

## La metilazione del DNA nella diagnostica: stato dell'arte e prospettive

Andrea Fuso<sup>1</sup>, Marco Lucarelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma

<sup>2</sup>Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma

### ABSTRACT

**DNA methylation in diagnostics: state of the art and perspectives.** DNA methylation is the most known and studied among the epigenetic modifications; these are chemical modifications occurring on DNA or histone proteins, able at modifying the transcriptional efficiency of genes. DNA methylation consists in the binding of a methyl group (-CH<sub>3</sub>) on the carbon n. 5 of a cytosine moiety. Recently, it has been demonstrated that methylated cytosines can be further modified to hydroxy-methyl-cytosines, but it is still unclear whether this transformation is just a demethylation intermediate or it can retain the functional role of an independent epigenetic modification. At first, DNA methylation has been studied for its physiological role in the regulation of gene expression during the different stages of the cell life, particularly during differential and embryogenesis. Then, during the last thirty years, it has been shown that the epigenetic modifications, particularly DNA methylation, are involved in the onset and progression processes of some pathologies. The role of DNA methylation in cancer processes is known since a long time, whereas only recently it becomes evident that this epigenetic modification is a component of some degenerative and aging-associated pathologies, particularly in neurodegenerative and inflammatory processes. Due to the incredible technical advances developed in the last years, it is now possible to study in detail the methylation pattern of a gene sequence with single cytosine resolution, rapidly and with high accuracy and precision. Besides allowing the rapid evolution of our knowledge of the physio-pathological states in which DNA methylation has a functional role, this favourable condition also allows us to consider the possible use of DNA methylation as diagnostic biomarker in different pathologies.

### INTRODUZIONE

La metilazione del DNA è regolata, a livello biochimico, dagli enzimi e dagli intermedi metabolici che costituiscono un *pathway* definito con termine inglese *one-carbon metabolism* (1). Si tratta di un complesso pathway biochimico, conosciuto anche come "ciclo dell'omocisteina" regolato, fra gli altri, dalla presenza di alcune vitamine del gruppo B (Folato, B12 e B6) e dalla colina. Fra gli intermedi del ciclo, la S-adenosilmetionina è il donatore di metili in tutte le reazioni catalizzate dalle DNA metiltransferasi (DNMTs). Oltre che trasferire i residui metilici sulle citosine del DNA, la S-adenosilmetionina regola anche l'attività di questi enzimi. Pertanto si intuisce facilmente come eventuali alterazioni di questo ciclo metabolico possano causare aberrazioni nei livelli di metilazione del DNA, che a loro volta, potrebbero avere conseguenze patologiche (2-4). L'attività enzimatica delle DNMTs è distinguibile in due reazioni: la metilazione di

mantenimento e la metilazione *ex novo*. La prima, catalizzata dalla DNMT1, agisce durante la replicazione cellulare, quando la molecola di DNA, metilata sui residui di citosina seguiti da una guanina (CpG), viene duplicata dando origine ad una molecola emimetilata, in cui cioè solo il filamento stampo conserva il gruppo metilico. La DNMT1 agisce a questo livello, riconoscendo le molecole emimetilate ed usandole come "stampo" per mutilare il filamento di DNA di nuova sintesi e mantenere così il pattern di metilazione della cellula madre. L'attività *ex novo*, catalizzata dalle DNMT3a e 3b, può invece manifestarsi anche in assenza di replicazione cellulare e di uno "stampo" emimetilato.

Poiché la metilazione, come tutte le modificazioni epigenetiche, è reversibile, esistono anche funzioni di demetilazione. La demetilazione passiva avviene durante la replicazione cellulare ed in assenza di attività metiltransferasica di mantenimento: man mano che le cellule si replicano, crescerà il numero di molecole di

Corrispondenza a: Andrea Fuso, Dip. di Medicina Sperimentale, c/o Dip. di Chirurgia "P. Valdoni", Via Antonio Scarpa, 16, 00161 Roma, Tel +390649766603, e-mail andrea.fuso@uniroma1.it

Ricevuto: 05.06.2019

Revisionato: 11.07.2019

Accettato: 27.07.2019

Pubblicato on-line: 02.10.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.064

