

# La rivoluzione epigenetica



Mauro Durante 2011

# Perceptions of epigenetics

Adrian Bird (2007)

Geneticists study the gene; however, for epigeneticists, there is no obvious 'epigene'. Nevertheless, during the past year, more than 2,500 articles, numerous scientific meetings and a new journal were devoted to the subject of epigenetics. It encompasses some of the most exciting contemporary biology and is portrayed by the popular press as a revolutionary new science — an antidote to the idea that we are hard-wired by our genes. So what is epigenetics?

# Cos'è l'epigenetica?

L'epigenetica è definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili nell'espressione genica che non sono causati da cambiamenti nella sequenza del DNA

(Waterland & Michels, 2007)

Il termine è ripreso da Aristotele il quale credeva nell'epigenesi, ossia nello sviluppo di forme organiche individuali a partire dal non formato ed è stato introdotto dal genetista Conrad Waddington (1942) per descrivere i fenomeni che portano dal genotipo al fenotipo

"La differenza fra 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".

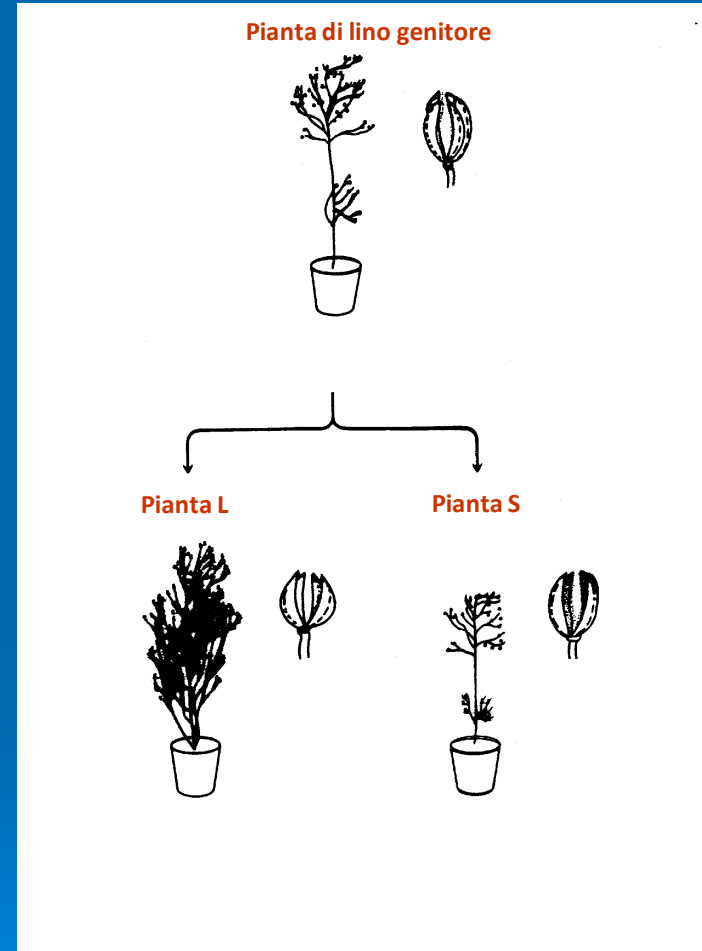
Thomas Jenuwein (Max-Planck-Institut für Immunbiologie,  
Freiburg, Germania)

Given that there are several existing definitions of epigenetics, it might be felt that another is the last thing we need. Conversely, there might be a place for a view of epigenetics that keeps the sense of the prevailing usages but avoids the constraints imposed by stringently requiring heritability. The following could be a unifying definition of epigenetic events: **the structural adaptation of chromosomal regions so as to register, signal or perpetuate altered activity states.**

Adrian Bird, *Perceptions of epigenetics*

NATURE Vol 447, 396-398 (2007)

# I genotrofi di lino



*The environmental induction of heritable change in Linum. Durrant, 1962*

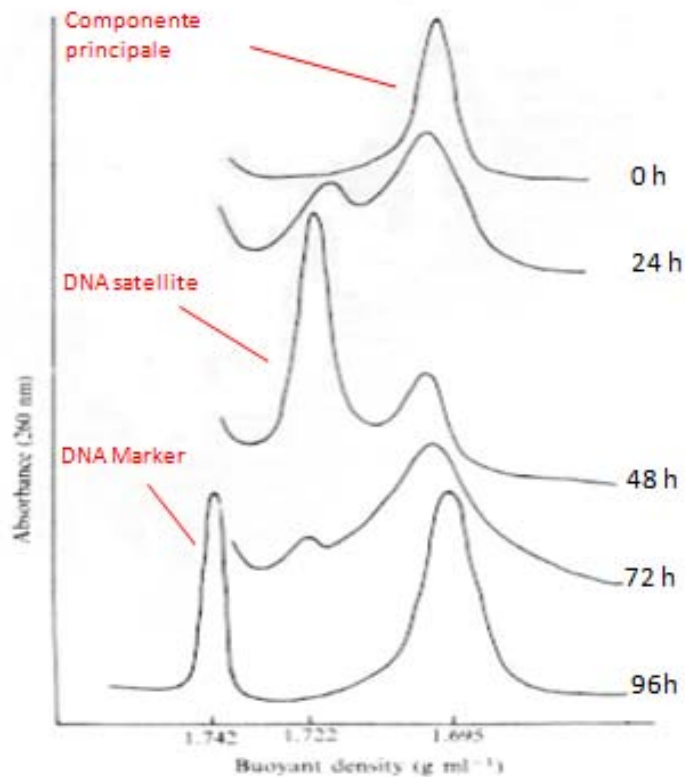
Nuti Ronchi V., A. Bennici, G. Martini,  
1973

*Nuclear Fragmentation in dedifferentiating  
cells of Nicotiana glauca pith tissue grown  
in vitro.*

Cell Differentiation, 2:77-85.



# Transient DNA Satellite in Dedifferentiating Pith Tissue



DNA satellite da midollo di *Nicotiana glauca* coltivato *in vitro* a diverse ore dall'espanto primario. Esempio di amplificazione di sequenze del DNA

Parenti *et al*, Nature New Biol., 246, 237-239 (1973)



NON SELFISH DNA AMPLIFICATION ? A POSSIBLE EXAMPLE FROM  
NICOTIANA TUMOROUS AND NON TUMOROUS DEDIFFERENTIATING SYSTEM.

M. BUIATTI and M. DURANTE.

XIIÈME "RENCONTRES DE MERIBEL"

2ÈME SESSION : LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE.

21-27 MARS 1981

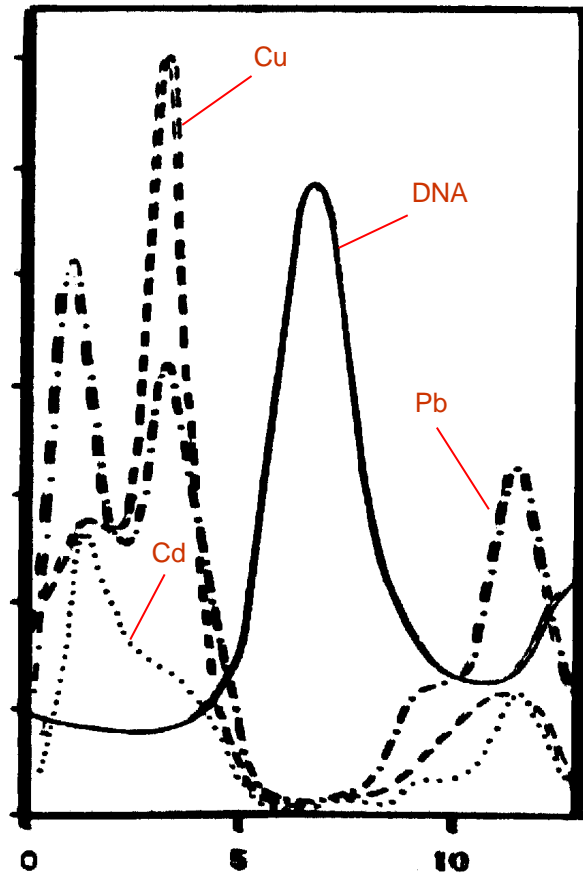
LES ARCS (SAVOIE)

# **A Comparison of Genome Modifications Leading to Genetic and Epigenetic Tumorous Transformation in *Nicotiana* spp. Tissue Cultures**

**Mauro Durante, Chiara Geri, Marcello Buiatti, Marina Ciomei, Edi Cecchini,  
Guido Martini, Roberto Parenti, and Livio Giorgi**

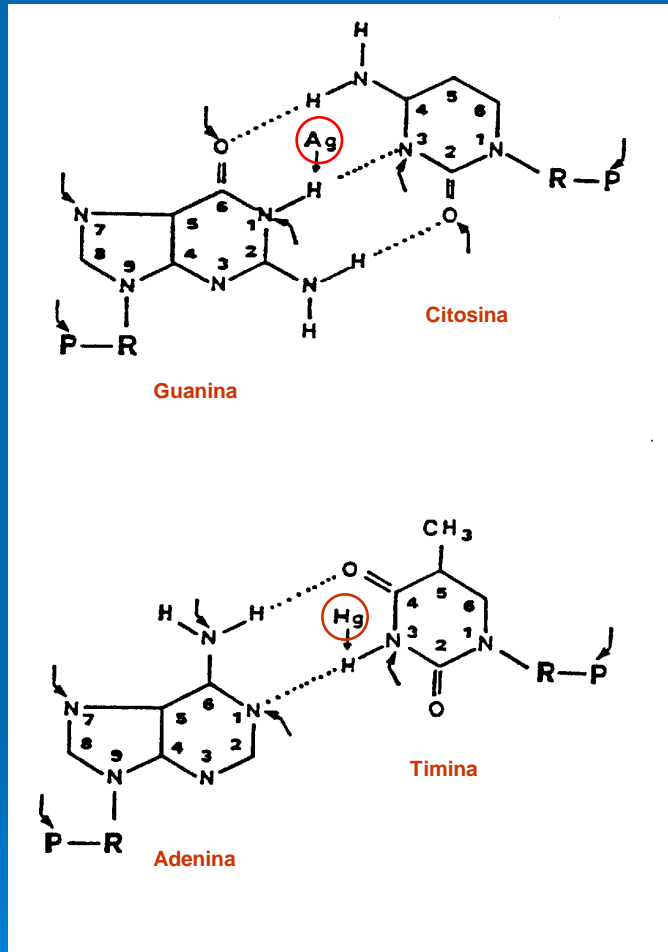
**Developmental Genetics 7:51–64 (1986)**

# Interazione ioni metallici e DNA



In specie ed ibridi di *Nicotiana* sono state individuate interazioni specifiche di ioni metallici con particolari sequenze di DNA

# Ioni metallici



Ione	Gruppo fosfato	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
$Ni^{2+}$	+	$N_7 C_6 NH_2$			
$Cu^{2+}$	+	$N_7$	$N_3$	$N_7 C_6OH$	$N_3$
$Zn^{2+}$	+	$N_1$	$N_1$	$N_1$	$N_1$
$Ag^+$	+			$N_1 N_7$	$N_3$
$Cd^{2+}$	+	$N_7$		$N_7$	
$Pb^{2+}$	+			$N_7$	$N_3$
$Hg^{2+}$	+	$N_1$	$N_3$		

Siti di legame del DNA con alcuni ioni metallici

# Mutazioni indotte in vitro da metalli pesanti

Compound	Class	Template	$\Delta$ Error frequency (metal concentration, mM)	Decreased fidelity	Carcinogenic or mutagenic
*Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2	[d(A-T)]	0.99 (10)	-	-
*AgNO <sub>3</sub>	1	[d(A-T)]	1.85 (0.03)	+	+
*Ba(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	[d(A-T)]	0.94 (10)	-	-
BaCl <sub>2</sub>	2	poly(A)	1.17 (10)	-	-
BeCl <sub>2</sub>	1	poly(A)	15 (10)	+	+
CaCl <sub>2</sub>	2	poly(A)	1.28 (5)	-	-
*Cd(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1	poly(C)	2.22 (0.24)	+	+
*CdCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	1.35 (0.04)	+	+
CoCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	8.37 (4)	+	+
*CrCl <sub>2</sub>	1	[d(A-T)]	3.70 (0.64)	+	+
*CrO <sub>3</sub>	1	[d(A-T)]	3.83 (16)	+	+
*Cu(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1	poly(C)	1.83 (0.12)	+	±
*CuCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	2.90 (0.08)	+	±
*FeCl <sub>2</sub>	2	poly(C)	1.14 (4)	-	±
*K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	poly(C)	0.98 (100)	-	-
*KCl	2	[d(A-T)]	1.11 (150)	-	-
*K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	[d(A-T)]	0.74 (40)	-	-
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	[d(A-T)]	1.05 (80)	-	-
*MgSO <sub>4</sub>	3	poly(C)	1.11 (10)	-	-
MnCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	3.75 (10)	+	+
*NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	2	poly(C)	1.00 (100)	-	-
*NaCl	2	[d(A-T)]	0.81 (120)	-	-
*NaHCO <sub>3</sub>	2	[d(A-T)]	0.96 (40)	-	-
*NaOH	3	[d(A-T)]	1.17 (10)	-	-
*NH <sub>2</sub> COOH	2	[d(A-T)]	0.83 (100)	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	poly(C)	0.94 (120)	-	-
NiCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	1.92 (8)	+	+
*PbCl <sub>2</sub>	1	poly(C)	1.48 (4)	+	+
*RbCl <sub>2</sub>	2	[d(A-T)]	0.90 (20)	-	-
SrCl <sub>2</sub>	3	poly(A)	0.86 (10)	-	-
*ZnCl <sub>2</sub>	2	[d(A-T)]	1.06 (0.4)	-	±

Da Sirover M.A., Loeb L.A., *Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens*. Science, 194, 1434 (1976).

