

Danno al DNA: mutazioni e tumori

Eugenia Dogliotti e Margherita Bignami

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, ISS



La scoperta della struttura del DNA ha posto le basi per la conoscenza dei vari tipi di mutazioni che insorgono nel genoma in seguito alla presenza di danno al DNA. Questo può essere la conseguenza di eventi spontanei o di esposizioni di tipo ambientale. I cancerogeni ambientali e/o i loro metaboliti causano mutazioni attraverso la formazione di addotti covalenti con il DNA che aumentano la probabilità di errori durante il processo di replicazione (Figura). I fotoprodotto indotti da luce UV così come gli addotti ingombranti prodotti dal fumo di sigaretta possono rendere la base modificata “illeggibile” da parte della DNA polimerasi che tenderà a inserire una base errata di fronte alla lesione. La scoperta del sistema di riparazione per i dimeri di pirimidina e gli addotti ingombranti, il *nucleotide excision repair*, ha permesso di capire che la cellula deve essere protetta da questo tipo di danno per evitare l’accumulo di mutazioni nel genoma. La predisposizione a sviluppare tumori della pelle nello *Xeroderma pigmentosum*, una rara sindrome umana con difetti nel *nucleotide excision repair*, costituisce la prova convincente della relazione esposizione al cancerogeno-accumulo di addotti al DNA-aumento delle mutazioni- formazione di tumori. Un altro esempio di questo paradigma è la sindrome *Hereditary Non Polyposis Colon Cancer*. Anche in questo caso i pazienti sviluppano carcinomi del colon retto per

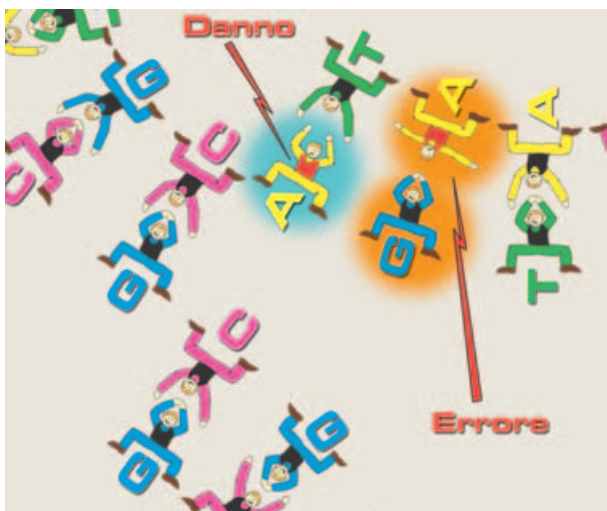


Figura - Danno al DNA ed errori di replicazione

un difetto in un sistema di riparazione del danno al DNA, il *mismatch repair*. L’instabilità genetica conseguente alla mancata riparazione degli errori spontanei della replicazione, probabilmente favoriti dalla presenza di altre lesioni endogene (metilazione, ossidazione), è il fattore causale della predisposizione ai tumori di questa sindrome ereditaria.

QUANTO LE NUOVE TECNOLOGIE DERIVATE DALLA SCOPERTA DEL DNA SONO UTILIZZABILI PER UNA MISURA DI RISCHIO DI TUMORE NELLA POPOLAZIONE NON AFFETTA DA MALATTIE EREDITARIE?

Le scoperte fondamentali in questo processo di conoscenza si possono riassumere in queste tre tappe:

