



EPIGENETICA: UNO SGUARDO PANORAMICO

Non cercheremo di digerire in tre paginette un capitolo di biologia così ricco e in crescita così tumultuosa da renderlo quasi indigeribile; si tratta di tutta una serie di novità o quasi-novità che sicuramente hanno poco a che fare col nostro lavoro quotidiano, ma che altrettanto certamente hanno moltissimo a che fare con la nostra comprensione della vita, dell'uomo e del suo sviluppo. Cercheremo tuttavia di dare egualmente uno sguardo d'insieme alla materia, uno sguardo necessariamente superficiale ed elementare, per capire, dalla letteratura più recente (non pediatrica, stavolta), quel tanto che basta per non restare fuori dalla porta. Anche perché, da poveri pediatri, appunto, diversamente non sapremmo fare.

Che cos'è l'epigenetica

Senza vergognarcene troppo, cominceremo dalla consultazione di *Wikipedia*.

Il termine di *epigenetica* è antico, aristotelico, ed è stato molto usato in antropologia e in etologia (Konrad Lorenz) per indicare quello che viene dopo la genetica, o meglio "sopra" (*epi*), a esprimere, modificare, perfezionare il messaggio del gene: l'effetto cioè della vita, degli affetti e dell'apprendimento (per l'uomo, alla fine, della cultura, oltre che dell'ambiente) che, nell'usignolo, trasformano in un canto sonoro la predisposizione, già ben presente nel cervellino del nidiaceo, che però ha bisogno dell'ascolto di un consimile adulto per produrre quel canto.

In biologia, il termine di epigenetica (o, meglio, la descrizione di un "paesaggio epigenetico") nasce nel 1942 (dunque alquanto prima dell'esplosione della biologia molecolare), "inventato" da C.H. Waddington, e mantiene la sostanza del significato originario: ciò che dell'ambiente interagisce col gene per produrre il fenotipo.

Più strettamente, oggi, indica ogni cambiamento dell'espressione fenotipica di un gene, che non dipenda da modificazioni nella sequenza del DNA.

Questi cambiamenti sono ereditabili (da cellula a cellula, e a volte da una generazione all'altra) ma anche no: e anzi non durano necessariamente per tutta la vita della cellula, e possono durare anche meno di una giornata. Detto tutto? Quasi.

Il termine (più antico) di *epigenesi* indica poi quella serie di fenomeni, fatti di silenziamento e di attivazione di geni, che trasforma la cellula staminale totipotente in una cellula altamente differenziata, come un neurone o un leucocita, e lo zigote in un embrione e quest'ultimo in un organismo maturo. Anche l'epigenesi (fenomeno in qualche modo "obbligato" e determinato dallo stesso messaggio genetico), questa "canalizzazione" di ogni clone cellulare verso il suo destino fenotipico finale, che viene ereditata da cellula a cellula, fa parte dell'epigenetica. Anzi, ne è forse la parte più consistente, e quella che per prima ci ha aiutato a capire il senso e i modi di questa materia. Ma lo spazio dell'epigenetica, in questi ultimi anni, si è straordinariamente allargato (Roloff TC, Nuber UA. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J Cell Biol* 2005; 84:123-35).

Come funziona l'epigenetica?

Ipersemplificando, il fenomeno base di tutto quello che sta nell'epigenetica (cioè nei cambiamenti "acquisiti" dell'espressione fenotipica del gene) è contenuto nei due termini di "silenziamento" e di "attivazione" di parti del DNA; e i meccanismi principali che sottendono questo fenomeno sono la metilazione del sito CpG del DNA (che "silenzia" il messaggio genetico cambiando la citosina in 5-metilcitosina e rendendola così "illeggibile") e le modificazioni di forma degli istoni, che costituiscono il sostegno delle catene di DNA, indotte da reazioni di acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitazione e altre, nel "nucleo", ma più spesso a livello delle "code" degli istoni. Di queste, l'acetilazione è la meglio studiata; l'acetilazione della lisina K14 e K19 della coda dell'istone H3 a opera dell'acetiltransferasi allarga lo spazio tra due istoni e rende così più facilmente "leggibile" il messaggio del DNA, e ha quindi un'azione tendenzialmente "attivante", così come la metilazione ha un effetto tendenzialmente "silenziante".