# 5-Azacytidine-Induced Tumorous Transformation and DNA Hypomethylation in *Nicotiana* Tissue Cultures

302 DURANTE ET AL.

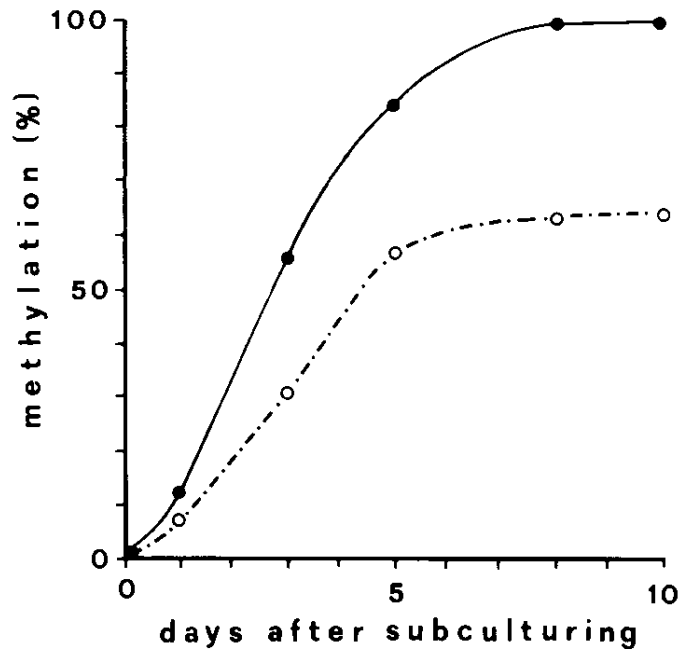


Fig. 6. AzaC-treated (○—○) and normal (●—●) cell cultures after labeled methyl group incorporation.

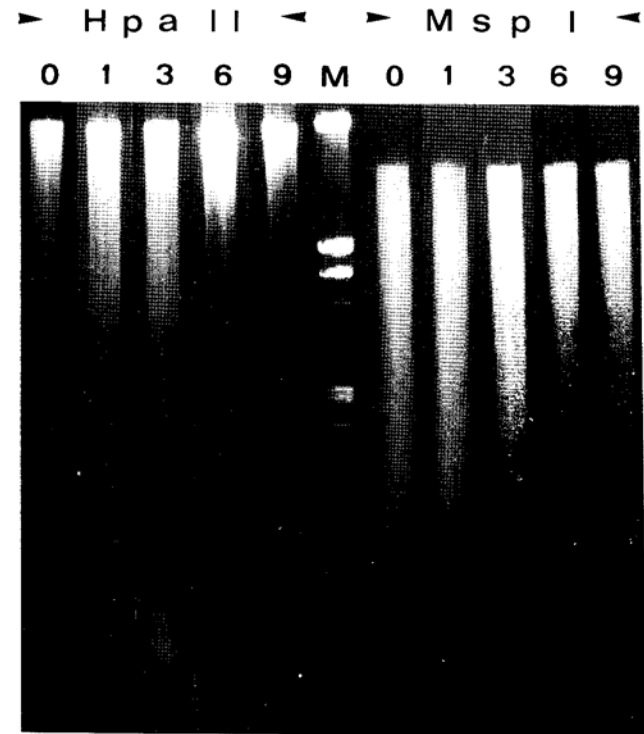
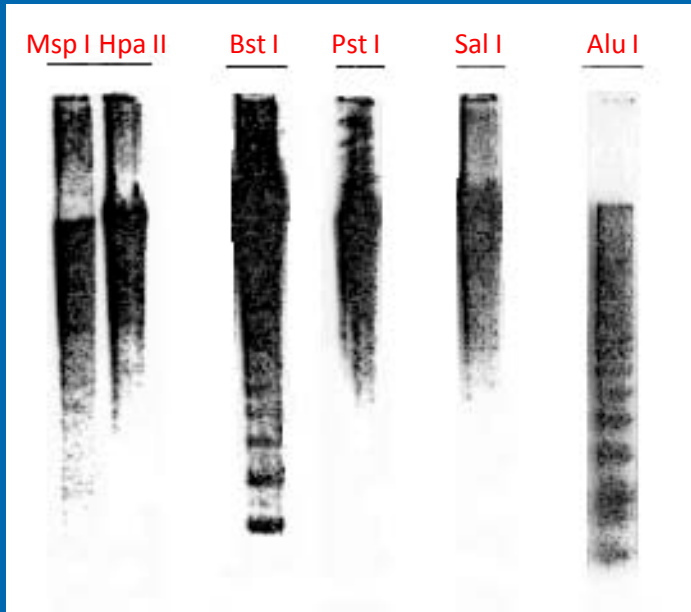


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted at different days of subculture (lanes 0-9) from normal NNT cells and digested with Hpa II and Msp I restriction enzymes. Lambda DNA cut by Hind III (M) was used as a molecular weight marker.

# Sequenze HR di DNA in *Allium cepa*



Il DNA di *Allium cepa* è stato tagliato con gli enzimi di restrizione indicati. Dopo elettroforesi e Southern blot è stato ibridato con una sonda omologa HR marcata con  $^{32}\text{P}$ : nella figura sono presentati i risultati dopo autoradiografia. Hpa II non taglia la sequenza  $-\text{CC}^{\text{m}}\text{GG}-$ , mentre l'isochizomero Msp I taglia la medesima sequenza anche se metilata sulla citosina interna (non taglia, invece, se è metilata la citosina esterna): per tale motivo la "macchia" generata da Msp I è più allungata. Bst I ed Alu I generano un *ladder* (scaletta) di frammenti. La "famiglia" Alu I è interspersa nel genoma degli eucarioti. Nell'uomo è presente con circa un milione di copie e complessità di circa 300 bp.: essa rappresenta una famiglia **SINE** (short interspersed repeated element) di retrotrasposoni (Hwu *et al.*, 1986).

# Differentiation of metaxylem cell line in the root of *Allium cepa* L.

## III. Levels of endogenous DNA methylation

M. Durante<sup>1,\*</sup>, M. Frediani<sup>2</sup>, L. Mariani<sup>3</sup>, L. Citti<sup>3</sup>, C. Geri<sup>3</sup>, and R. Cremonini<sup>2</sup>

**Table 4.** 5-methyldeoxycytidine content of DNA extracted from the three segments of *Allium cepa* roots

Stage	$\frac{5 - m \text{ Cyt}}{5 - m \text{ Cyt} + \text{Cyt}}$ moles% $\pm$ SE
M	33,17 $\pm$ 0.46
I	29.61 $\pm$ 0.85
II	23.30 $\pm$ 1.02

The measurements were established with reversed-phase high-performance liquid chromatography

Protoplasma (1990) 158: 149–154



Theor Appl Genet (1993) 85: 506–512

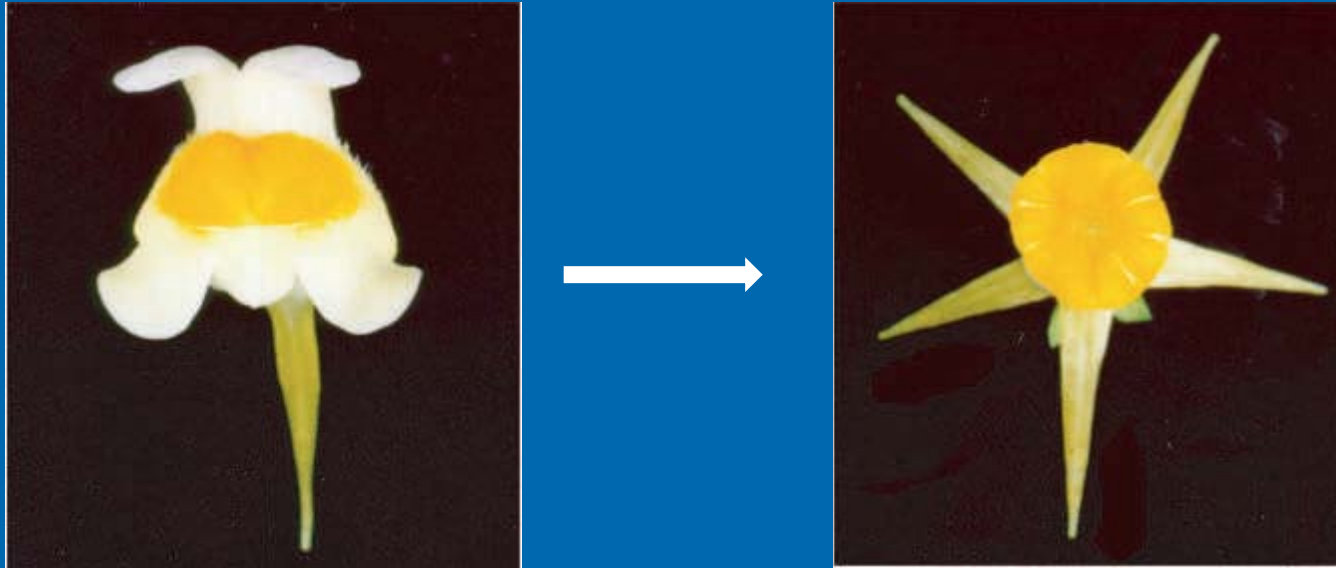
**THEORETICAL  
APPLIED GENETICS**  
**TAG**

© Springer-Verlag 1993

**Nuclear DNA changes within *Helianthus annuus* L.:  
changes within single progenies  
and their relationships with plant development**

**L. Natali<sup>1</sup>, A. Cavallini<sup>1</sup>, G. Cionini<sup>2</sup>, O. Sassoli<sup>1</sup>, P.G. Cionini<sup>3</sup>, and M. Durante<sup>1</sup>**

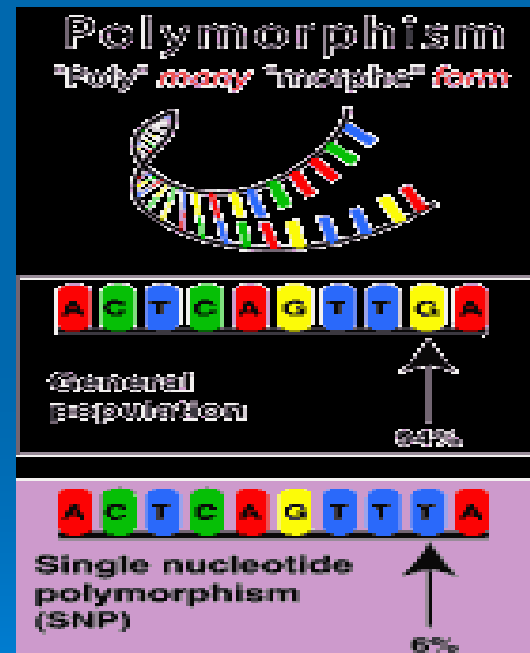
# *Linaria vulgaris* (Scrophulariaceae)



In *Linaria vulgaris* la simmetria del fiore è cambiata da bilaterale a radiale. Il mutante porta un difetto in *Lcyc*, un omologo del gene *cycloidea* che controlla l'asimmetria dorsoventrale in *Antirrhinum*. Il gene *Lcyc* è estensivamente metilato e trascrizionalmente silente nel mutante. La modificazione è ereditabile

Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. *An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry*. *Nature* 401, 157–161 (1999).

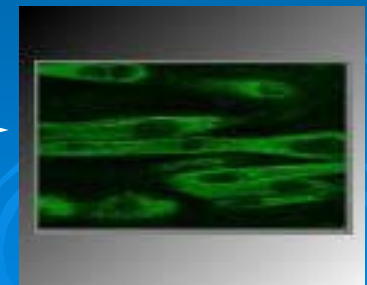
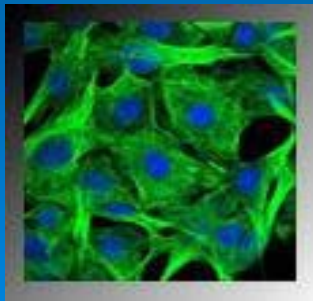
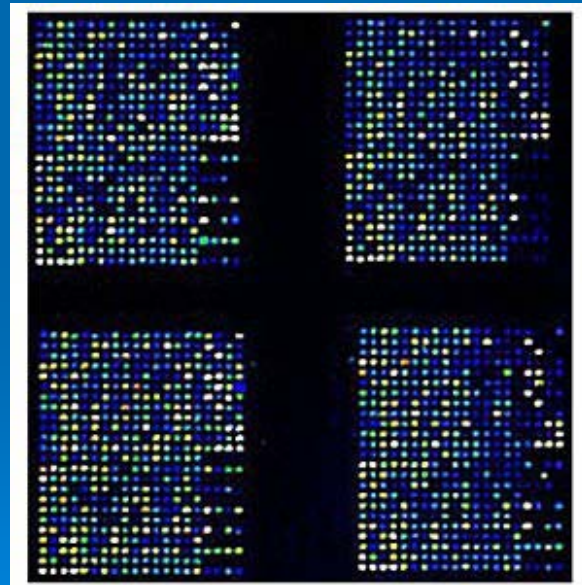
# Come si spiega la grande differenza fenotipica tra gli individui?



# ...e la differenziazione cellulare?

Le cellule di uno stesso individuo:

- stesso genoma
- differenti fenotipi
- differenti profili di espressione



La differenziazione cellulare dipende da cambi, che si realizzano nello sviluppo, nella espressione dei geni piuttosto che da modificazioni nella sequenza dei nucleotidi. Il mantenimento stabile, attraverso mitosi, è sotto controllo epigenetico.

Espressione cellula/tessuto specifica:

stimoli esterni  
ambiente  
fattori di trascrizione

EPIGENOMA

A diagram illustrating the relationship between external stimuli and the epigenome. On the left, the text 'stimoli esterni', 'ambiente', and 'fattori di trascrizione' is listed. A large white curly bracket on the right side of this text points towards the word 'EPIGENOMA' on the right. The background features several faint, concentric circular patterns resembling ripples in water.

# Epigenoma

- L'epigenoma decide quale gene deve essere "ON" oppure "OFF" in una singola cellula, determinando un segnale di espressione genica.
- L'epigenoma può essere ereditato da generazioni di cellule, salvando lo stesso programma genico o può cambiare (plasticità dell'epigenoma).