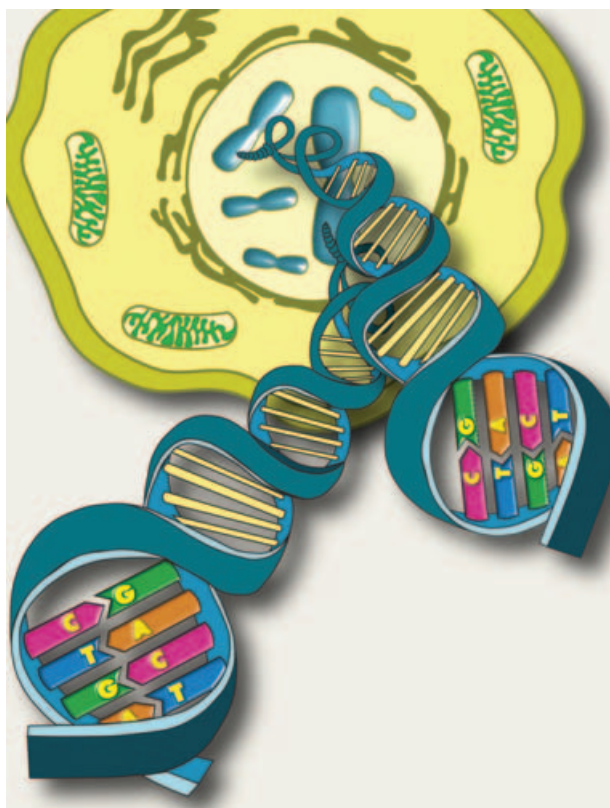
- l’identificazione di cancerogeni chimici presenti nell’ambiente in grado di interagire col DNA e di determinarne delle modificazioni strutturali (i cancerogeni formano degli addotti sul DNA);
- la dimostrazione che questi addotti sono in grado di alterare la sequenza del DNA in alcuni casi in modo specifico (i cancerogeni inducono profili di mutazione specifici lasciando la loro impronta digitale, *fingerprint*, sul DNA);
- la scoperta di mutazioni nei geni rilevanti nel processo di trasformazione neoplastica (oncosoppressori e oncogeni) in tumori umani.

L’analisi dello spettro di mutazioni del gene oncosoppressore p53 nei tumori della pelle, del fegato e del polmone fornisce tre esempi spettacolari di associazione tra cancerogeni ambientali e specifici profili di mutazione in geni rilevanti nel processo di cancerogenesi.

ESPOSIZIONE A LUCE UV E INDUZIONE DI CANCRO DELLA PELLE

Una forte evidenza sperimentale ed epidemiologica associa l’esposizione a radiazioni UV con lo sviluppo di cancro della pelle di tipo non melanocitico. L’a-

“ Il danno al DNA può essere conseguenza di eventi spontanei o di esposizioni ambientali ”



analisi delle mutazioni del gene oncosoppressore p53, frequentemente mutato in questo tipo di cancro, ha permesso di stabilire un'associazione diretta tra esposizione a radiazioni solari e insorgenza del tumore. Lo spettro è infatti caratterizzato da transizioni GC>AT localizzate a siti dipirimidinici e mutazioni tandem CC>TT. Entrambi i tipi di mutazione sono caratteristici delle radiazioni UV. Sebbene il primo tipo di mutazioni sia frequente anche in altre forme di cancro, le mutazioni tandem sono specifiche dei tumori della pelle. È interessante notare che lo spettro di mutazioni del gene p53 in tumori della pelle di pazienti affetti da *Xeroderma pigmentosum* è caratterizzato da una frequenza particolarmente elevata di mutazioni tandem CC>TT, il *fingerprint* dell'esposizione a radiazioni UV.

Nella popolazione generale la variabilità interindividuale nella capacità di riparare i danni da luce UV ha un ruolo nel rischio di cancro della pelle? Due tipi di evidenze sperimentali sostengono l'importanza di efficienti meccanismi di riparazione del DNA nella salvaguardia della stabilità del genoma:

- le mutazioni del gene p53 nei tumori della pelle sono localizzate in specifici "punti caldi" che corrispondono ai siti dove le lesioni indotte da luce UV sono riparate più lentamente;
- studi di popolazione su soggetti affetti da epitelio-ma basocellulare indicano che una minore capaci-

tà di riparazione del danno da luce UV è associata a un più elevato rischio di cancro della pelle nei soggetti giovani.

