

## **INTERAZIONE GENOTIPO-AMBIENTE: ESPOSIZIONE, VARIABILITÀ INDIVIDUALE E INSTABILITÀ CROMOSOMICA**

Francesca Marcon  
*Reparto di Tossicologia Genetica*

Gli obiettivi del reparto di Tossicologia Genetica comprendono la valutazione dell'attività genotossica delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente, come pesticidi o contaminanti alimentari, verificando se una sostanza è in grado di modificare la struttura dei cromosomi, la loro segregazione, il contenuto dell'informazione (la sequenza del DNA) e, anche se temporaneamente, la replicazione del DNA. I metodi applicati si basano prevalentemente su tecniche di citogenetica classica e molecolare che permettono di seguire i cambiamenti della forma dei cromosomi o analizzare variazioni del numero dei cromosomi. Si possono anche seguire cromosomi specifici, coinvolti ad esempio in particolari patologie, o visualizzare scambi tra cromosomi (traslocazioni) applicando l'ibridazione in situ a fluorescenza, un metodo che permette di identificare i cromosomi anche quando sono "invisibili", come nelle cellule in interfase. Si può valutare così l'effetto genotossico di una sostanza ricavando anche informazioni sul meccanismo d'azione dell'agente studiato, dati molto utili nel processo di valutazione e gestione del rischio mutageno associato all'esposizione ad una particolare sostanza.

A volte l'esposizione non causa un danno genotossico diretto, ma determina alterazioni di funzioni cellulari di per sé non sufficienti a causare cambiamenti visibili della stabilità dei cromosomi; queste, però, aumentano la suscettibilità dell'individuo all'azione di un secondo agente genotossico e rendono sufficiente l'effetto di una successiva esposizione (Tomatis, 2004). Questi lievi cambiamenti si possono evidenziare caratterizzando gli individui per la risposta ad un agente mutageno in seguito ad un trattamento *ex vivo* (il quale rappresenta la seconda esposizione). Il fenotipo "sensibilità ai mutageni" è una misura indiretta della capacità individuale di riparare il DNA e rappresenta un marcatore molto utilizzato negli studi di suscettibilità individuale ai cancerogeni, in quanto studi prospettici (Wu *et al.*, 2007) ne hanno evidenziato l'associazione con un aumentato rischio di cancro.

Nel nostro reparto questo metodo è stato applicato su una popolazione caratterizzata per le abitudini al fumo e classificata in fumatori, ex fumatori e non fumatori, ed ha dimostrato che i fumatori e i non fumatori hanno risposte diverse dopo trattamento con i raggi gamma, differenza che non era stata osservata esaminando semplicemente i valori spontanei delle aberrazioni cromosomiche (Tabella 1) (Marcon *et al.*, 2003). Questo dato inatteso sottolinea la cautela con cui bisogna interpretare i risultati e dimostra che sia un aumento di aberrazioni cromosomiche che una loro riduzione significativa sottendono differenze nella capacità di riparare il DNA (alterazioni rispetto alla norma).

Quali sono i fattori che influenzano il fenotipo "sensibilità ai mutageni"? Come insegna la genetica, ogni fenotipo è il risultato dell'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali. In uno studio recente condotto da un gruppo americano è stato osservato che i fattori genetici spiegano circa il 50% della variabilità inter-individuale nella risposta ai mutageni (Wu *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la componente genetica, è importante cercare di capire quali sono i geni specifici e i processi responsabili di questo fenotipo, al fine di ottenere informazioni utili per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base del fenotipo e per trovare nuovi marcatori genetici da applicare nella valutazione del rischio di cancro, nella prevenzione clinica e nel trattamento.

**Tabella 1. Frequenza delle aberrazioni cromosomiche spontanee (0 Gy) e indotte da raggi gamma (2 Gy) osservate in un gruppo di soggetti classificati in base alle abitudini al fumo**