# Esistono molteplici livelli di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti

NUCLEO

DNA

**Meccanismi epigenetici:** controllo a lungo raggio mediante rimodellamento della struttura della cromatina

controllo trascrizionale: legame di fattori trascrizionali tessuto specifici, legame diretto di ormoni, fattori di crescita o elementi intermedi a elementi risponsivi di geni inducibili

Trascritto primario (precursore)

controllo post-trascrizionale: splicing alternativo, polyA alternativo, RNA editing tessuto-specifico

mRNA

controllo del trasporto

CITOPLASMA

controllo traduzionale

controllo della stabilità

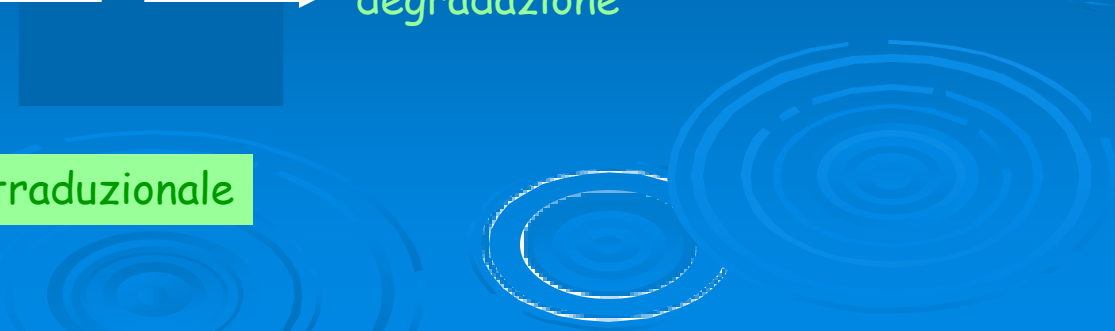
traduzione

degradazione

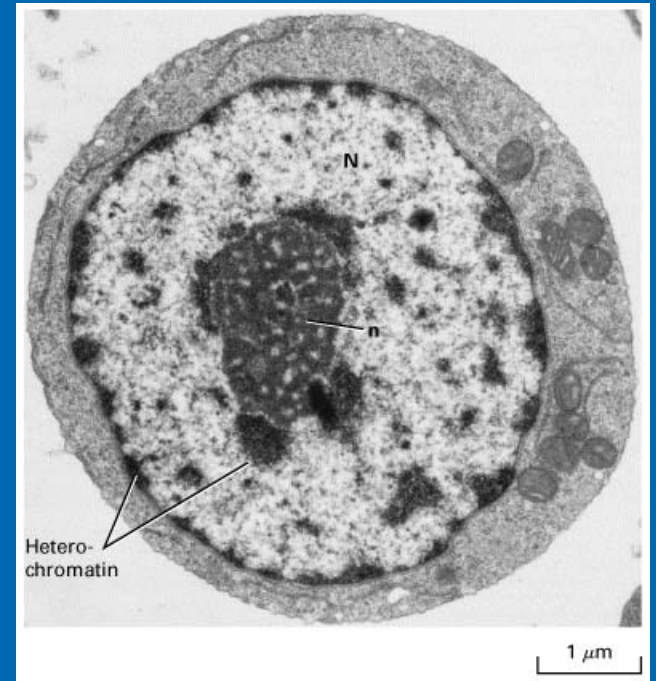
PROTEINA

controllo post-traduzionale

PROTEINA attiva o inattiva



# Cromatina



• EUCROMATINA → Trascrizione potenziale

a) geni housekeeping

b) geni tessuto-specifici

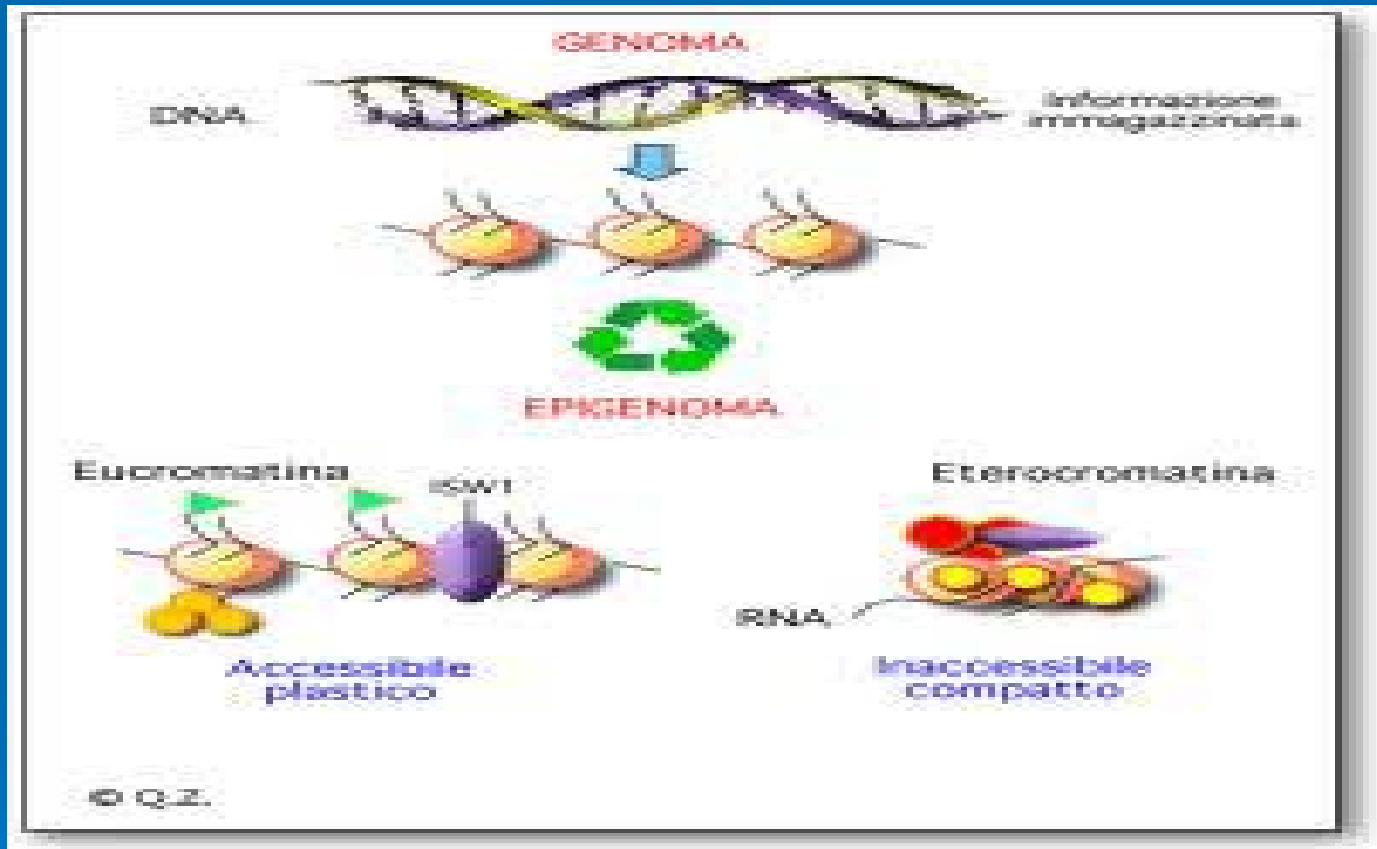
• ETEROCROMATINA FACOLTATIVA → Inattiva quando condensata.  
Fornisce un meccanismo di compensazione.

• ETEROCROMATINA COSTITUTIVA → Sempre inattiva.

• Localizzata nelle regioni peri - e centromeriche.

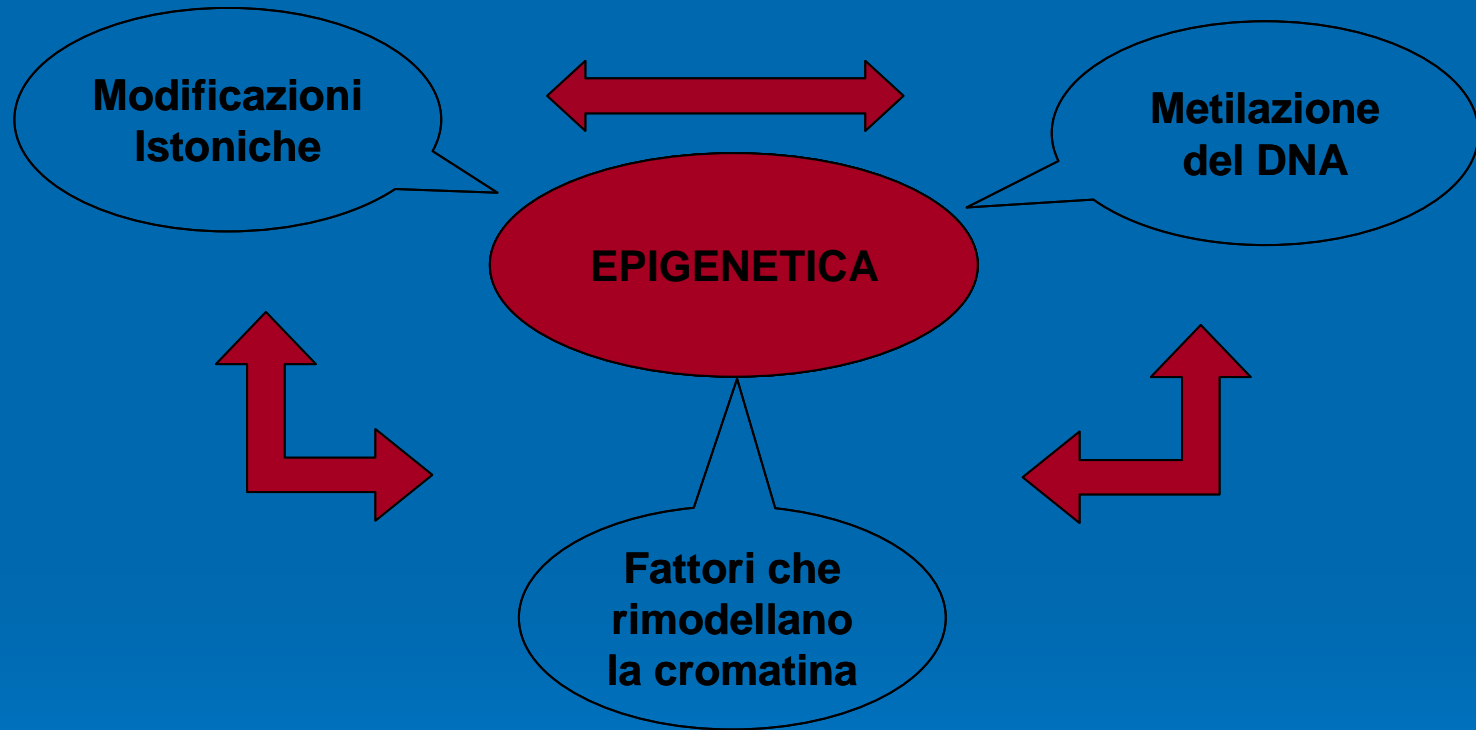


# Accessibilità del DNA



A seconda dell'impacchettamento della cromatina, i geni possono essere più o meno accessibili per la trascrizione, e quindi per la loro traduzione.

# Meccanismi di regolazione



L'espressione è fortemente influenzata da meccanismi interagenti con l'ambiente

# Meccanismi epigenetici

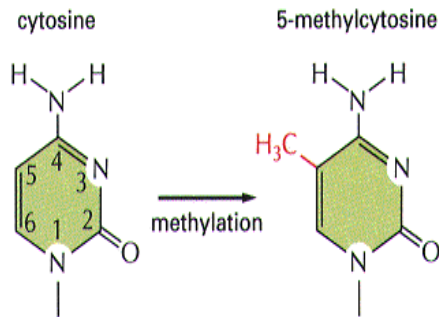
I meccanismi di regolazione dell'espressione epigenetici più importanti sono:

- metilazione del DNA
- modificazione degli istoni



# 1) Metilazione del DNA

## Methylation of CpG islands in DNA



From The Art of MBoC<sup>3</sup> © 1995 Garland Publishing, Inc.

- Avviene quasi esclusivamente a livello della citosina nei mammiferi, all'interno dei dinucleotidi CpG (isole) convertendo la citosina in 5-metilcitosina
- Nelle piante essa avviene anche a livello di CpNpG o CpNpN, dove N= A,T,C
- Dopo replicazione, l'enzima DNA metiltransferasi (DNMT) provvede al ripristino della segnatura metilica dei filamenti duplicati, garantendo così l'eredità epigenetica alle cellule figlie.

I residui metilati non sono distribuiti a caso lungo il genoma e le frequenze sono maggiori nel genoma delle piante (30%) rispetto a quelle dei mammiferi (4%).

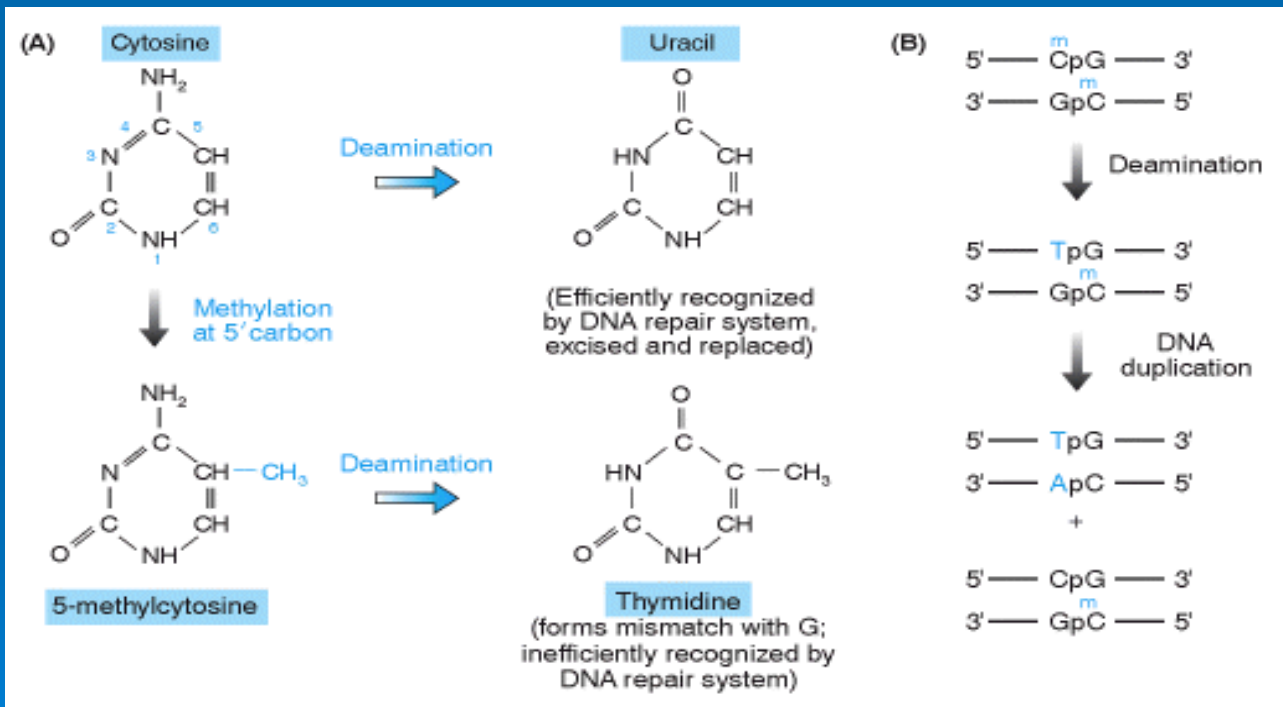
- La metilazione porta all'inibizione della espressione genica a livello trascrizionale
- Le metilazioni avvengono nella regione del promotore
- Meccanismo epigenetico meglio caratterizzato