ESPOSIZIONE AD AFLATOSSINA B1 E INDUZIONE DI EPATOCARCINOMI

L'aflatossina B1 (AFB₁) è un metabolita del fungo *Aspergillus flavus* che contamina alcuni alimenti (ad esempio, riso, nocciole, mais) conservati in modo inadeguato. AFB₁ è uno dei cancerogeni epatici più potenti oggi conosciuti. Questa tossina richiede conversione metabolica a epossido per indurre un'ampia varietà di addotti sul DNA. Una di queste modificazioni, l'addotto AFB₁-formamidopirimidina, è il principale candidato per l'induzione delle mutazioni specifiche indotte da questo cancerogeno che sono prevalentemente trasversioni GC>TA. Studi epidemiologici indicano che l'AFB₁ gioca un ruolo sinergico con l'infezione da parte del virus dell'epatite B (HBV) nell'induzione di carcinomi epatocellulari. Sebbene l'esposizione ad AFB₁ o a HBV aumenti di per sé il rischio di epatocarcinomi (3 e 7 volte rispettivamente), la presenza di entrambi i fattori di rischio aumenta di 60 volte la probabilità di sviluppare la patologia. L'analisi delle mutazioni del gene p53 in epatocarcinomi ha messo in evidenza il *fingerprint* dell'AFB₁, trasversioni GC>TA, che sono localizzate preferenzialmente in un solo "punto caldo", il codone 249. Questa mutazione è stata trovata in più del 50% dei campioni di epatocarcinomi da aree del mondo dove l'esposizione ad AFB₁ è alta e dove è frequente l'infezione da HBV (in particolare, alcune regioni della Cina, India,

Sud Africa, Gambia, Mozambico e Senegal). Solo l'1% dei casi HCC da regioni con bassa esposizione ad AFB₁ (in particolare Australia, Europa, Giappone e America) presenta invece questa mutazione. Sperimentalmente è stato osservato che l'AFB₁ si lega al codone 249 ma è reattiva anche verso altri codoni del gene p53. Perché solo le mutazioni del codone

249 siano presenti in epatocarcinomi quando si verifica un'esposizione ad AFB₁ non è chiaro. La mutazione Arg>Ser al codone 249 ha proprietà dominanti-negative in cellule epatiche in coltura, suggerendo che questo mutante possa essere selezionato perché particolarmente deleterio per cellule epatiche.

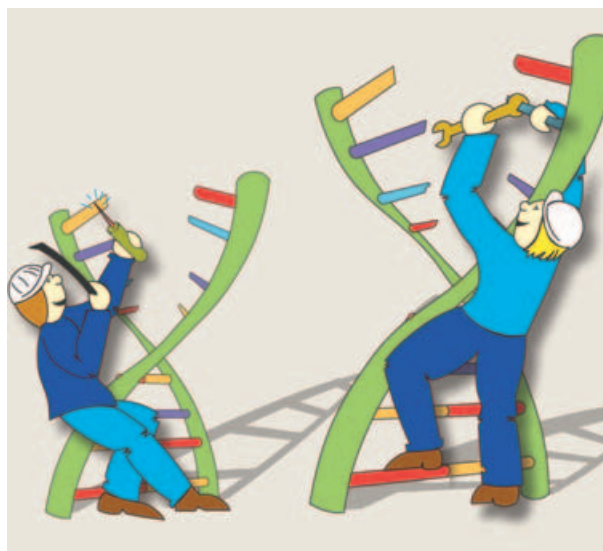
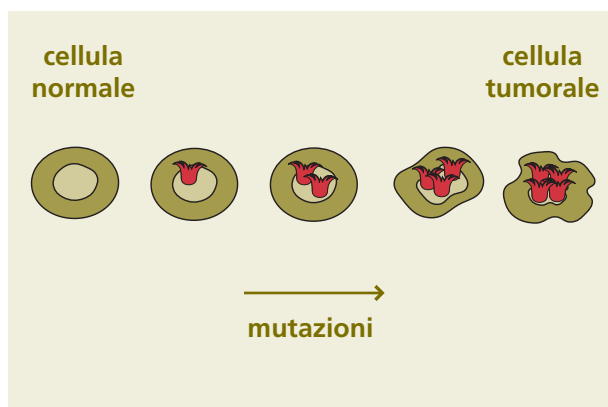
ESPOSIZIONE A FUMO DI SIGARETTA E INDUZIONE DI TUMORI POLMONARI

L'osservazione che il fumo di sigarette è la principale causa dell'insorgenza del carcinoma del polmone risale agli anni '50. L'incidenza del tumore del polmone, estremamente bassa alla fine della prima guerra mondiale, è infatti cresciuta progressivamente con la produ-

“
Fin dagli anni '50
è noto che il fumo
di sigaretta causa
l'insorgenza
di cancro al polmone
”

zione di massa delle sigarette, fino a raggiungere ai nostri giorni la prima causa di morte per tumore nel mondo occidentale. La scoperta dell'associazione fumo-tumore ha base quindi strettamente epidemiologica.