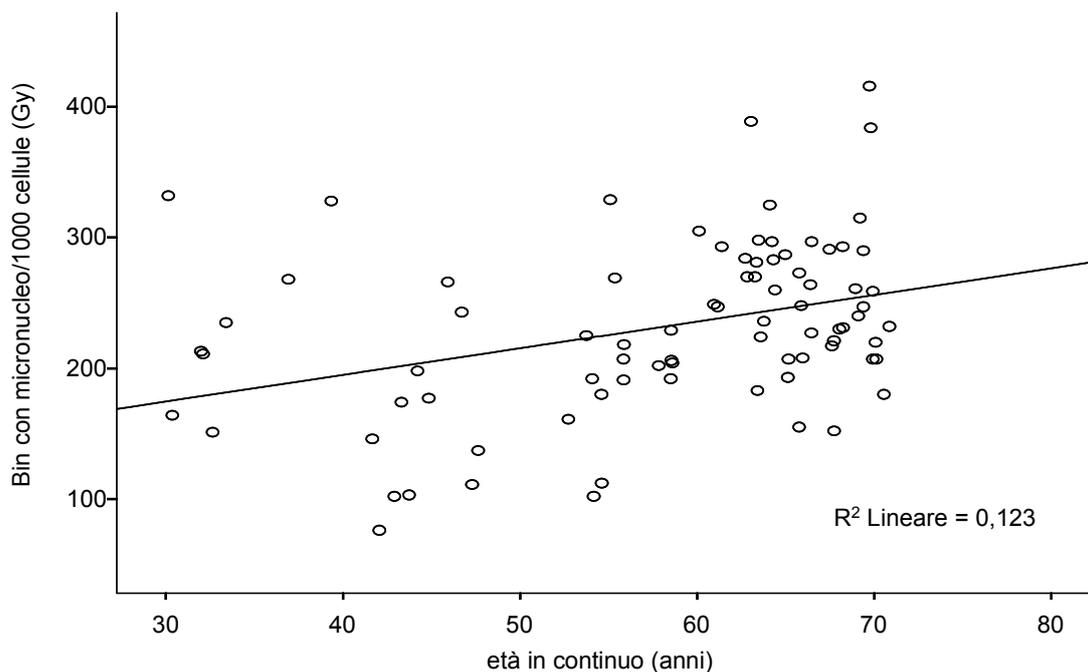
Abitudini al fumo	Aberrazioni cromosomiche per 100 cellule			
	No. soggetti	0Gy	2 Gy	P
NF	19	1,9 ± 1,6	32,7 ± 8,8	
DF	6	1,6 ± 0,7	32,0 ± 8,9	
FF	6	1,7 ± 1,5	24,3 ± 6,8	0,05

NF: non fumatori; DF: deboli fumatori (<15 sigarette al giorno); FF: forti fumatori (>15 sigarette al giorno).

Con questo scopo, nel nostro laboratorio è stato condotto uno studio per valutare cambiamenti dell'espressione genica dopo irraggiamento di linfociti umani applicando la tecnica dei microarray (Marcon *et al.*, 2006). Sono state osservate variazioni significative di un gran numero di geni coinvolti nella risposta iniziale delle cellule al danno da radiazioni, geni coinvolti quindi nella proliferazione cellulare, apoptosi, o nel controllo del ciclo cellulare. Non sono stati evidenziati, invece, geni o processi che avessero un'espressione significativamente diversa nei soggetti sensibili rispetto a quelli insensibili alle radiazioni. Questo risultato si può spiegare ipotizzando che non ci sia un solo gene o un gruppo di pochi geni molto forti che influenzano il fenotipo "sensibilità ai mutageni", ma piuttosto che intervengano molti geni che modulano questo carattere complesso. La componente genetica ha quindi un peso significativo nel modulare la suscettibilità individuale ai mutageni, ma anche la componente ambientale ha la sua rilevanza spiegando il restante 40-60% della variabilità inter-individuale (Wu *et al.* 2006). Per valutare quali sono i fattori ambientali che influenzano questo fenotipo e studiare il peso relativo di ciascuno di essi, abbiamo avviato uno studio su una popolazione di gemelli che rappresenta il classico modello sperimentale in cui valutare il ruolo dei fattori ambientali per spiegare le differenze fenotipiche che si osservano tra i soggetti. I gemelli, infatti, sono individui geneticamente identici per cui le differenze fenotipiche si possono attribuire direttamente all'ambiente.

Da un nostro studio recente è apparso che anche l'età può influenzare la sensibilità ai mutageni (Marcon *et al.*, 2009) probabilmente a causa della nota riduzione della capacità di riparare il danno al DNA che si osserva con l'invecchiamento e a causa di modificazioni epigenetiche che si accumulano con l'età (Fraga *et al.*, 2005) (Figura 1).