Meccanismo coinvolto in:

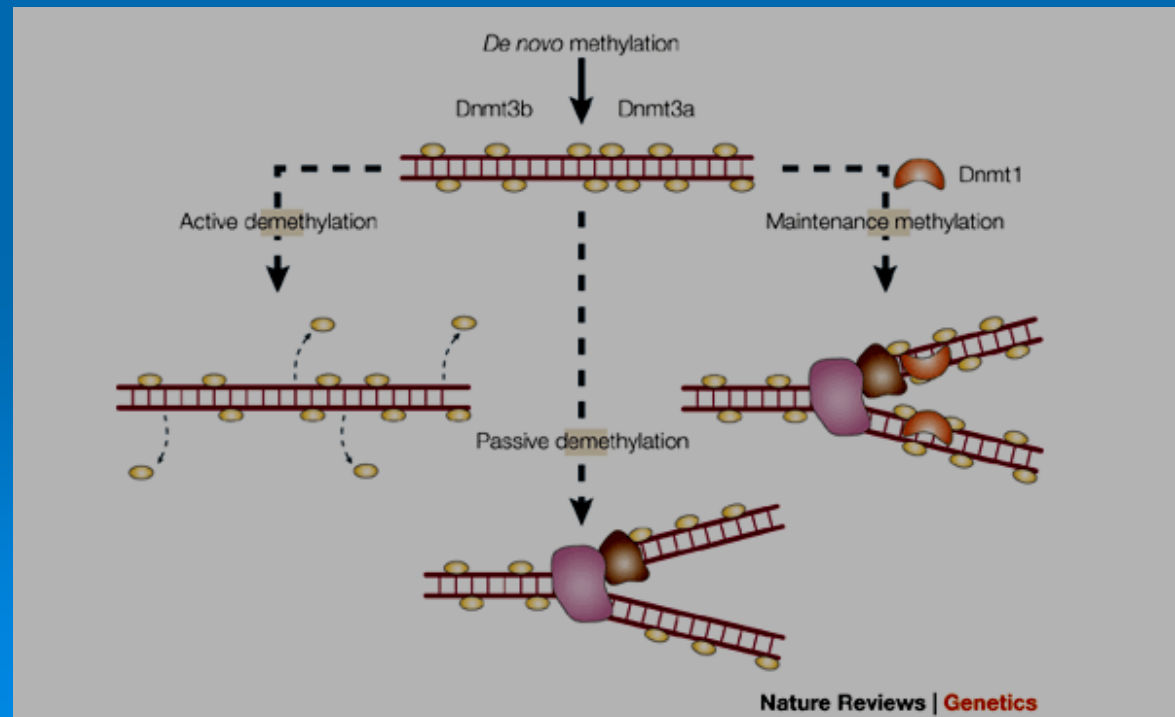
- Regolazione genica
- Struttura della cromatina
- Differenziazione cellulare → geni tessuto specifici sono metilati nei tessuti dove non vengono espressi
- Difesa da DNA estranei → la metilazione è fondamentale per mantenere silenti i genomi dei trasposoni e dei retrotrasposoni
- Fenomeni epigenetici → la metilazione contribuisce a stabilire e mantenere uno stato trascrizionalmente inattivo (eterocromatina)

# La 5-metilcitosina nelle sequenze CpG può essere deaminata e mutata in Timidina)

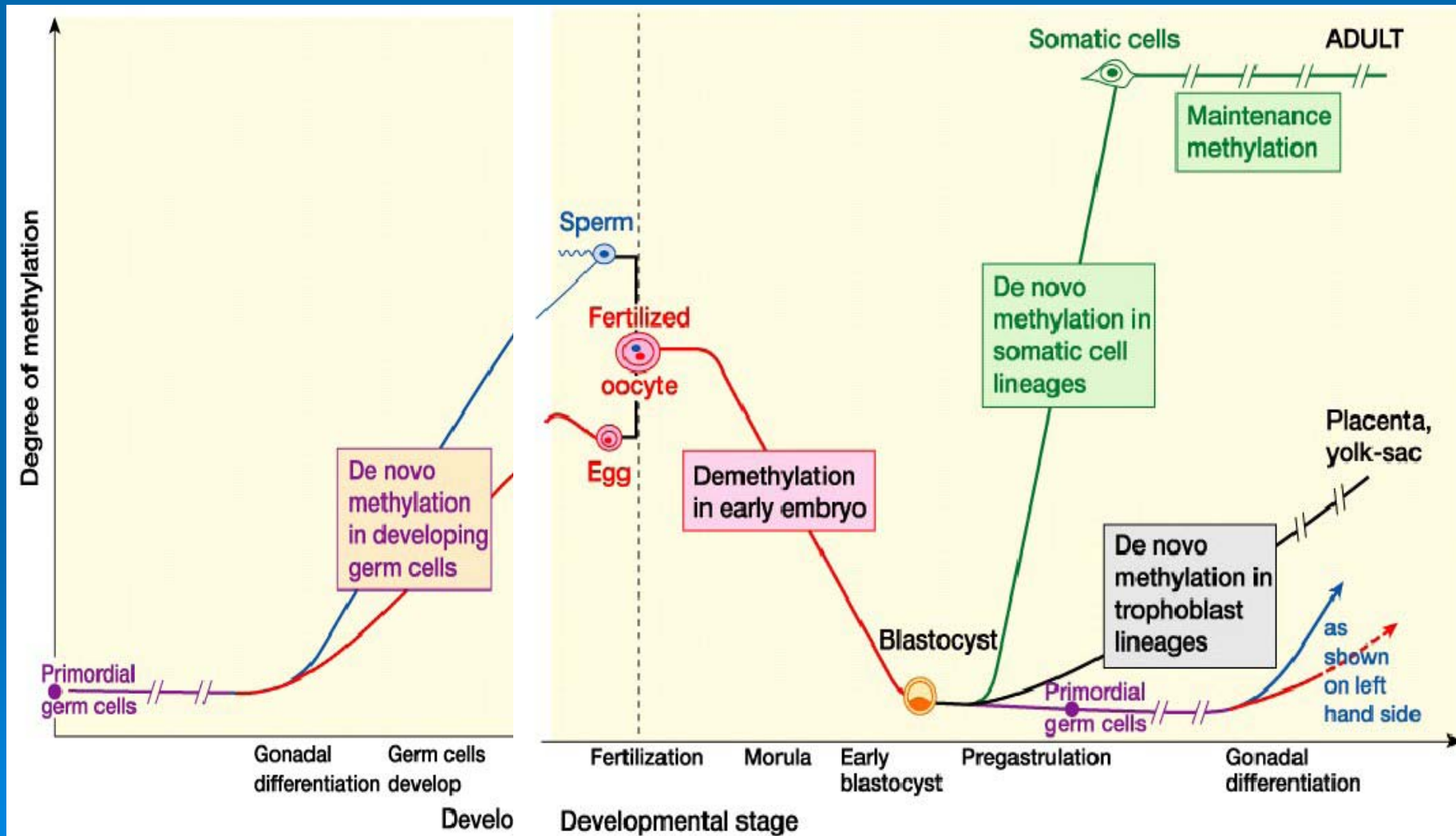


# Fasi di metilazione

- **Metilazione** differenziale *de novo* (**Dnmt3a** e **Dnmt3b**).
- **Mantenimento** della metilazione e **trasmissione** alle cellule figlie (**Dnmt1**).
- **Demetilazione** (natura sconosciuta, per ora, delle **demetilasi**).

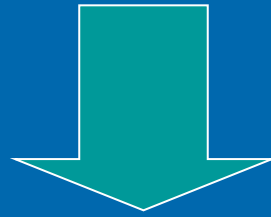


# La metilazione è regolata durante lo sviluppo





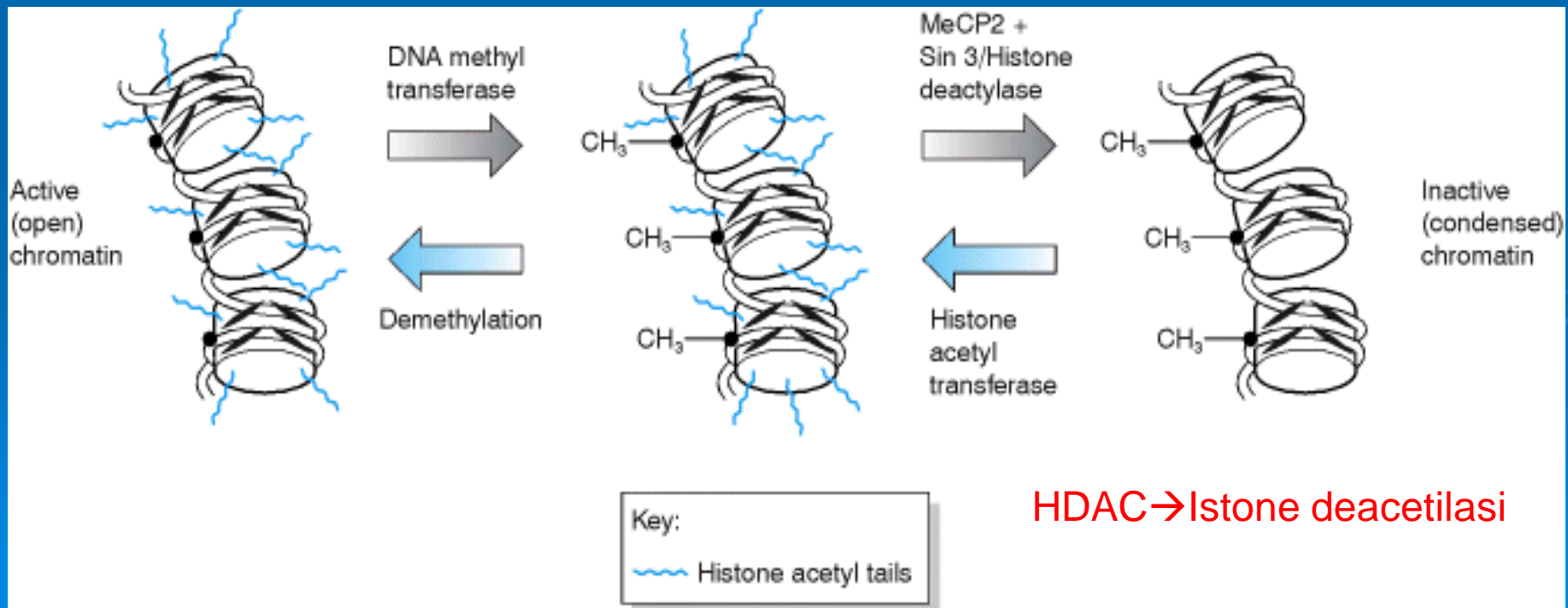
- Fino a poco tempo fa si credeva che il pattern dell'epigenoma si stabilizzasse nelle prime fasi dello sviluppo fetale
- Ma da studi recenti si è visto che esso cambia in risposta all'ambiente per tutta la vita dell'individuo.

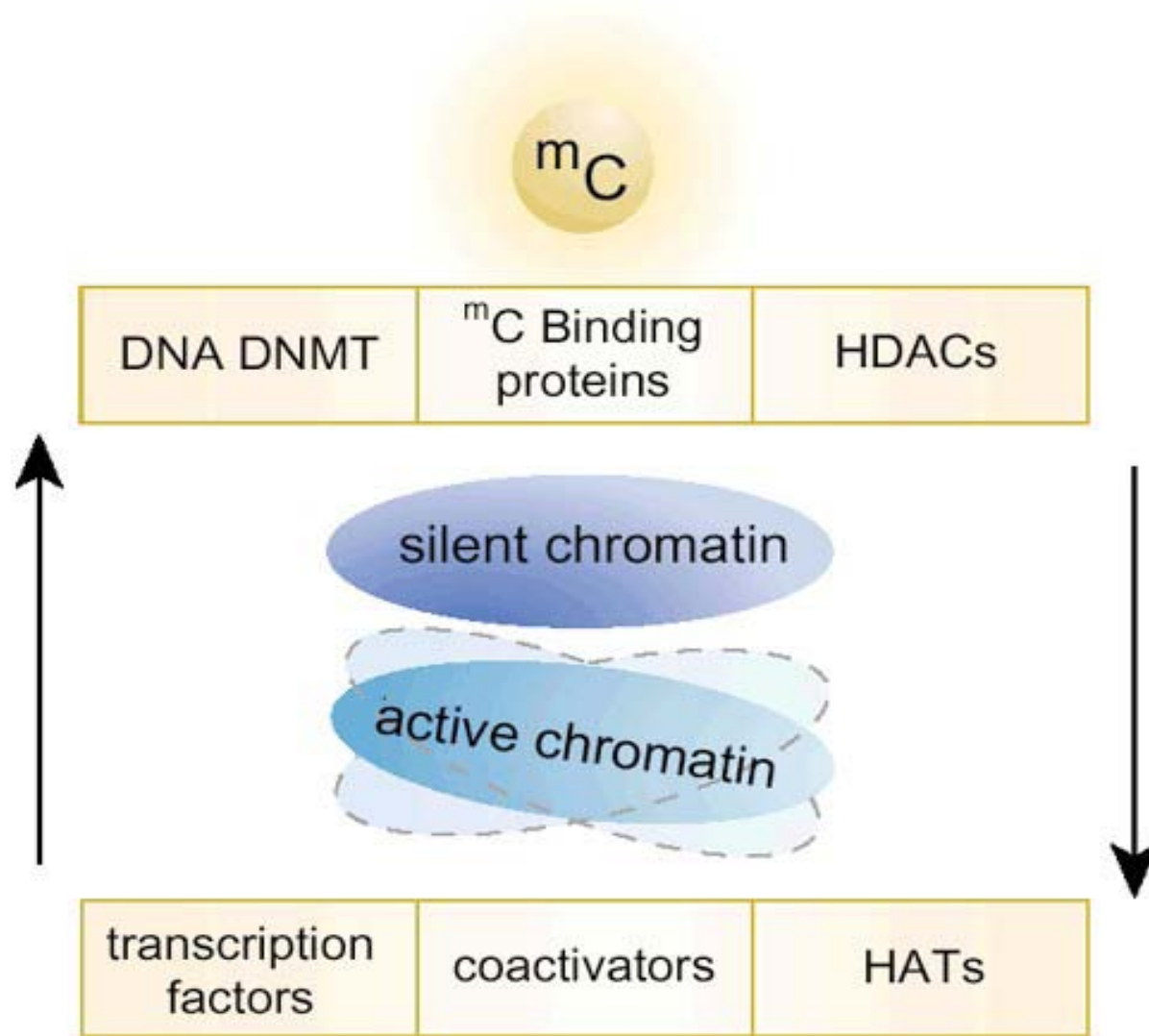


Spagna → uno studio ha preso in esame 80 coppie di gemelli monozigoti, maschi e femmine, con un *range* di età dai 3 ai 74 anni, di età media di circa 30 anni. I ricercatori hanno riscontrato differenze epigenetiche significative in circa un terzo delle coppie di gemelli, e che la discordanza cresceva con il crescere dell'età e con la diversificazione delle abitudini e degli ambienti di vita (Fraga, 2005)

