SL, Johnson BE, Fouse SD, Delaney A, Zhao Y, Olshen A, Ballinger T, Zhou X, Forsberg KJ, Gu J, Echipare L, O’Geen H, Lister R, Pelizzola M, Xi Y, Epstein CB, Bernstein BE, Hawkins RD, Ren B, Chung WY, Gu H, Bock C, Gnirke A, Zhang MQ, Haussler D, Ecker JR, Li W, Farnham PJ, Waterland RA, Meissner A, Marra MA, Hirst M, Milosavljevic A, Costello JF. (2010) Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat. Biotechnol.* , 28:1097–1105.
- Tarutani Y, Takayama S. (2011) Monoallelic gene expression and its mechanisms. *Current opinion in plant biology*, 14:608–613.
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Bayliss SB. (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat. Genet.*, 39:237–242.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo Methylation in cancer. *Nat. Genet.*, 39:232–236.
- Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, Campan M, Noushmehr H, Bell CG, Maxwell AP, Savage DA, Mueller-Holzner E, Marth C, Kocjan G, Gayther SA, Jones A, Beck S, Wagner W, Laird PW, Jacobs IJ, Widschwendter M. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res*, 20:440–446.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.*, 39(2):157–158.

- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102:10604–10609.
- Kelsey G, Feil R. (2013) New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Phil. Trans. R Soc B*, 368, 20110336. DOI 10.1098/rstb.2011.0336.
- Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS. (2009) Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm. Genome*. Sep-Oct;20(9-10):532-43. DOI 10.1007/s00335-009-9225-2. Epub 2009 Sep 16.
- Renfree MB, Suzuki S, Kaneko-Ishino T. (2013) The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Phil. Trans. R Soc B*, 368, 20120151. DOI 10.1098/rstb.2012.0151.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70. DOI 10.1016/j.stem.2007.05.014.
- Chuva de Sousa Lopes SM, Hayashi K, Shovlin TC, Mifsud W, Surani MA, McLaren A. (2008) X chromosome activity in mouse XX primordial germ cells. *PLoS Genet.* 4, e30. DOI 10.1371/journal.pgen.0040030.
- Kohda T, Ishino F. (2012) Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Phil. Trans. R Soc B* 368: 20120353. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0353>
- Okamoto I, Otte A, Allis C, Reinberg D, Heard E. (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303 (5658): 644–9. DOI 10.1126/science.1092727. PMID 14671313.
- Jablonka E, Gal R. (giugno 2009) Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology* 84 (2): 131–176. DOI:10.1086/598822. PMID 19606595
- Campbell IC, Mill J, Uher R, Schmidt U. (January 2011) "Eating disorders, gene-environment interactions and epigenetics". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (3): 784–93. DOI 10.1016/j.neubiorev.2010.09.012. PMID 20888360
- Dulac C. (June 2010) "Brain function and chromatin plasticity". *Nature* 465 (7299): 728–35. DOI 10.1038/nature09231. PMC 3075582. PMID 20535202
- Cooney, CA, Dave, AA, and Wolff, GL. (2002) Maternal Methyl Supplements in Mice Affect Epigenetic Variation and DNA Methylation of Offspring. *Journal of Nutrition* 132 (8 Suppl): 2393S–2400S. PMID 12163699. available online

- Waterland RA and Jirtle RL. (agosto 2003) Transposable elements: Targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23 (15): 5293–5300. DOI 10.1128/MCB.23.15.5293-5300.2003. PMID 12861015
- Simmons, D. (2008) Epigenetic influence and disease. *Nature Education* 1(1)
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2008) NIH announces new initiative in epigenomics. Retrieved July 24, 2012, from [http://www.ninds.nih.gov/news\\_and\\_events/news\\_articles/pressrelease\\_New\\_Initiative\\_Epigenomics.htm](http://www.ninds.nih.gov/news_and_events/news_articles/pressrelease_New_Initiative_Epigenomics.htm)
- Beaudet, A. (2003y). The role of imprinting defects in Angelman syndrome, autism, and other disorders. Retrieved July 24, 2012, from [http://www.nichd.nih.gov/about/meetings/2003/ppb\\_fetalgrowth/Documents/beaudet\\_pdf.pdf](http://www.nichd.nih.gov/about/meetings/2003/ppb_fetalgrowth/Documents/beaudet_pdf.pdf) (PDF - 1.13 MB)
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457-463.
- Fuso A. Aging and Disease: the epigenetic bridge. 2012; 519-544. In: Tollefsbol, T (ed) *Epigenetic in Human disease*. 592 pp. June 2012. Academic Press/Elsevier)
- Robinson WP (May 2000). "Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences". *Bioessays* 22 (5): 452–9. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<452::AID-BIES7>3.0.CO;2-K. PMID 10797485
- Knoll J.H.M., Nicholls R.D., Magenis R.E., Graham J.M. Jr, Lalande M., Latt S.A. (1989). Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome deletion but differ in parental origin of the deletion. *American Journal of Medical Genetics* 32 (2): 285–290. DOI:10.1002/ajmg.1320320235. PMID 2564739
- Kanwal R, Gupta S. (2011) Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* 81:303–311.
- Lovat F, Valeri N, Croce CM. (2011) MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. *Semin. Oncol.* 38:724–733
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27–36
- Baylin SB, Jones PA. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* 11:726–734
- Feinberg AP. (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447:433–440
- Rakyan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, Whitelaw E (July 2002). "Metastable epialleles in mammals". *Trends Genet.* 18 (7): 348–51. doi:10.1016/S0168-9525(02)02709-9. PMID 12127774
- Lim AL, Ferguson-Smith AC (April 2010). "Genomic imprinting effects in a compromised in utero environment: implications for a healthy pregnancy". *Semin. Cell Dev. Biol.* 21 (2): 201–8. doi:10.1016/j.semcd.2009.10.008. PMID 19879952