I cambiamenti epigenetici sono modificazioni ereditabili dell'espressione genica o dell'organizzazione della cromatina non associati a cambiamenti della sequenza del DNA, ma riguardanti gli istoni o la metilazione del DNA. Gli istoni sono proteine che formano il nucleosoma attorno al quale si avvolge in DNA. I residui amminoacidici all'N-terminale di ciascun istone si estendono al di fuori della superficie del nucleo soma e queste regioni possono essere reversibilmente modificate mediante acetilazione, fosforilazione o metilazione. I cambiamenti epigenetici degli istoni sono modificazioni dinamiche che seguono la progressione del ciclo cellulare oppure il metabolismo del DNA (replicazione, trascrizione, riparazione); la fosforilazione dell'istone H3, ad esempio, segna la progressione del ciclo cellulare attraverso la fase G2/M, mentre la fosforilazione dell'istone H2AX segnala la presenza di un danno sul DNA. In linea di massima sono cambiamenti che rendono più o meno accessibile il DNA agli enzimi che devono intervenire per il suo metabolismo.



**Figura 1. Frequenza delle cellule binucleate con micronuclei indotte dal trattamento con 2 Gy di raggi gamma osservata nei linfociti di sangue periferico di individui di età diverse (Modificata da Marcon *et al.*, 2009)**

Per quanto riguarda, invece, la metilazione del DNA ci sono diversi livelli a cui si possono valutare questi cambiamenti; si può seguire il grado di metilazione globale del DNA, di regioni cromosomiche specifiche, come i promotori di geni particolari (meccanismo usato per regolare la trascrizione dei geni) o cambiamenti a livello di regioni cromosomiche specifiche, come i centromeri o i telomeri. Alterazioni del livello di metilazione dei centromeri, ad esempio, portano a disfunzioni funzionali di queste strutture che possono determinare un'alterata segregazione dei cromosomi. Cambiamenti epigenetici, quindi, possono essere associati ad instabilità cromosomica. Nel caso dei telomeri, strutture nucleoproteiche localizzate all'estremità dei cromosomi, alterati livelli di metilazione possono essere messi in relazione con cambiamenti della loro lunghezza e quindi causare la perdita della funzione di proteggere i cromosomi dall'erosione. Se si accorciano i telomeri, le estremità dei cromosomi diventano "reattive" e interagiscono tra loro formando complessi cromosomici aberranti (associazioni telomeriche) che alla divisione della cellula rimangono tra i due nuclei figli come un ponte; questo rompendosi determina la formazione di due cellule figlie con il contenuto di DNA anormale e altera così la stabilità del genoma. Considerando l'associazione tra i cambiamenti epigenetici e l'instabilità cromosomica è importante valutare anche il ruolo della componente epigenetica nel modulare la sensibilità ai mutageni, oltre al ruolo dei fattori genetici e di quelli ambientali. I cambiamenti epigenetici, a loro volta, possono essere indotti da cause ambientali; li possiamo considerare, quindi, sia come fattori di suscettibilità che influenzano la sensibilità ai mutageni che come bersaglio degli agenti ambientali, aumentando in questo modo i punti di osservazione per valutare la risposta cellulare ad un insulto tossico. Tutto ciò al fine di ottenere informazioni integrate sul meccanismo d'azione di una sostanza e sui suoi effetti tossici,

adottando un approccio che rappresenta una stimolante opportunità per migliorare le conoscenze sulla relazione tra cambiamenti genetici (o epigenetici) ed effetti tossici, per identificare nuovi biomarcatori, per definire le cause ambientali di patologie umane e permettere così una corretta e affidabile identificazione e valutazione del rischio.

## Bibliografia

- Jin JH, Clark AB, Slebos RJ, *et al.* Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics* 2003;34(3):326-9.
- Marcon F, Andreoli C, Rossi S, Verdina A, Galati R, Crebelli R. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutat Res* 2003;541:1-8.
- Marcon F, Palli D, Zufferli A, Mazzoli E, Siniscalchi E, Sera F, Saieva C and Crebelli R. Evaluation of radiation-induced chromosome instability in subjects with a family history of gastric cancer. *Biomarkers* 2009;14:226-34.
- Marcon F, Siniscalchi E, Silvestrini F, Giuliani A, Palli D, Crebelli R. Variazioni individuali dell'espressione genica e delle capacità di riparo del DNA valutate dopo trattamento con le radiazioni ionizzanti. In: Cometa MF, Di Consiglio E, Gemma S, Parisi L, Volpe MT (Ed.). *XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-9 febbraio 2006. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (ISTISAN Congressi 06/C1) p. 201.
- Wu X, Gu J, Spitz M. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer. *Cancer Res* 2007;67:3493-5.
- Wu X, Spitz M, Amos CI, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz NL, Shields PG and Swan GE. Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res* 2006;66:5993-6.