Un numero molto elevato di sostanze chimiche, nell'ordine delle migliaia, sono state identificate nel fumo delle sigarette. Gli idrocarburi policiclici aromatici, le ammine aromatiche e i nitroso-composti, incluse le nitrosammine, sono alcune delle classi chimiche coinvolte. Quali sono quelle responsabili dell'induzione dei tumori? Mentre la cancerogenesi di questi composti nei modelli animali è nota dagli anni '70, il chiarimento del loro meccanismo di azione nel processo di cancerogenesi ha dovuto attendere lo sviluppo della tecnologia legata alla manipolazione del DNA. Un esempio in questo senso è costituito dal benzo(a)pirene. Questa sostanza, dopo attivazione metabolica da parte del citocromo P450, è in grado di formare 4 diolepossidi che possono interagire con le basi del DNA, sia guanine che adenine, e formare ben 16 diversi addotti al DNA. Il benzo(a)pirene-7,8-diolo-9,10-epossido (BPDE) legato alla guanina in posizione N² ne modifica le proprietà di appaiamento e permette la formazione di accoppiamenti errati G:A che alla replicazione successiva si trasformeranno in mutazioni GC>TA. La presenza di questi addotti al DNA nell'epitelio del polmone di soggetti fumatori dimostra che questi cancerogeni raggiungono nel tessuto bersaglio del processo di trasformazione neoplastica dei livelli tali da modificarne il loro DNA. Nei tumori polmonari sono molto comuni (40% dei casi) le mutazioni nel gene p53. Queste non sono distribuite in maniera casuale ma mostrano dei *fingerprints* specifici che sono diversi tra fumatori e non-fumatori. Lo studio molecolare delle mutazioni del gene p53 nei tumori polmonari di fumatori ha identificato che queste sono preferenzialmente trasversioni GC>TA localizzate in alcune zone "calde" (i codoni 157, 158, 245, 248 e 273). L'analisi a livello della sequenza nucleotidica del gene p53 degli addotti BPDE legati alla guanina in posizione N² ha indicato che queste stesse posizioni sono modificate preferenzialmente dal cancerogeno.



Negli esempi discussi il rilevamento di addotti nel tessuto tumorale e di mutazioni riconducibili all'esposizione al cancerogeno in un gene rilevante nel processo di cancerogenesi formano un quadro complessivo di convincente associazione tra esposizione a cancerogeni ambientali, danno al DNA e formazione di tumori.

QUANTO LA SUSCETTIBILITÀ GENETICA INDIVIDUALE GIOCA UN RUOLO NEL DETERMINARE IL RISCHIO DI TUMORE?

Probabilmente molto. È noto da tempo che sia fattori genetici che ambientali (includendo non solo le esposizioni ambientali ma anche quelle alimentari e voluttuarie) concorrono allo sviluppo dei tumori. Sono stati identificati circa 500 geni coinvolti nella risposta ad agenti ambientali e tra questi sono da menzionare i geni del metabolismo dei cancerogeni, della riparazione del DNA e del ciclo cellulare. È presumibile che più alterazioni genetiche in geni di risposta ambientale a bassa penetranza siano responsabili di genotipi sfavorevoli a più elevato rischio di cancro.

Un gran numero di studi si sta pertanto concentrando sul risequenziamento di questi geni per poter identificare possibili varianti alleliche (polimorfismi), sull'analisi funzionale di queste varianti genetiche per capirne il significato biologico e su studi di popolazione che esaminano la distribuzione dei polimorfismi in relazione al rischio di diverse patologie.

L'avanzamento tecnologico (DNA *chips* e proteomica) è alla base di queste importanti aree di ricerca che permetteranno, attraverso una migliore comprensione della suscettibilità genetica agli agenti ambientali, di migliorare le stime di rischio e la protezione degli individui suscettibili.