DNA non metilate rispetto a quelle metilate. La demetilazione attiva consiste invece nella rimozione diretta del gruppo metilico in assenza di replicazione cellulare e duplicazione del DNA. Sembra ormai accertato che questo passaggio sia mediato dalle proteine *Ten-eleven Translocation methylcytosine dioxygenase* (TET) che inducono l'idrossilazione della metil-citosina. L'idrossimetil-citosina così formata viene ulteriormente ossidata a formil-citosina e carbossil-citosina con successiva deaminazione idrolitica e sostituzione con una citosina non metilata, risultando al netto in una reazione di demetilazione. Data la rapidità di trasformazione, rispetto alla relativa stabilità della metilazione, l'idrossimetilazione e le successive modificazioni ossidative ancora non hanno trovato un posto certo fra le modificazioni epigenetiche e potrebbero rivelarsi solo degli intermedi della demetilazione, benché siano allo studio per il loro possibile ruolo nella regolazione dell'espressione genica. Il ruolo della metilazione del DNA nel silenziamento genico è invece conosciuto da tempo ed è basato sulla capacità di questa modificazione di impedire il legame al DNA dei fattori di trascrizione. Questa capacità passa attraverso il reclutamento di specifiche proteine che riconoscono il DNA metilato (*methyl binding proteins*) e che possono inibire direttamente il legame dei fattori di trascrizione competendo per i siti di legame, oppure possono agire inducendo un silenziamento più stabile tramite la deacetilazione degli istoni e la conseguente compattazione cromatinica (5).

Eseguendo una ricerca sulla banca dati PubMed, si può notare come gli articoli scientifici relativi a studi epigenetici abbiano visto un incremento incredibile negli ultimi 20 anni, passando da circa 300 articoli pubblicati nel 2000 a oltre 10 000 articoli nel 2018. L'aumento nell'interesse per le modificazioni epigenetiche trova una ragione in due motivi principali: l'evoluzione tecnica che permette di studiare molto più nel dettaglio le modificazioni epigenetiche e l'evidenza che queste sono coinvolte in molte patologie.

## LE TECNICHE PER LO STUDIO DELLA METILAZIONE

Negli ultimi anni, i progressi nelle tecniche biochimiche utilizzate per lo studio delle modificazioni epigenetiche sono stati impressionanti, particolarmente per quel che concerne lo studio della metilazione del DNA. Un riassunto schematico delle principali tecniche è riportato nella Tabella 1. In origine era possibile studiare la presenza di 5-metil-Citosina (5mC) solamente a livello genomico globale, tramite idrolisi del DNA ed analisi cromatografica (6). Benché migliorata con l'avvento dell'elettroforesi capillare, questo tipo di analisi è limitata dalla gran quantità di materiale di partenza necessario e dal fatto che le informazioni ottenute non permettono di determinare la metilazione di specifiche regioni del DNA, cosa invece necessaria per capirne la funzione. Oggi sono comunemente usati,

da soli o in combinazione, tre approcci, che risultano quindi in un ampio pannello di saggi che permettono di studiare vari aspetti della metilazione del DNA a livello sequenza-specifico e con risoluzione sulla singola citosina: digestione del DNA con endonucleasi metilazione-sensibili, modificazione con bisolfito di sodio seguita da amplificazione in Polymerase Chain Reaction (PCR) e purificazione della frazione metilata con anticorpi specifici (7).

Fra queste, la modificazione con bisolfito, che converte selettivamente le citosine non metilate in uracili, è sicuramente la più utilizzata e alla base delle analisi più complesse (8-10). Queste tecniche possono essere anche combinate con approcci su scala genomica con risoluzione a singola citosina, come fingerprint o microarrays, fornendo l'opportunità di analizzare sequenze multiple (analisi *genome-wide*) e investigare possibili nuovi marcatori.

Uno dei primi approcci usati per l'analisi della metilazione *genome-wide* è stato il *restriction landmark genomic scanning* (RLGS), in cui il DNA genomico è digerito con una endonucleasi metilazione-sensibile, marcato al sito di taglio e frazionato per dimensione (11). Successivamente, il DNA frazionato è ulteriormente digerito con un'altra endonucleasi e separato. Si ottiene così un profilo bi-dimensionale con migliaia di segnali che rappresentano le sequenze non metilate e che permette un confronto con altri profili per individuare siti di metilazione differenziale. I segnali individuati a seguito del confronto possono essere isolati ed identificati.

Un altro metodo basato sull'uso di endonucleasi metilazione-sensibili è il *Methylated CpG-island Amplification* (MCA) (12). Il DNA viene digerito con l'enzima *SmaI* (CCCGGG), che taglia i siti non-metilati lasciando estremità pari, e successivamente con l'isoschizomero *XmaI*, che taglia i siti metilati lasciando estremità protrudenti cui viene legato uno specifico adattatore. La sequenza dell'adattatore viene usata per il riconoscimento da parte dei primers nella successiva reazione di PCR. Questa tecnica è simile a quella denominata *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS) in cui la prima digestione viene effettuata con un enzima non sensibile alla metilazione (generalmente *MspI* che riconosce la sequenza CCGG); sul sito di taglio viene quindi legato un adattatore e il DNA frammentato (arricchito in siti CpG per via dell'endonucleasi utilizzata) viene modificato con bisolfito per identificare i siti di metilazione. Per ottimizzare la parte più complessa, ovvero l'identificazione differenziale di sequenze metilate attraverso la *representational difference analysis* (RDA), la tecnica è spesso associata ad analisi su microarray. Alternativamente, l'approccio basato su MCA può essere usato nella *Amplification of intermethylated sites* (AIMS) in cui i prodotti di PCR sono risolti in gel di poliaccrilammide così da generare un profilo di bande che rappresenta il metiloma della cellula (13).

