

G. De Palma<sup>1</sup>, P. Mozzoni<sup>2</sup>

## Nuovi indicatori molecolari per la prevenzione della patologia tumorale e degenerativa: la metilazione anomala del DNA

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione Tossicologia Industriale, Università degli Studi di Brescia

<sup>2</sup> Centro Ricerche ISPESEL presso l'Università di Parma

**RIASSUNTO.** La metilazione del DNA è un meccanismo fisiologico che regola l'espressione genica e la stabilità genomica. Disregolazioni della metilazione al DNA si osservano nella patologia neoplastica e degenerativa e possono riguardare l'intero genoma o geni specifici. Alterazioni analoghe sono state recentemente associate all'esposizione ad agenti chimici cancerogeni. La caratterizzazione di tali anomalie con le moderne tecniche di biologia molecolare potrà consentire lo sviluppo di nuovi indicatori molecolari di effetti biologici precoci.

**Parole chiave:** metilazione al DNA, epigenetica, epigenomica, indicatore biologico.

**ABSTRACT.** DNA methylation is a physiological mechanism regulating both gene expression and genomic stability. Abnormal DNA methylation is observed in neoplastic as well as degenerative disease, and may affect both the whole genome and specific genes. Aberrant DNA methylation has been recently associated to the exposure to carcinogenic chemical compounds. The characterization of DNA methylation abnormalities by modern molecular biology methods may allow the development of new molecular biomarkers of early biological effects.

**Key words:** DNA methylation, epigenetics, epigenomics, biomarker.

La metilazione del DNA è una modificazione post-replicative del genoma, trasmissibile alla progenie (sia per mitosi, che per meiosi), che rientra nell'ambito delle regolazioni epigenetiche della cromatina, in grado di modulare l'espressione genica e/o l'integrità del genoma, e dunque il fenotipo cellulare, in assenza di variazioni di sequenza nucleotidica.

Consiste nel legame covalente di un gruppo metilico sul carbonio in posizione 5 dell'anello pirimidinico di una citosina (C) che precede una guanina (G), con formazione di 5 metilcitosina (<sup>m</sup>C). Nell'uomo, la reazione rientra nel ciclo metabolico delle unità monocarboniose ed è catalizzata da una famiglia di enzimi specifici, denominati DNA metiltransferasi (DNMTs, di cui si conoscono almeno quattro isoforme implicate: 1, 3a, 3b, 3L), che trasferiscono il gruppo metilico del donatore S-adenosilmetionina. La deaminazione spontanea (sostituzione del gruppo aminico con un gruppo chetonico) della <sup>m</sup>C si verifica con maggior frequenza rispetto a quella della C ed è, rispetto ad essa, mutagenica. Mentre il residuo C viene convertito in uracile, base estranea al DNA e dunque prontamente riparata, la conversione della <sup>m</sup>C in timina viene fissata come transizione C→T. Nel DNA umano, i residui <sup>m</sup>C si concentrano in sequenze contenenti un numero variabile di ripetizioni dinucleotidiche citosina-guanina (*isole CpG*), caratteristiche della regione 5' regolatoria di circa il 40% dei geni umani e di sequenze ripetitive e trasposoniche disperse nel genoma. Il grado di metilazione delle *isole CpG* di sequenze geniche è inversamente associato ai livelli di trascrizione in mRNA, per cui l'ipometilazione si associa ad un aumento dell'espressione genica, mentre l'ipermetilazione a silenziamento genico. La metilazione delle *isole CpG* di sequenze ripetitive genomiche con attività ricombinogenica e trasposonica ne silenzia l'attività, con effetto stabilizzante sull'integrità genomica. La metilazione del DNA è infine implicata nella definizione degli aggiustamenti di dosaggio genico, come osservato nell'inattivazione del cromosoma X e nell'espressione di geni soggetti ad *imprinting* genomico, ossia trasmessi ereditariamente con differente grado di metilazione (e dunque differentemente espressi) a seconda dell'origine materna o paterna.

L'analisi della metilazione del DNA si basa su metodiche di biologia molecolare dotate di buona sensibilità e specificità e la valutazione, in quanto effettuata su DNA