# Metilazione e regolazione genica

- **Dnmt** metilano il DNA
- Il DNA metilato è legato da proteine che legano il metile (**MeCP2, MBD1-4**)
- Queste a loro volta sono in grado di reclutare diversi **HDAC** → repressione della trascrizione



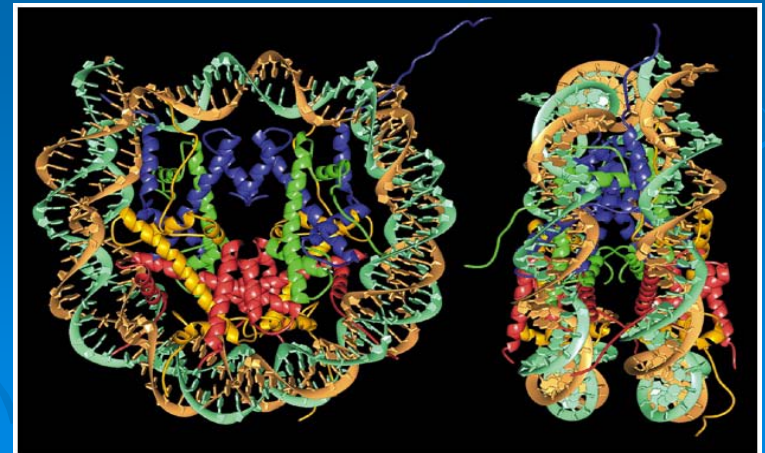


## 2) Modificazione istoniche

La cromatina presenta diversi gradi di compattamento, la cui conformazione è regolata da una serie di modificazioni dei residui amminoacidici nelle code istoniche.

Le modificazioni possono essere di varia natura:

- Acetilazione e/o deacetilazione
- Metilazione
- Fosforilazione
- Ubiquitinazione



# Modificazioni istoniche

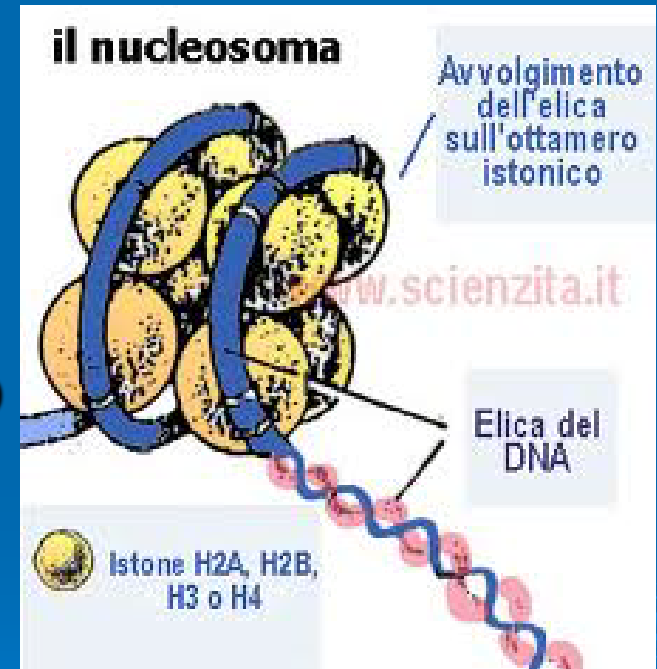
Queste modificazioni sono promosse da specifici enzimi e facilitano la trascrizione di un gene, la sua inibizione o altri meccanismi. Ad esempio si è visto che l'acetilazione, rendendo la cromatina più accessibile, favorisce la demetilazione\*.



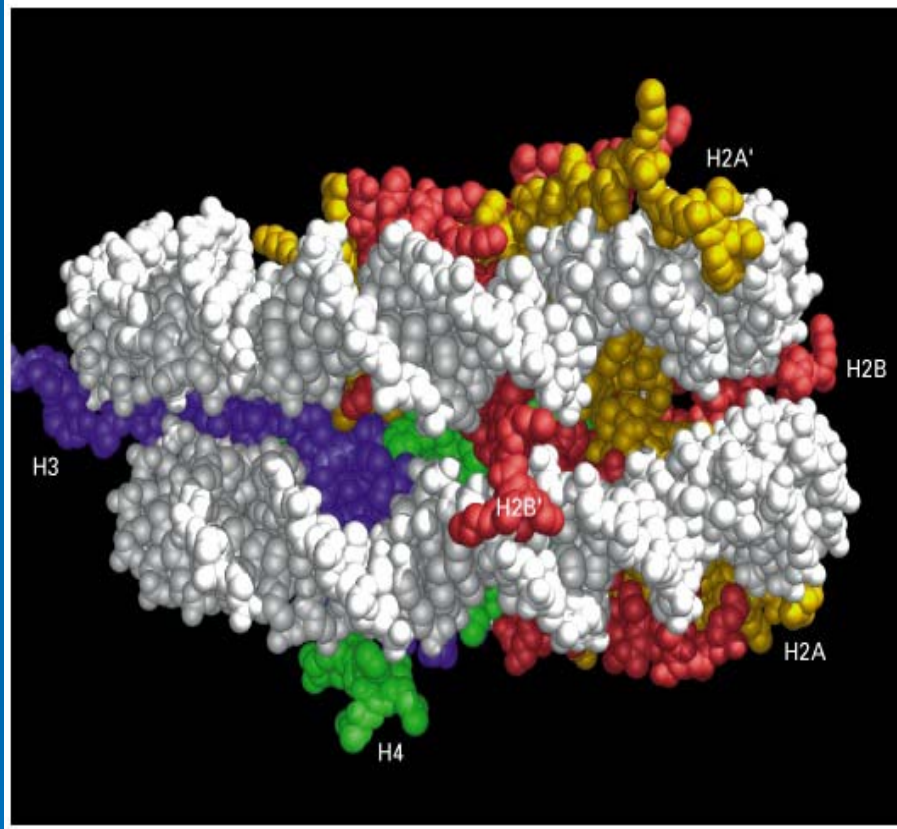
\*Szif,McGowan,Meaney 2008

# Modificazioni istoniche

Istone → Proteine associate ai cromosomi tipiche degli eucarioti. Poiché presentano aa come lisina e arginina sono cariche positivamente e in grado perciò di interagire con i gruppi fosfato negativi del DNA, formando strutture chiamate nucleosomi. Queste strutture permettono l'impacchettamento del DNA all'interno del nucleo.



# Categorie delle modificazioni covalenti



## Modificazioni:

**Arg:** Mono- & Di-metilazione

**His:** Fosforilazione (H4)

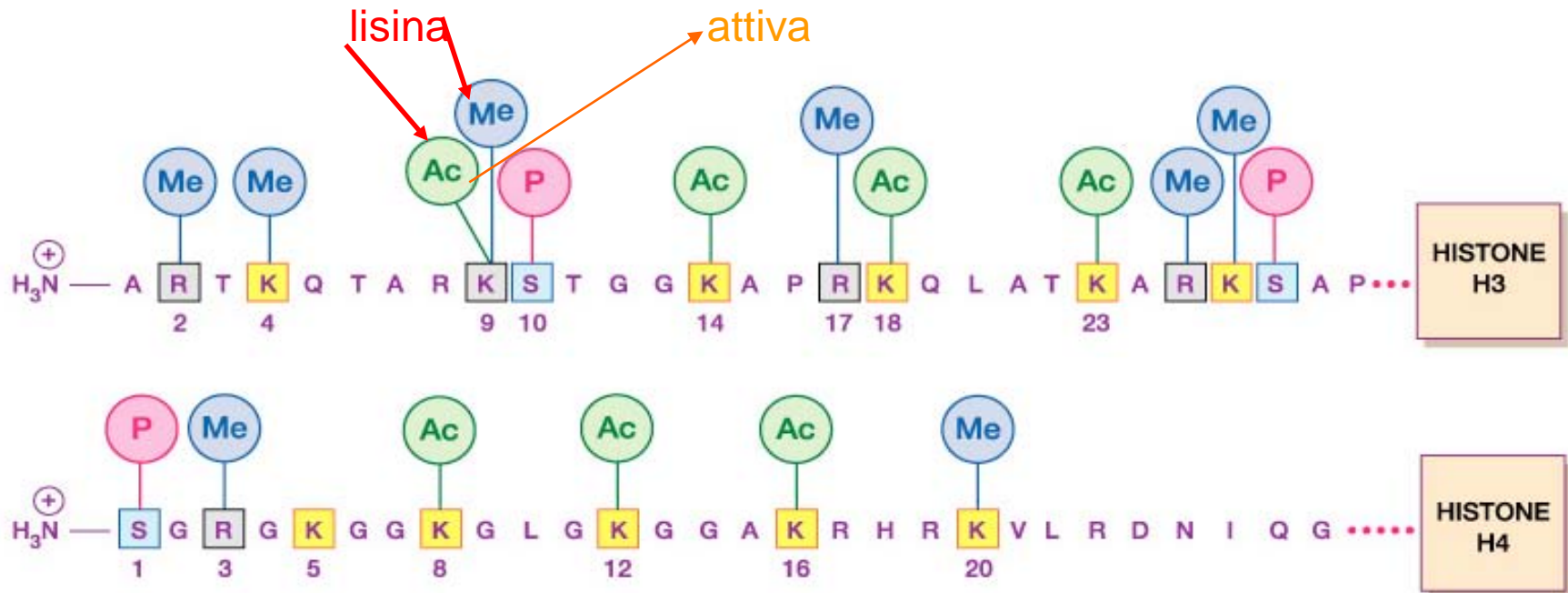
**Lys:** Acetilazione; Mono-, Di & Tri-metilazione; Ubiquitinazione;

**Ser/Thr:** Fosforilazione

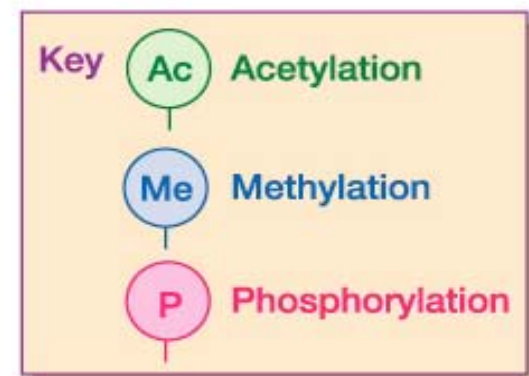
## “Histone Code”: ipotesi

La modificazione della coda degli istoni agisce come segnale che può essere letto da altre proteine che controllano l'espressione o la replicazione di regioni cromosomiche.

# Modificazioni degli istoni H3 e H4

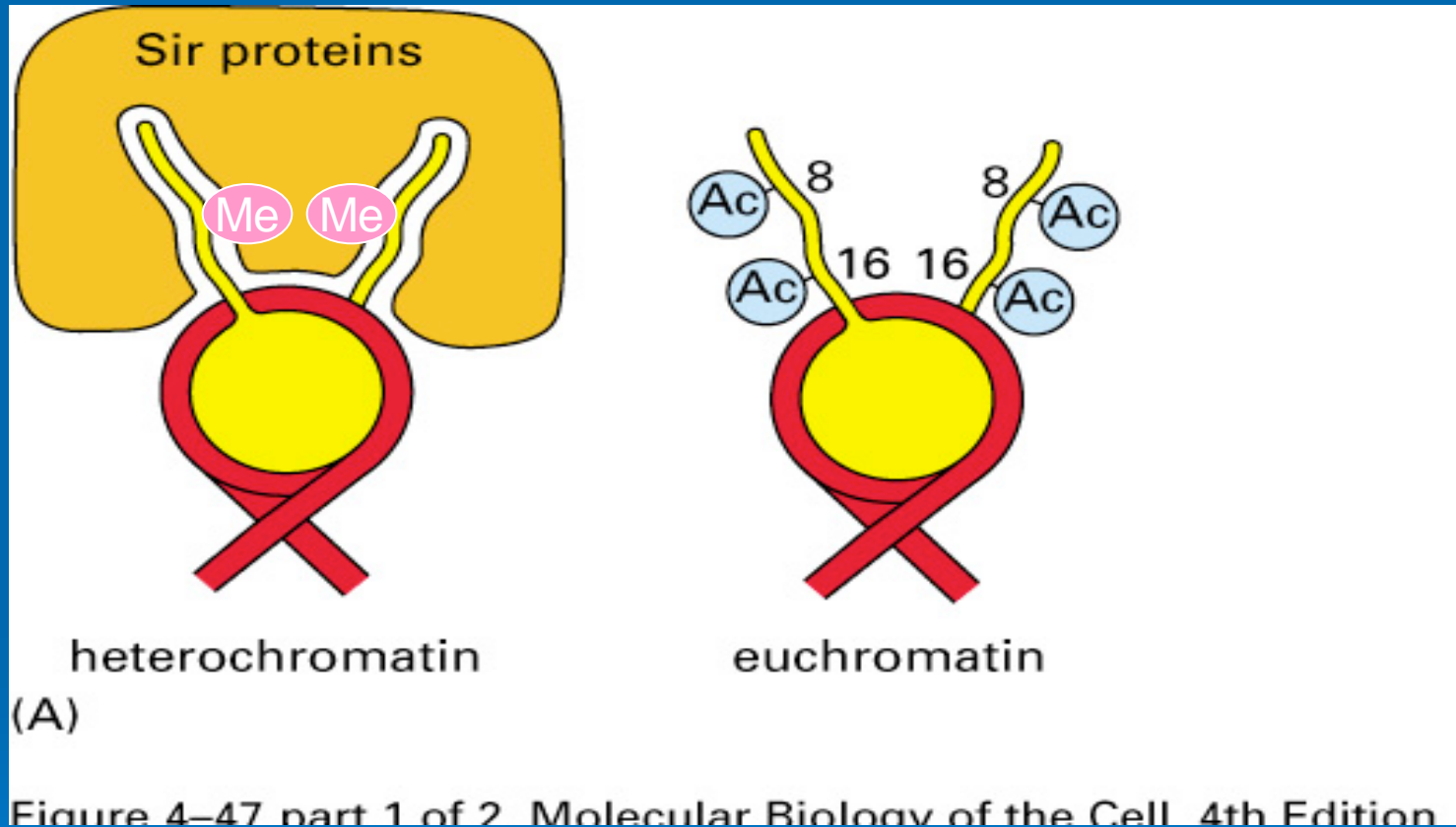


La lisina 9 di H3 (k9H3) può essere sia acetilata che metilata. L'**acetilazione** è associata alla **cromatina trascrizionalmente attiva**, ma se la **regione** cromatinica viene **metilata a livello del DNA** (CpG), le **proteine** che si **legano al DNA metilato** richiamano le **deacetilasi istoniche**, che rimuovono i gruppi acetile e le **metil transferasi istoniche**, legate alle CpG binding protein, **metilano gli istoni**. Il risultato è la **condensazione** della cromatina.