(NB: la metilazione del DNA induce una modificazione del messaggio genetico assai più stabile di quanto accada usualmente a seguito delle modificazioni morfostrutturali degli istoni. Sembra anzi possibile che la metilazione induca, successivamente, delle mutazioni stabili del DNA, e che in questo modo, come vedremo oltre, i fenomeni epigenetici, facilmente indotti da eventi ambientali, si possano tradurre a volte in effetti stabili, significativi, ai fini dell'evoluzione delle specie).

Tutto questo, ormai, non è più soltanto oggetto di deduzioni, di speculazione o di fantasia, ma "si può vedere", oggettivamente, su *microarray*, confermando o sconfutando molte ipotesi di lavoro.

Epigenetica ed ereditabilità

Abbiamo detto che le modificazioni epigenetiche possono essere relativamente stabili (ma anche no) all'interno di un clone cellulare, e che possono anche essere trasmissibili transgenerazionalmente, sebbene questo sia meno immediato da comprendere (e debba comunque necessariamente presupporre che l'evento epigenetico in questione abbia interessato l'ovocita o lo spermatozoo).

Due esempi di modificazione epigenetica che diventa transgenerazionale sono dati: uno, dalla paramutazione del mais, una modificazione epigenetica diventata stabile all'interno di una specie di mais; e, due, dalla modificazione del gene agouti indotta nel topo mediante esposizione a una determinata supplementazione dietetica, che provoca un cambiamento trasmissibile nel colore del mantello, nel peso (obesità) e nella predisposizione a sviluppare tumori (Chandler VL. Paramutation: from maize to mice. *Cell* 2007;128:641-5).

Ma esempi di ereditabilità dell'effetto epigenetico si hanno anche nell'uomo.

Si tratta, intanto, di un *experimentum naturae* (Svezia, XIX secolo): i nonni paterni esposti alla fame hanno dimostrato (e si comprende) un rischio significativamente minore di morire di cardiopatia, ma i nipoti (e questo non si capisce se non attraverso l'ereditabilità di una "paramutazione"

epigenetica), se esposti a una dieta "piena", avranno poi un rischio significativamente elevato di diventare diabetici. (NB: ritorneremo più oltre su questo forte effetto epigenetico della dieta, probabilmente non irrilevante anche ai fini dell'evoluzione).

Altro esempio: l'esposizione ad agenti cancerogeni non mutageni, come il dietilsilbestrolo, il nichel, l'esaclorofene, l'arsenico, produce (fenomeno molto discusso, ma recentemente confermato) effetti malformativi nella discendenza (Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, et al. Sex specific male-line transgenerational response in humans. *Eur J Hum Genet* 2006;14:159-66). Viceversa, alcune specificità dell'espressione epigenetica vengono trasmesse geneticamente: così i gemelli omozigoti mostrano una distribuzione dei fenomeni epigenetici tra loro simile, differentemente da quanto si osserva nei gemelli dizigoti.

Epigenetica e malattie

È inevitabile attribuire a un effetto epigenetico, ambientale, la diversa espressione di uno o di più geni (autismo, obesità) in gemelli monozigoti, dei quali uno affetto e l'altro no. Se un gemello monozigote ha un disturbo autistico e l'altro no, certamente almeno uno dei geni che sottendono il fenotipo dello spettro autistico deve essere stato silenziato (o attivato) in uno, e non nell'altro, della coppia. Ed è evidente che le differenze fenotipiche che si riscontrano tra gemelli omozigoti diventano perciò subito, e necessariamente, motivo di studio per individuare sia il meccanismo epigenetico intervenuto sia l'errore genetico, espresso o silenziato che sia.

Allo stesso modo, diventa quasi-più-che-ragionevole attribuire a effetti epigenetici la comparsa tardiva (o, viceversa, la non comparsa) di malattie genetiche "forti", come la schizofrenia, o "deboli", come la depressione, l'emicrania, l'epilessia.

Vedremo qui di seguito l'importanza dell'effetto epigenetico della dieta, in specifici momenti dello sviluppo, sull'equilibrio energetico successivo e sulla patologia cardiovascolare associata e/o sulla sindrome metabolica; e, più in là, il ruolo dell'epigenetica sui processi cognitivi e comportamentali e più in generale sulle funzioni neuronali.

Ma già da quanto è stato detto sinora, sembra chiaro il ruolo che l'epigenetica DEVE avere sullo sviluppo, sulle malformazioni, sul ritardo mentale, sull'invecchiamento, sull'oncogenesi.