genomico, può essere condotta su materiale sia fresco, che archiviato. Il *gold standard* analitico è rappresentato dal pre-trattamento del DNA genomico isolato dal campione in esame con sodio bisolfito per la conversione selettiva dei residui di C in uracile, mentre i residui  $^{13}\text{C}$  restano immutati. Il DNA così pre-trattato può essere valutato sia con metodiche di sequenziamento genico, che tramite PCR (*polymerase chain reaction*) con primers specifici per le sequenze metilate e non metilate, o mediante *microarrays* o in spettrometria di massa. La valutazione è sia qualitativa (sequenza metilata *vs* non metilata) con definizione dell'epigenotipo della/e sequenza/e indagata/e, che quantitativa (% sequenze metilate *vs* non metilate). Possono essere caratterizzate sia la metilazione specifica a carico di uno o più geni, che la metilazione complessiva, a livello genomico. In questo caso la caratterizzazione può essere sia indiretta, valutando come surrogato il grado di metilazione di sequenze ripetitive disperse nel genoma [sequenze *Alu* (circa il 10% del genoma umano) e *LINE-1* (lunghi elementi nucleari disseminati - famiglia 1; circa 17% del genoma umano)] (1), che diretta tramite *microarrays* genomici. Il costo delle analisi varia a seconda della tecnica impiegata e del numero di sequenze indagate. Per caratterizzazioni tramite PCR in Tempo Reale, per i soli reagenti è da prevedere una spesa di circa dieci euro per campione. Il laboratorio di analisi deve disporre di attrezzature piuttosto avanzate di biologia molecolare, con personale dedicato e adeguatamente formato.

La variabilità dell'epigenoma è almeno cento volte maggiore rispetto a quella del genoma. Questo è omogeneo nelle cellule di un individuo e, ad eccezione di condizioni particolari (condizioni geneticamente determinate, esposizione ad agenti genotossici, patologia neoplastica), tende a rimanere costante durante la sua esistenza. L'informazione epigenetica, invece, varia notevolmente durante il periodo prenatale influenzando in modo particolare i programmi di sviluppo embriogenetico. Successivamente, permangono differenze nell'epigenoma di cellule appartenenti a tessuti diversi, caratterizzanti i diversi percorsi differenziali. L'epigenoma inoltre è fortemente influenzato dall'età dell'individuo e dalle esposizioni ambientali. L'età si associa ad una tendenza all'ipometilazione ed il fenomeno sembra essere geneticamente controllato. La dieta è un importante modificatore dell'epigenoma a causa, ad esempio, del ruolo essenziale svolto dai folati come donatori di gruppi metile nel metabolismo delle unità monocarboniose. Il consumo di alcool è stato associato sia al silenziamento (ipermetilazione) di geni onco-soppressori nel tumore del colon, che ad iperomocisteinemia per ridotta biodisponibilità dell'acido folico, con conseguente interferenza sulle reazioni DNA metiltransferasiche (ipometilazione). Il fumo di tabacco è stato associato sia ad ipometilazione di oncogeni che ad ipermetilazione di geni oncosoppressori. Alterazioni della metilazione sono state osservate anche dopo esposizione ad interferenti endocrini (diethylstilbestrolo, bisfenolo A, genisteina), fungicidi (vinclozolina) e pesticidi (metossichlor), metalli pesanti (cromo, cadmio, arsenico), radiazioni ionizzanti ed ultraviolette. Alterazioni epigenomiche sono state osservate in particolare nella patologia neoplastica ma si ritiene che

siano riscontrabili anche in altri disordini a patogenesi complessa, come l'asma, la patologia cardiovascolare, il diabete di tipo 2, l'allergia ed alcuni disturbi psichiatrici (per *review*, 2).

Nella patologia tumorale sono state evidenziate sia una ipometilazione globale del DNA, che una ipermetilazione specifica di geni onco-soppressori e di microRNA (per *review*, 3). Il DNA genomico è progressivamente ipometilato durante lo sviluppo tumorale, e ciò contribuisce sia all'instabilità genomica, per riattivazione di sequenze ricombinogeniche (*Alu*) e trasposoniche (*LINE-1*), che alla perdita di imprinting genomico per geni critici, come *IGF2*, associato al tumore del colon-retto. D'altra parte, l'ipermetilazione di geni onco-soppressori è un evento principale nella cancerogenesi. Tra i geni maggiormente coinvolti ricordiamo, nell'ordine dell'evidenza scientifica, il gene del retinoblastoma (*Rb*), il gene associato alla malattia di Von Hippel Lindau (*VHL*), *p16<sup>INK4a</sup>* (inibitore della chinasi ciclina-dipendente CDK4), *hMLH1* (omologo del gene Mut in *E. coli*) e *BRCA1* (gene 1 per la suscettibilità al carcinoma mammario). Con tecniche epigenomiche sono state evidenziate da 100 a 400 aree di ipermetilazione del promotore per tumore, che comprendono anche geni implicati in meccanismi chiave della cancerogenesi, quali regolazione del ciclo cellulare, riparazione del DNA, metabolismo dei cancerogeni, comunicazione intercellulare, apoptosi ed angiogenesi. Per definire i profili di ipermetilazione tumore-specifici è stato coniato il termine *ipermetiloma*. Nel caso del tumore polmonare, ad esempio, oltre all'ipometilazione genomica globale, è frequentemente osservata un'ipermetilazione di *p16<sup>INK4a</sup>*, *DAPK* (protein chinasi 1 morte-associata) e *RASSF1A* (membro 1A della famiglia di associazione Ras).