Le modificazioni delle code istoniche sono importanti per il successivo assemblamento di fattori di eterocromatinizzazione

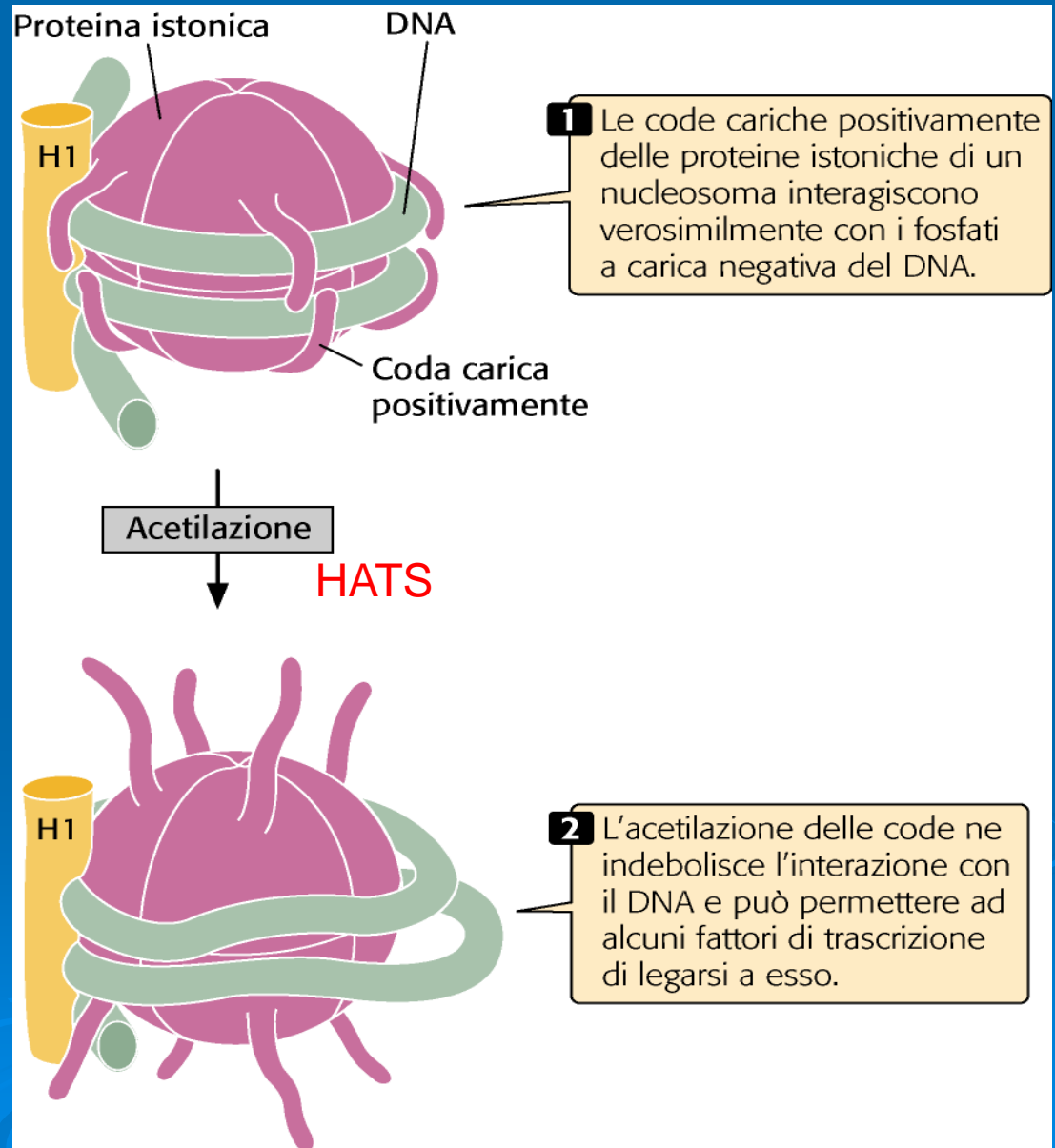


Nelle cellule umane, la proteina HP1 si lega alle code dell'istone H3, metilato a livello della lisina 9

# Acetilazione istonica

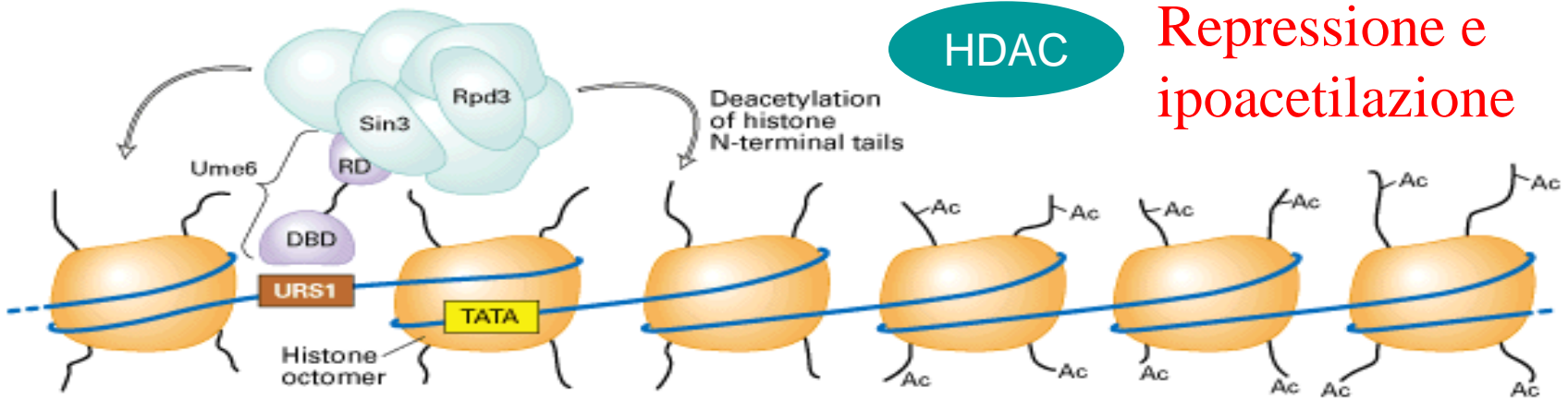
L'acetilazione degli istoni è associata alla decondensazione della cromatina. Ne favorisce quindi la trascrizione.

**HATs** → Histone acetyl-transferase

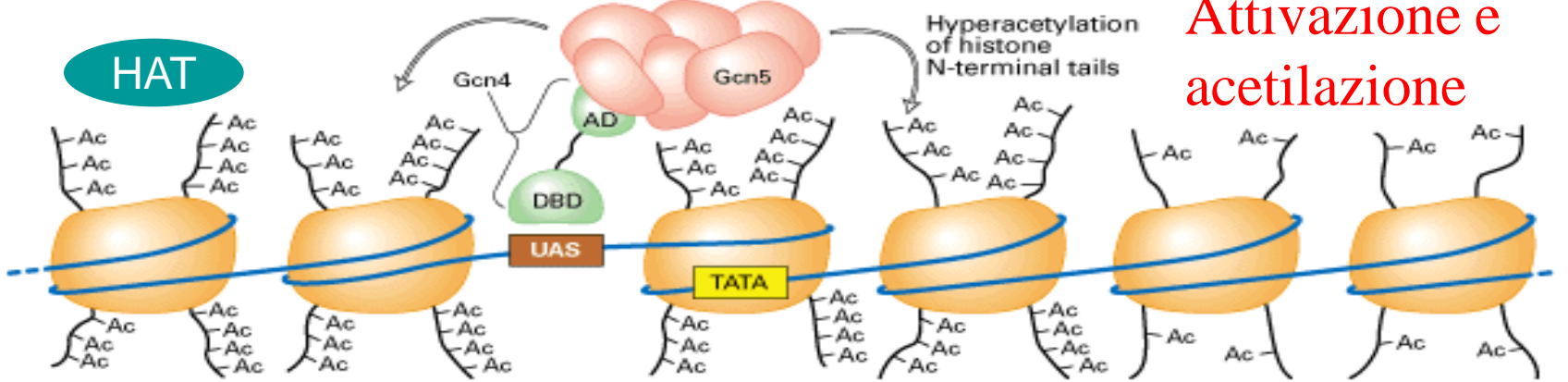


# Attivazione della trascrizione e acetilazione degli istoni

(a) Repressor-directed histone deacetylation



(b) Activator-directed histone hyperacetylation



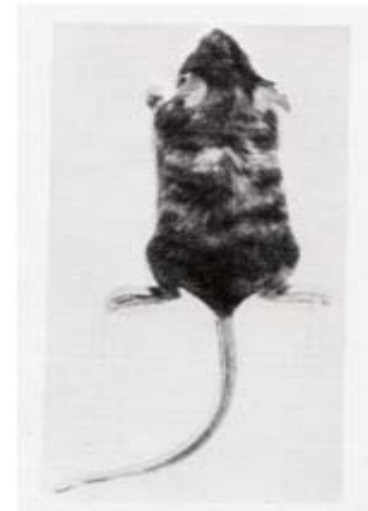
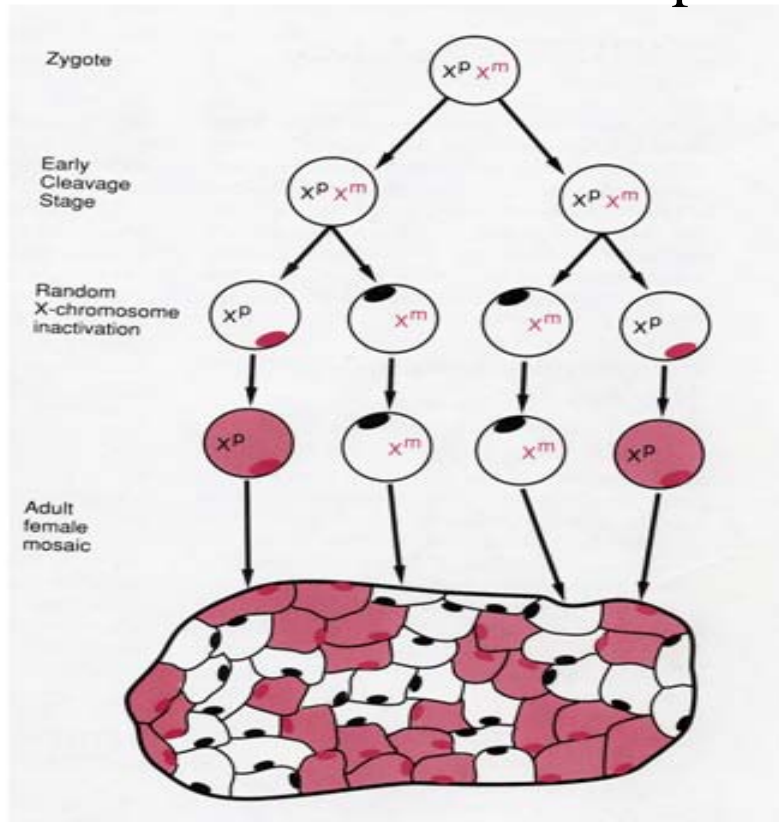
Repressori e attivatori possono dirigere la deacetilazione/acetilazione degli istoni a livello di specifici geni

# Imprinting genomico

- Meccanismo di esclusione allelica, per cui uno dei due alleli di un gene viene escluso selettivamente dall'attivazione, in dipendenza del genitore, da cui il cromosoma recante l'allele è stato ricevuto
- Meccanismo attivato solo per un certo locus
- Trovato in piante, mammiferi e in alcuni insetti
- Può essere di origine materna o paterna, e sembra dovuto a fenomeni di metilazione del DNA e modificazioni istoniche
- Meccanismo di memoria cellulare

# Imprinting: inattivazione del cromosoma X

L'X inattivo ha DNA ipermetilato e istoni ipoacetilati



**Essenziale per il dosaggio dell'espressione genica:**

- Perdita dell'allele non soggetto ad imprinting → assenza della proteina
- Perdita dell'imprinting (LOI) → livello di proteina doppio rispetto al normale