- Guyton AC (2000). Textbook of Medical Physiology - 10th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 14, 33–36, 914, 916. ISBN 0-7216-8677-X.
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J; ALSPAC Study Team. (2006 Feb) Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.*;14(2):159-66.
- Champagne FA, Mashoodh R (2012). "Genes in context: Gene-environment interplay and the origins of individual differences in behaviour". *Current Directions in Psychological Science* 18 (3): 127–131. doi:10.1111/j.1467-8721.2009.01622.x
- Goto T, Monk M (June 1998). "Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2): 362–78. PMC 98919. PMID 9618446.
- Kail RV, Barnfield A (2011). *Children and Their Development, Second Canadian Edition with MyDevelopmentLab*. Toronto: Pearson Education Canada. ISBN 0-13-255770-3.
- Oz M, Roizen MF (2009). *You: Having a baby: The owner's manual to a happy and healthy pregnancy*. New York: Free Press. pp. 27–43. ISBN 1-4165-7236-8
- Masterpasqua F (2009). "Psychology and epigenetics". *Review of General Psychology* 13 (3): 194–201. doi:10.1037/a0016301
- Parkinson CF, McCance KL, Huether SE (1997). *Pathophysiology : The Biologic Basis for Disease in Adults and Children (Study Guide & Workbook)*. St. Louis, USA: Mosby Elsevier Health Science. ISBN 0-8151-3766-4.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. (June 2006) Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* 147 (6): 2909–15. DOI 10.1210/en.2005-1119. PMID 16513834
- Baum A, Contrada RJ (2010). *The Handbook of Stress Science: Biology, Psychology, and Health*. New York: Springer Publishing Company. pp. 77–100. ISBN 0-8261-1471-7.
- Szyf M, McGowan P, Meaney MJ (January 2008). "The social environment and the epigenome". *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (1): 46–60. doi:10.1002/em.20357. PMID 18095330
- Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM (2008). "Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses". *Epigenetics* 3 (2): 97–106. PMID 18536531
- Miller G (July 2010). "Epigenetics. The seductive allure of behavioral epigenetics". *Science* 329 (5987): 24–7. doi:10.1126/science.329.5987.24. PMID 20595592.

- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (May 2007). "Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling". *Nature* 447 (7141): 178–82. doi:10.1038/nature05772. PMID 17468743.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (May 2010). "Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice". *Science* 328 (5979): 753–6. doi:10.1126/science.1186088. PMID 20448184.
- Wong CC, Mill J, Fernandes C (March 2011). "Drugs and addiction: an introduction to epigenetics". *Addiction* 106 (3): 480–9. doi:10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x. PMID 21205049.
- Andersen SL, Teicher MH (April 2009). "Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse". *Neurosci Biobehav Rev* 33 (4): 516–24. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.09.009. PMC 2688959. PMID 18938197.
- Carver C (2010). "Coping". In Baum A, Contrada RJ. *The Handbook of Stress Science: Biology, Psychology, and Health*. New York: Springer Publishing Company. p. 223. ISBN 0-8261-1471-7.
- Renthal W, Nestler EJ (August 2008). "Epigenetic mechanisms in drug addiction". *Trends Mol Med* 14 (8): 341–50. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.004. PMC 2753378. PMID 18635399.
- Naassila M (2011). "Epigenetics in alcohol addiction: New mechanisms for new treatments?". *Alcohol and Alcoholism* 46 (Suppl 1): i1–63. doi:10.1093/alcalc/agr085. PMID 21863600.
- Launay JM, Del Pino M, Chironi G, Callebert J, Peoc'h K, Mégnien JL, Mallet J, Simon A, Rendu F (2009). "Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation". *PLoS ONE* 4 (11): e7959. doi:10.1371/journal.pone.0007959. PMC 2775922. PMID 19956754.
- Marlatt GA, Baer JS, Donovan DM, Kivlahan DR (1988). "Addictive behaviors: etiology and treatment". *Annu Rev Psychol* 39: 223–52. doi:10.1146/annurev.ps.39.020188.001255. PMID 3278676.
- Bönsch D, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber J, Bleich S (December 2004). "Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism". *J Neural Transm* 111 (12): 1611–6. doi:10.1007/s00702-004-0232-x. PMID 15565495
- He F, Lidow IA, Lidow MS (2006). "Consequences of paternal cocaine exposure in mice". *Neurotoxicol Teratol* 28 (2): 198–209. doi:10.1016/j.ntt.2005.12.003. PMID 16458479.



Finito di stampare nel mese di novembre 2013  
da SI.S.COM. S.r.l. - 0774 340777