Pressione dietetica ed effetti sull'epigenoma

Le osservazioni oggettive, sia sperimentali (come quella sui topi agouti-modificati) sia epidemiologiche (come quella dei nonni svedesi, o quelle sul maggior rischio di ipertensione e di diabete nei bambini nati sotto peso, che stanno alla base della, ormai molto nota, ipotesi di Barker), rappresentano forse le evidenze più macroscopiche del ruolo giocato dall'epigenomica nella costruzione del fenotipo adulto.

L'ipotesi di Barker propone che nel feto o nel neonato in condizioni di carenza nutrizionale si verifichi una riprogrammazione, orientata al risparmio, dei meccanismi biologici che regolano l'equilibrio metabolico; riprogrammazione che diventa patogena quando lo stesso individuo è

poi esposto a una dieta normale o abbondante. Questa ipotesi trova ormai una drammatica conferma di dimensioni epidemiche in quanto succede nei Paesi già poveri, oggi un po' meno poveri, agli adulti senza più carenze alimentari: obesità, diabete, ipertensione, appunto.

Nel ratto una restrizione proteica alla madre durante la gestazione esalta i fenomeni di apoptosi pancreatiche nella prole, con una riduzione della massa delle beta-cellule, che si ritrova anche nella generazione successiva. Analogamente, un elevato apporto di carboidrati nel periodo neonatale induce una iperinsulinemia, che persiste nell'animale adulto al di fuori di ogni stimolo nutrizionale. Questo imprinting metabolico si mantiene poi nella prole dei ratti femmina sottoposti alla nascita a tale manipolazione alimentare.

Conviene, a questo punto, leggere i titoli delle pubblicazioni seguenti: Blondeau B, Avril I, Duchene B, Bréant B. Endocrine pancreas development is altered in fetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. *Diabetologia* 2002; 45:394-401; Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Patel MS. Programming of islet functions in the progeny of hyperinsulinemic/obese rats. *Diabetes* 2003;52:984-90; Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 2004; 134:2169-72.

A queste alterazioni metaboliche persistenti corrispondono, in concreto, fenomeni di metilazione del DNA, di acetilazione degli istoni e di attivazione dell'espressione del gene che codifica per la leptina negli adipociti (MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, et al. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* 2004;18:43-50; Yokomori N, Tawata M, Onaya T. DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells. *Diabetologia* 2002;45:140-8).

Analoghe alterazioni molecolari vengono documentate anche in fisiopatologia umana (Melzner I, Scott V, Dorsch K, et al. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem* 2002; 277:45420-7).

Modificazioni epigenetiche su geni "imprinted"

Mentre nella grande maggioranza dei casi ciascun allele contribuisce simmetricamente alla costruzione del relativo fenotipo, vi sono alleli (concentrati in 15 siti cromosomici), che sono attivi solo sul cromosoma materno oppure solo sul cromosoma paterno: si tratta del fenomeno dell'imprinting genetico, responsabile, come noto, della sindrome di Angelman (in cui il gene attivo è localizzato tipicamente solo sul cromosoma materno) e della sindrome di Prader-Willi (in cui è invece collocato sul cromosoma paterno).

Orbene, questi *imprinted domain* posseggono una differente sensibilità ai processi di metilazione che li rende particolarmente suscettibili a una disregolazione, indotta da fattori ambientali, in particolare quelli legati alla pressione dietetica; inoltre essi sono caratterizzati da una maggiore stabilità nei riguardi degli effetti di silenziamento.



mento e di attivazione epigenetica, che verrebbero dunque più difficilmente cancellati dopo la fertilizzazione.

Per tutto questo, pur in assenza di prove formali, questi geni un po' speciali sono considerati i più promettenti candidati per spiegare le rapide modificazioni evoluzionistiche indotte, secondo alcuni indizi, dalla pressione alimentare.

Un'attenzione particolare è stata rivolta ad alcuni di questi "domini imprintati" come il complesso GNAS, che codifica per la sub-unità alfa della proteina stimolatoria G (Gs-alfa) e per altri trascritti, in maniera diversa se presente nel cromosoma materno (gonadi, tiroide, grasso bianco) o invece nel cromosoma paterno (grasso bruno). Mutazioni o knock-out o "silenziamenti" del gene paterno producono basso peso, scarsa vitalità, debole suzione, anomalie degli adipociti; quelle sul gene materno producono effetti opposti, che comportano invece un eccesso di peso (Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005;54:1899-906).