# Epigenetica: evidenze

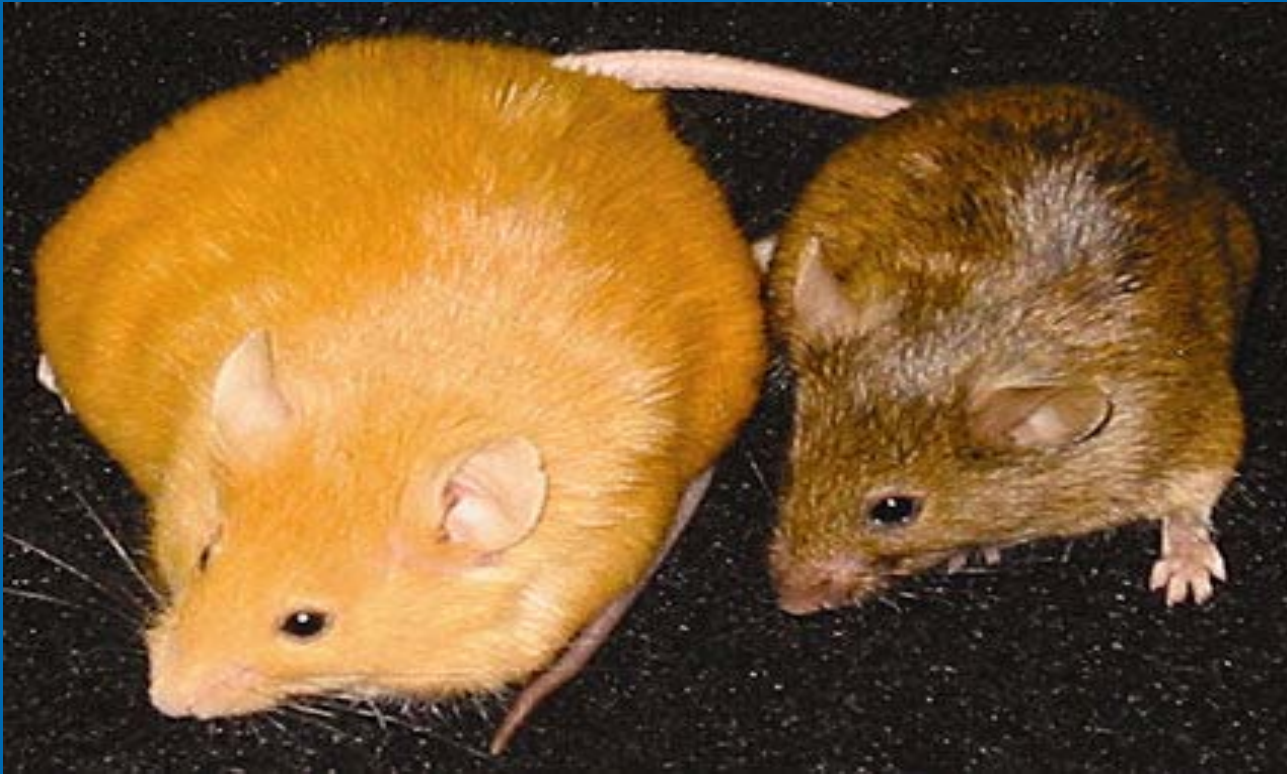
- *Linum usitatissimum* → trattamenti con fertilizzanti portano ad una diversificazione fenotipica, che vengono stabilmente ereditati dalla progenie (Durrant, 1962)  
Analisi recenti sembrano suggerire una correlazione tra il numero di copie delle sequenze ripetute e le differenze indotte ma il meccanismo molecolare rimane incompreso (Cullis, 2005)
- *Nicotiana rustica* → differenze ereditabili sono state osservate dopo una sola generazione in piante cresciute sotto speciali condizioni nutrizionali (Hill, 1965)

# Epigenetica e alimentazione

Esperimenti su topi femmine aguti incinte →  
alimentazione a base di alimenti con  
donatori di metili (aglio, cipolla,  
barbabietole)

Gene **aguti** → tipicamente la progenie è identica ai genitori nella maggior parte dei casi → PELO GIALLO, OBESITA', PRED. **CANCRO** e **DIABETE**

La progenie di topi femmine alimentate in questo modo  
presentavano fenotipi  
normali marroni e minor predisposizione alle malattie, con una  
vita media più  
lunga rispetto al controllo.



Le madri passano alle progenie il gene aguti intatto,  
ma il pattern di metilazione cambiato  
ne oscura gli effetti deleteri  
(R.Jirtle & R.Waterland, 2000)



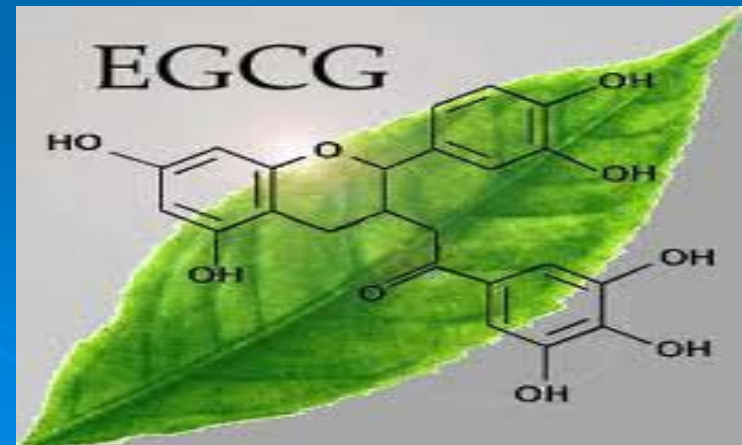
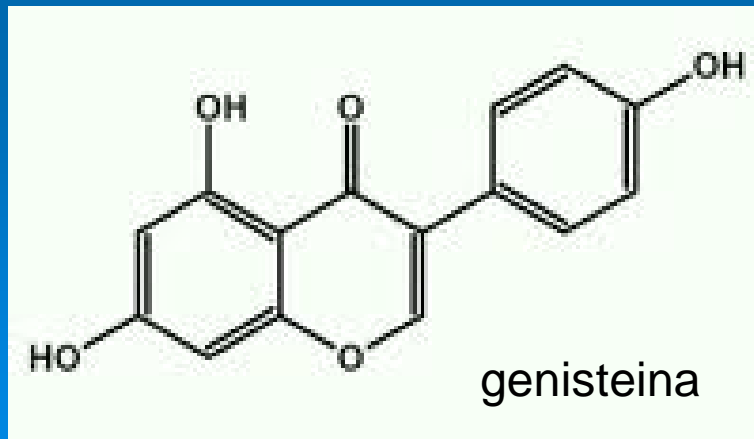
# Effetti epigenetici del tè verde

(M.Z. Fang et al., 2003)

tè verde → previene la crescita di tumori in molti tipi di organi

**EPIGALLOCATECHINA** può prevenire la metilazione degli interruttori per l'accensione o lo spegnimento di geni cancerogeni noti

**GENISTEINA** in soia → stessi effetti epigenetici



# Due secoli di studi:

M. Pembrey & L.O.Bygren, 2005

Studio condotto sulla correlazione di disponibilità di cibo e malattie in una popolazione isolata del nord della Svezia

È stato visto che nonni che avevano vissuto l'infanzia in periodi di abbondanza delle risorse alimentari avevano più facilmente nipoti maschi affetti da diabete. Lo stesso valeva per le nonne con le nipoti femmine.

Il rischio di sviluppo di patologie era legato a tratti sesso specifici, quindi legato a cromosomi X e Y

Periodo in cui i nonni/e erano stati sottoposti a surplus era cruciale:

Nonne → surplus subito in utero o nella prima infanzia

Nonni → surplus subito nella fase prima dell'adolescenza

# Noci di betel

Chen et al.(2006) hanno dimostrato in uomini di Taiwan il consumo regolare di semi di una palma (*Areca catechu*) li predispone al diabete di tipo 2, e che l'alterazione epigenetica è trasmessa per via paterna



# Epigenetica e ereditabilità

Lo studio condotto per determinare l'azione del fungicida **vinclozolina** su femmine di topo incinte, ha mostrato un effetto epigenetico indotto tramandato per almeno quattro generazioni

Il fungicida agisce diminuendo la capacità spermatica nella progenie dei topi trattati: >90% dei maschi delle generazioni successive ( $F_1$ - $F_4$ ) affetti.

Non riscontrate mutazioni, ma differenti pattern di metilazione di derivazione paterna

( M.Skinner et al., 2004; Anway et al.,2005)

- Quando il crostaceo *Daphnia pulex* è esposto a predatori sviluppa spine difensive → l'effetto può durare per diverse generazioni



Ereditabilità transgenerazionale dimostrata da questi studi

Studi condotti usando inibitori della metilazione come:

- 5-azacitidina → AzaC
- 5-azadeossicitidina → AzadC

Hanno dimostrato ereditabilità di ipometilazione in diverse specie vegetali:

Riso (kumpatla et al., 1997)

Lino (Fieldes, 1994)

Tabacco (Vyscot, 1995)

Brassica (King, 1995)

Melandrium (Jahousek, 1996)

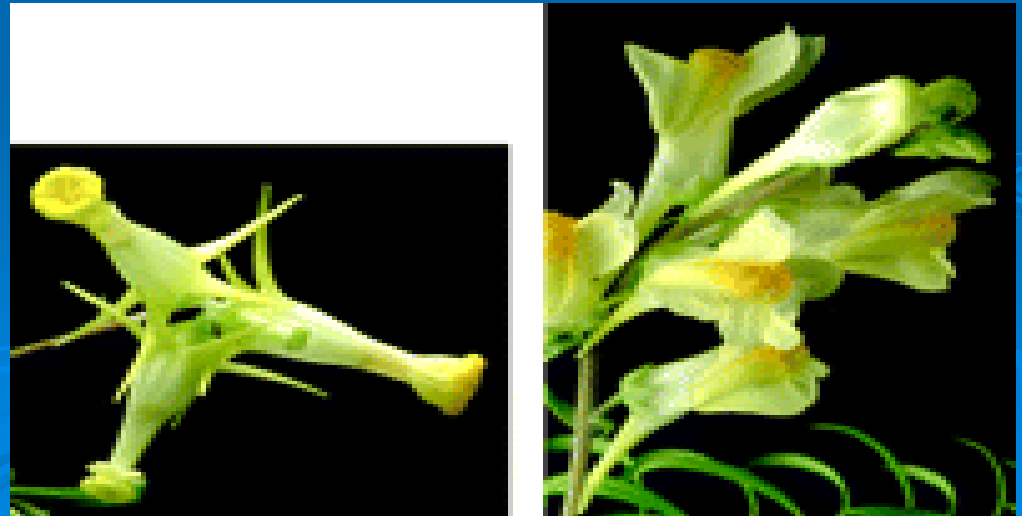
Triticale (Amado, 1997)



In alcuni casi, sono stati osservati cambiamenti fenotipici ereditabili

# *Linaria vulgaris*

- Isolato un mutante naturale che presenta diversa simmetria dello sviluppo florale
- Il gene *Lcyc*, responsabile dello sviluppo del fiore, nei mutanti risulta essere pesantemente metilato e quindi silenziato, mentre nel tipo selvatico (*WT*) è demetilato.



# *Oryza sativa sp. japonica* (Keiko et al. 2007)

- Di 1000 semi trattati con l'ipometilante AzadC solo 35 sono arrivati a germinazione → la demetilazione nella maggior parte dei loci porta a cambiamenti letali
- Il trattamento ha indotto cambiamenti fenotipici evidenti a maturità, ereditabili stabilmente → linea 2 → affetta da nanismo
- Il pattern di metilazione analizzato nei loci noti non si differenziava tra *WT* e Linea 2 nana.
- Sono stati identificati 6 frammenti di regioni differenzialmente metilate, di cui 2 sono state analizzate in dettaglio: HMF2 e HMF5



# HMF2: hypomethylated fragment 2

- Localizzato nella sequenza codificante per la poliproteina gag-pol, che costituisce la parte LTR di un retrotrasposone
- Esso risulta completamente demetilato, non solo nelle CpG, ma anche in CpNpG e CpNpN
- Solitamente la demetilazione porta alla riattivazione del retrotrasposone, ma in questo caso non si è vista traslocazione in nessun campione → demetilazione non è sufficiente per la riattivazione trasposonica
- Il pattern è ereditato stabilmente

# HMF5

- Fa parte di un gene per una putativa Xa21G → in riso è un gene codificante per un recettore del tipo chinasi, coinvolto nella resistenza contro batterio patogeno
- La demetilazione porta all'espressione costitutiva nella linea 2 mentre il gene è costitutivamente silenziato nel *WT*
- Le linee 2 hanno mostrato una maggior resistenza all'infezione in quanto presentavano lesioni ridotte nelle dimensioni di circa 1/3 rispetto al *WT* → ha acquisito tratti di resistenza alla malattia, a causa dell'attivazione di Xa21G

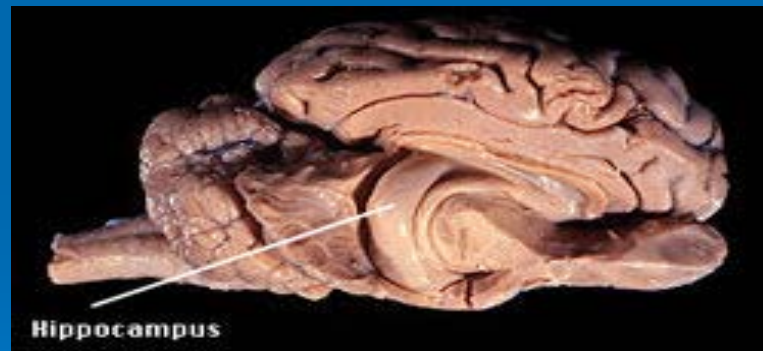
Questo studio dimostra che il silenziamento costitutivo dei geni, dovuto a ipermetilazione, può essere trascrizionalmente attivato dalla demetilazione, risultando in fenotipi nuovi, e che i cambiamenti fenotipici ed i pattern di metilazione possono essere ereditati stabilmente