In campo oncologico, gli indicatori di metilazione del DNA sono attualmente in fase di valutazione come indicatori biologici con finalità di diagnosi precoce, prognosi e predittività della risposta alla terapia. L'ipermetilazione dei geni *p16<sup>INK4a</sup>* e *FHIT* (sito fragile codificante una diadenosina trifosfato idrolasi) è un evento frequente e molto precoce nella cancerogenesi polmonare in quanto riscontrato con elevata frequenza in lesioni pre-neoplastiche (aree di metaplasia/displasia). Il gene *p16<sup>INK4a</sup>*, ipermetilato nel tessuto polmonare normale di circa il 50% dei fumatori, è un evento precoce nello sviluppo del carcinoma squamocellulare. Il gene *GSTP1* (glutazione S-transferasi P1) è ipermetilato nell'80-90% dei tumori prostatici ma non nell'ipertrofia prostatica benigna e dunque è di notevole utilità nella diagnosi differenziale delle due forme. La ipermetilazione dei geni *DAPK*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *EMP3* (proteina epiteliale di membrana 3) è stata associata ad una bassa prognosi rispettivamente nei tumori polmonare, del colon-retto e del cervello (per *review*, 4).

In campo epidemiologico, sono stati recentemente pubblicati alcuni interessanti lavori che potrebbero portare allo sviluppo di nuovi indicatori da utilizzare in programmi di monitoraggio degli effetti biologici. In gruppi di lavoratori esposti a medie ( $61 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , benzinai), basse ( $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , vigili urbani) e molto basse concentrazioni di benzene ( $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , impiegati, gruppo di controllo) sono state osservate associazioni significative tra livelli di

esposizione a benzene e profili di metilazione al DNA in cellule linfomononucleate del sangue periferico (1). L'esposizione era significativamente correlata ad ipometilazione delle sequenze *Alu* e *LINE-1* (riduzioni del 2.3% e dell'1%, rispettivamente, per incrementi di concentrazione del benzene di 10 volte), e del gene *MAGE-1* (antigene 1 del melanoma; riduzione dello 0.5%) e ad ipermetilazione del gene *p15<sup>INK4B</sup>* (inibitore della chinasi ciclina dipendente; aumento dello 0.35%). Il gene *H19* presentava una perdita d'*imprinting* genomico nei soggetti a maggiore esposizione esposti ma non nel gruppo di controllo. Risultati simili sono stati ottenuti in un altro studio (5) su un gruppo di Inuit della Groenlandia con livelli plasmatici medio-alti di diversi inquinanti organici persistenti (POPs). Sono state osservate delle correlazioni inverse tra le concentrazioni plasmatiche di alcuni di questi [ $\alpha$ -clordano, ossiclordano, pp'-diclorodifeniltricloroetano (pp'DDT), pp'-diclorodifenildicloroetilene (pp'DDE),  $\beta$ -esaclorocicloesano, policlorobifenili (PCB) totali ed i congeneri 28, 99, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183] nonché della somma di tutti i POPs valutati, e grado di metilazione delle sequenze *Alu*. L'analisi era condotta anche con modelli di regressione lineare multipla che tenevano conto dell'interferenza di fattori noti come età ed abitudine tabagica.

Dal punto di vista pratico, l'applicazione dei nuovi indicatori epigenetici (epigenoma, epigenotipi) allo scopo di monitorare gli effetti biologici precoci in gruppi di lavora-

tori esposti ad agenti chimici/cancerogeni, richiederà ulteriori studi di validazione, di tipo anche prospettico, per una migliore definizione delle specificità rispetto sia all'esposizione, che all'*endpoint* da prevenire. Occorre inoltre valutare e caratterizzare gli eventuali fattori di suscettibilità, che, a parità di esposizione, possono modificare le relazioni dose-risposta. In ogni caso, dato il coinvolgimento dei disordini della metilazione al DNA nello sviluppo della patologia non solo neoplastica ma anche degenerativa, l'utilità preventiva dei nuovi indicatori epigenetici potrà essere rivolta agli effetti derivanti dall'esposizione ad agenti cancerogeni, ma non solo.

---

### Bibliografia essenziale

- 1) Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 876-80.
- 2) Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CJ, Dwyer T, Smith K, Safery R. Prospects for Epigenetic Epidemiology. *Am J Epidemiol.* 2009; 169(4): 389-400.
- 3) Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(11): 1148-59.
- 4) Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359(13): 1367-80.
- 5) Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonefeld-Jorgensen EC. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(11): 1547-52.

**Richiesta estratti:** Dott. Giuseppe De Palma - Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione Tossicologia Industriale, Università degli Studi di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy - Tel. 0303996832, Fax 0303996046, E-mail: depalma@med.unibs.it