Epigenetica ed evoluzione

Abbiamo visto che la pressione indotta dalla dieta (restrizioni dietetiche, eccessi dietetici, squilibri dietetici) può produrre modificazioni adattive durature dell'equilibrio metabolico, mediate dai meccanismi dell'epigenesi di silenziamento e attivazione genetica, eventualmente facilitati da sottostanti situazioni di imprinting. Abbiamo anche visto che in qualche caso queste modificazioni si trasmettono in via transgenerazionale, e/o, ancora più importante, che alcune di queste, specialmente quelle prodotte dalla metilazione del DNA, possono a loro volta indurre alterazioni stabili del DNA (quindi non più epigenetiche ma genetiche a pieno titolo). Sappiamo anche, o crediamo di sapere, che i fenomeni mutazionali che stanno alla base dell'evoluzione non si sono verificati con un ritmo costante ma che, durante alcuni periodi, questi processi hanno subito delle accelerazioni. In particolare per il genere *Homo*, si ipotizza che l'ultima glaciazione tra 80.000 e 20.000 anni fa (un evento ambientale critico, certamente, anche sotto l'aspetto del reperimento del cibo) sia stata accompagnata da un simile periodo di accelerazione. L'ipotesi che l'epigenetica non sia estranea a tutto ciò è un'ipotesi forte, e ci porterebbe alla conclusione che Lamarck aveva ragione, o almeno una parte di ragione, attribuendo l'evoluzione alla pressione ambientale. Certo, le modificazioni fenotipiche ottenute in via epigenetica di cui siamo a conoscenza, in particolare quelle considerate nell'ipotesi di Barker per la costruzione del "fenotipo avaro", ci appaiono come "funzionali", "adattive", "intelligenti": proprio come nella visione lamarckiana. E bisogna dire che ci suona strano, a noi darwiniani, pensare che effettivamente la natura sia così automaticamente intelligente. Non abbiamo però difficoltà a pensare, alternativamente, che qualunque tipo di pressione ambientale possa indurre degli effetti epigenetici "random" e che solo quelli "utili" inducano un vantaggio selettivo che li immortalizzi.

Epigenetica e funzioni neuronali

Molto diversi da quelli che abbiamo sin qui considerati sono gli effetti dell'espressione fenotipica controllata dai fenomeni epigenetici a livello del sistema nervoso centrale, che sono alla base della plasticità neuronale. Una sintesi completa e avvincente di questi eventi si trova in Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 2008; 60:961-74.

Qui è in gioco più spesso l'acetilazione, e le altre modificazioni chimico-morfologiche degli istoni, i cui effetti sono più sottili e più labili, piuttosto che la "dura" metilazione del DNA; in realtà, sia fenomeni di acetilazione che di metilazione che di fosforilazione possono facilitare la scrittura (*writer*), la lettura (*reader*) o la cancellazione (*eraser*) del messaggio genetico originario. Questi fenomeni, a differenza di quanto abbiamo visto per le modificazioni dell'espressione genica indotte dalla dieta, si svolgono in continuazione all'interno del sistema nervoso centrale e determinano quel continuo fenomeno di "scultura" del cervello prodotto dall'esperienza e mediato dalla memoria. Se si pensa che quest'ultima, così come tutto il processo di maturazione dell'encefalo, è legata alle modificazioni dei legami sinaptici, che i neuroni del cervello sono circa dieci miliardi e che ciascuno di questi ha più o meno mille sinapsi, si comprende che questi eventi DEBBONO essere controllati da continue modificazioni del messaggio genetico. È quanto certamente avviene per i processi della memoria, in particolare per il consolidarsi dei ricordi nella memoria a lungo termine (Lewenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:108-18; Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 2004;42:961-72; Fisher A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling. *Nature* 2007;447:178-82; Kurner A, Chot KH, Tsankova NN, et al. Chronic remodeling as a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 2007;48:303-14).

Anche i fenomeni di dipendenza (che costituiscono un aspetto particolare della memoria) sono mediati da fenomeni di silenziamento e di attivazione genetica (Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:565-98).

Infine, singolare esempio di attivazione/silenziamento ciclici, anche il ritmo circadiano, regolato dalla luce e dal ganglio soprattico, di una serie di funzioni cerebrali, a cominciare da quella del sonno, è un fenomeno epigenetico-dipendente (Asher G, Garfield D, Stratmann M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 2008;134:317-28; Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, et al. CLOCK mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 2007;450:1086-90).