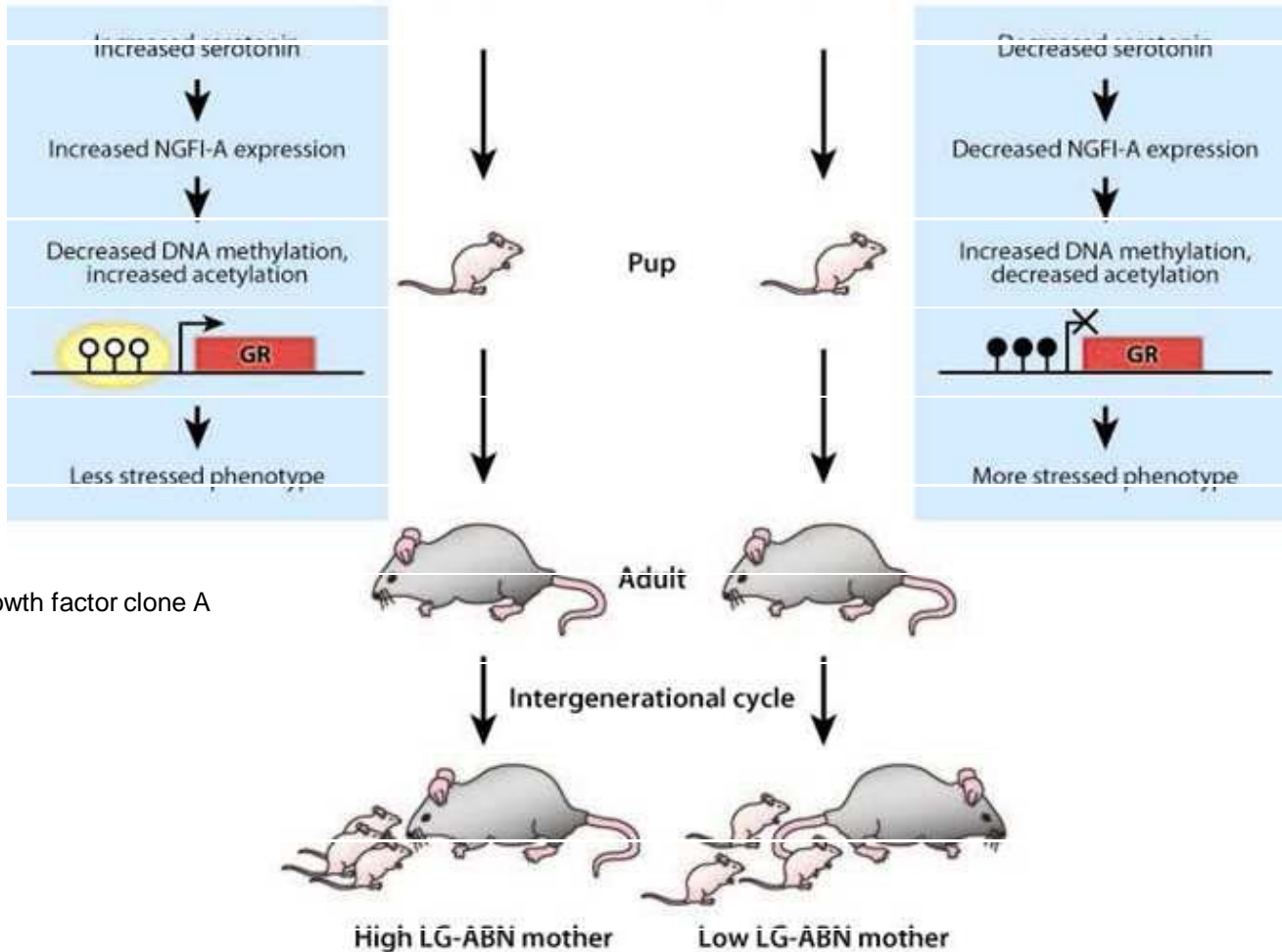
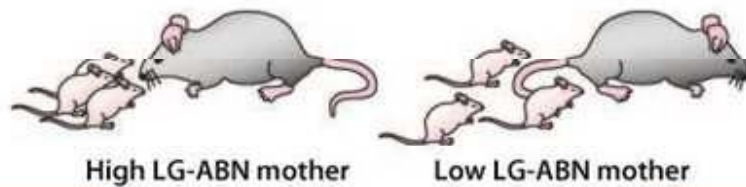
# Epigenetica e comportamento

Studi centrati sulle relazioni materne e ambientali delle prime fasi dello sviluppo e l'assetto dell'asse dello stress dei giovani ratti oggetto delle sperimentazioni.

Cuccioli allevati da madri poco premurose rispetto ad altri allevati da madri premurose, presentavano un'ipermetilazione a livello della citosina e degli istoni del promotore del gene del recettore per i glucocorticoidi (GR) dell'ippocampo.



Nello sviluppo questi animali presentavano una alterazione della risposta di Stress rispetto a ratti allevati con maggiore cura, e le femmine di animali, allevati da madri poco amorevoli, presentavano lo stesso epigenoma delle madri e quindi riproducevano lo stesso comportamento poco amorevole sui loro figli.



NGFI-A → nerve growth factor clone A

Younison NA, Whitelaw F. 2008

Alta cura → alta seratonina → alto NGFI-A → gene per cortisolo attivo → buona risp. Stress  
 Bassa cura → bassa seratonina → basso NGFI-A → bassa [cortisolo] → bassa risp. Stress

Nelle cellule del tessuto cerebrale si sono trovati diversi pattern di metilazione/ acetilazione che si sono dimostrati essere ereditabili alle generazioni successive

Infusione centrale di un inibitore dell'acetilasi istonica (tricostatina A) rimuoveva le differenze epigenetiche del gene del recettore del cortisolo, e converte i fenotipi l'uno nell'altro.

**TRICOSTATINA-A**



**Elevata attitudine a leccare e accudire**

**- Acetilazione  
+ Metilazione**



**Scarsa attitudine a leccare ed accudire**

# Epigenetica e cancro

Table 1 Epigenetic diseases

Disease	Symptom	Aetiology	References
ATR-X syndrome	Intellectual disabilities, $\alpha$ -thalassaemia	Mutations in <i>ATR-X</i> gene, hypomethylation of certain repeat and satellite sequences	82
Fragile X syndrome	Chromosome instability, intellectual disabilities	Expansion and methylation of CCG repeat in <i>FMR1</i> 5' UTR, promoter methylation	83
ICF syndrome	Chromosome instability, immunodeficiency	<i>DNMT3b</i> mutations, DNA hypomethylation	84
Angelman's syndrome	Intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (maternal)	85
Prader-Willi syndrome	Obesity, intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (paternal)	86
BWS	Organ overgrowth	Deregulation of one or more imprinted genes at 11p15.5 (e.g. <i>IGF2</i> )	87
Rett syndrome	Intellectual disabilities	<i>MeCP2</i> mutations	25,26
$\alpha$ -Thalassaemia (one case)	Anaemia	Methylation of $\alpha 2$ -globin CpG island, deletion of <i>HBA1</i> and <i>HBD1</i>	23
Various cancers	Microsatellite instability	<i>De novo</i> methylation of <i>MLH1</i>	29
	Disruption of Rb, p53 pathway, uncontrolled proliferation	<i>De novo</i> methylation of various gene promoters	4
	Disruption of SWI-SNF chromatin remodelling complex	Mutations in <i>SMF5</i> , <i>BRG1</i> , <i>BRM</i>	96
	Overexpression of <i>IGF2</i> , silencing of <i>CDKN1C</i>	Loss of imprinting	88, 89
Leukaemia	Disturbed haematopoiesis	Chromosomal translocations involving HATs and HMTs	62
Rubinstein-Taybi syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in CREB-binding protein (histone acetylation)	90
Coffin-Lowry syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in <i>Rsk-2</i> (histone phosphorylation)	90

ATR-X syndrome,  $\alpha$ -thalassaemia, mental retardation syndrome, X-linked; BWS, Beckwith-Wiedemann syndrome; CREB, cAMP-response-element-binding protein; HAT, histone acetyltransferase; HMT, histone methyltransferase; ICF, Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome; UTR, untranslated region.

# Epigenetica e cancro

- Il pattern di metilazione dei geni è alterato nelle cellule tumorali, e la metilazione alle isole CpG di certi geni è associata al loro silenziamento specifico con regolazione aberrante di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, del differenziamento e/o dell'apoptosi

**Table 2 • Possible consequences of changes in genomic methylation on selective advantages leading to tumor outgrowth**

Change in methylation status	Possible consequences	Mechanism	References
Hypermethylation	A. Epigenetic: silencing of tumor suppressor genes, biallelic expression of imprinted growth factors	<i>De novo</i> methylation of CpG islands, silencing of imprinted genes that inhibit growth factor activation ( <i>H19</i> )	129,135,183
	B. Genetic: increase in point mutations	C→T transitions caused by spontaneous or by DNMT-mediated deamination	134
Hypomethylation	A. Epigenetic: protection against intestinal tumors	Demethylation may cause activation, inhibit silencing of suppressor genes	184
	B. Genetic: genomic instability	Altered mitotic recombination (LOH)	138,139



# HAT/HDAC

## **HAT (Istone acetiltransferasi):**

- Geni codificanti per diverse HAT si trovano traslocati, amplificati, sovraespressi e/o mutati in diversi tumori

## **HDAC (istone deacetilasi):**

- coinvolgimento in linfomi e leucemia acuta mieloide dimostrata

- **Oncogeni:** geni che possono causare il cancro quando espressi in modo eccessivo o inappropriato

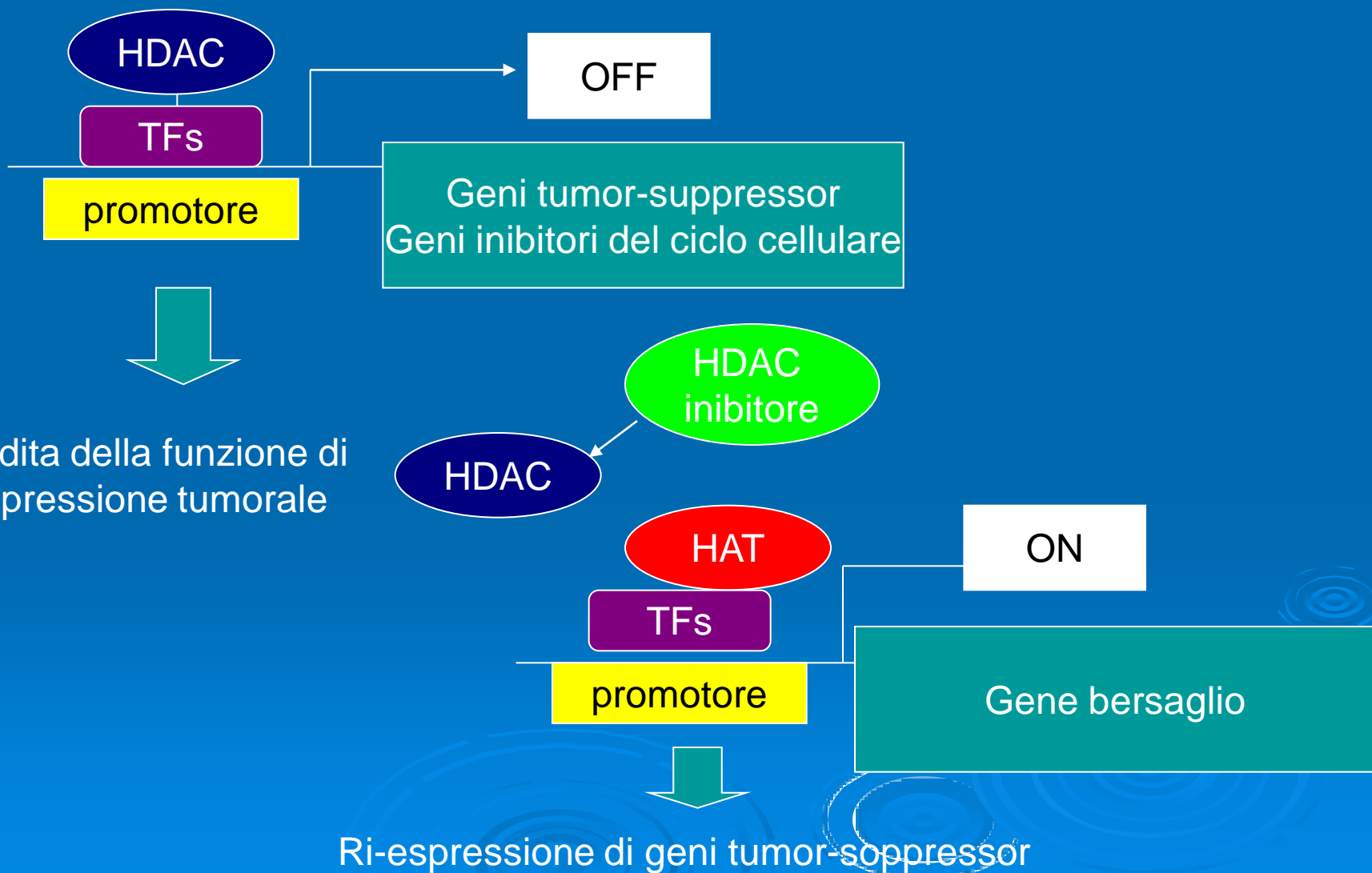
In genere: geni che stimolano la crescita cellulare

- **Oncosoppressori:** geni la cui mancanza (per delezione o mutazione) può causare il cancro

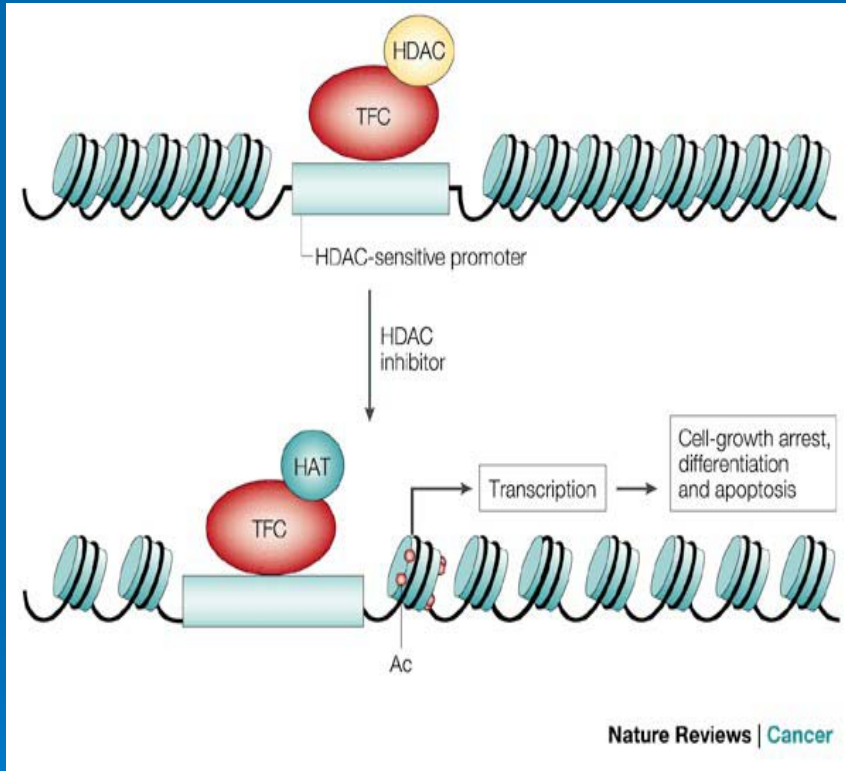
In genere: geni che reprimono la crescita o causano la morte cellulare

Da studi di Szyf *et al.* è stato visto che quando i geni oncosoppressori sono metilati, il tumore darà origine a metastasi. Allo stesso modo quando geni oncogeni sono demetilati, questi causano la crescita del tumore.

# Terapia epigenetica



# Inibitori delle HDAC: una nuova terapia anti-cancro



Inibitori tipo Tricostatina A e butirrato causano:

- Arresto del ciclo cellulare
- Differenziamento
- Apoptosi

→ documentato effetto di modulatori epigenetici in tutti i tipi cellulari trasformati

**Cooperatività** con 5-aza-2'-desossicitidina → ipometilazione e riattivazione di 'tumor suppressors' silenziati

# Conclusioni

1. Epigenoma → software plastico della espressione genica
2. Meccanismi epigenetici possono essere modellati da interazioni ambientali
3. L'effetto dell'interazione genoma-ambiente può essere ereditato anche a livello germinale
4. Meccanismi di alterazioni epigenetica sono alla base di numerose malattie

La rivincita  
di Lamarck?