**Tabella 1**  
Tecniche per lo studio della metilazione

Tecnica	Sigla	Breve descrizione	Riferimenti
Modificazione con bisolfito		DNA modificato con bisolfito che trasforma le citosine NON-metilate in uracili. Vari metodi di analisi finale.	8-10
Restriction Landmark Genomic Scanning	RLGS	DNA digerito con endonucleasi metilazione-sensibile, marcato e frazionato, ulteriormente digerito con ulteriore endonucleasi e separato. Si genera un profilo bi-dimensionale delle sequenze non metilate, confrontabile con altri profili per individuare metilazione differenziale.	11
Methylated CpG-island Amplification	MCA	DNA digerito con endonucleasi <i>SmaI</i> (CCCGGG), che taglia i siti non-metilati lasciando estremità pari, e successivamente con l'isoschizomero <i>XmaI</i> , che taglia i siti metilati lasciando estremità protrudenti cui viene legato uno specifico adattatore usato nella successiva reazione di PCR.	12
Reduced Representation Bisulfite Sequencing	RRBS	DNA digerito con endonucleasi <i>MspI</i> , non sensibile alla metilazione (CCGG); sul sito di taglio viene legato un adattatore con conseguente arricchimento in siti CpG. Il DNA frammentato viene modificato con bisolfito.	13
Representational Difference Analysis	RDA	Ottimizza l'identificazione differenziale di sequenze metilate ottenute con MCA grazie all'associazione con analisi su microarray.	13
Amplification of Intermethylated Sites	AIMS	Basato su MCA con i prodotti di PCR risolti in gel di poliacrilammide; genera un profilo di bande che rappresenta il metiloma	13
Microarrays	Litografici (Affymetrix) Litografici adattivi (NimbleGen) Inkjet (Agilent) Beadarray (Illumina)	In tutti questi saggi, gli arrays contengono un certo numero di sequenze CpG conosciute e vengono ibridizzati con un campione arricchito in sequenze CpG-dense ottenuto dopo digestione del DNA genomico con endonucleasi metilazione-sensibili. In alternativa arrays per l'uso con DNA modificato con bisolfito spottati con oligonucleotidi specifici per le versioni metilate o non-metilate delle sequenze di interesse. Il rapporto fra siti metilati e non-metilati è ottenuto paragonando l'ibridazione dei due diversi oligonucleotidi.	14-17
Chromatin Immuno-Precipitation	ChIP-on-chip	Ibridizzazione del DNA immunoprecipitato con un anticorpo anti-CpG-methyl-binding domains (MBDs) su un microarray di CpGs islands	18
Methyl-DNA Immuno-Precipitation	MeDIP	Immunoprecipitazione diretta con un anticorpo anti-5mC; più efficiente sulle isole CpG	19
Comparative Genomic Hybridization	CGH	Analisi differenziale della metilazione nelle patologie basata sulla Comparative Genomic Hybridization, dopo modificazione con bisolfito	20
Quantitative Analysis of Methylated Alleles	QAMA	Software per l'analisi differenziale della metilazione.	20

I microarrays sono utilizzati in diversi metodi per lo studio della metilazione del DNA a livello genomico (14-15), grazie alla messa in commercio di specifici arrays di diverso tipo: litografici (Affymetrix; S. Clara, CA, USA), litografici adattivi (NimbleGen-Roche; Basel, Switzerland), *inkjet* (Agilent; S. Clara, CA, USA) e *beadarray* (Illumina; S. Diego, CA, USA). In tutti questi saggi, gli arrays contengono un certo numero di sequenze CpG conosciute e vengono ibridizzati con un campione arricchito in sequenze CpG-dense (CpG islands) ottenuto dopo digestione del DNA genomico con endonucleasi metilazione-sensibili. Sono stati disegnati anche arrays per l'uso con DNA modificato con bisolfito. In questo caso la strategia standard prevede l'uso di arrays che portano legati oligonucleotidi specifici per le versioni metilate o non-metilate delle sequenze di interesse. Il rapporto fra siti metilati e non-metilati è ottenuto paragonando l'ibridazione dei due diversi oligonucleotidi per ciascun sito (16-17).

Sono state messe a punto anche delle tecniche per lo studio della metilazione basate sull'immunoprecipitazione mediante un approccio ChIP-on-chip, ad esempio ibridizzando il DNA immunoprecipitato con un anticorpo che riconosce dei *CpG-methyl-binding domains* (MBDs) su un microarray di CpGs islands (18). E' stata anche sviluppata una nuova tecnologia di purificazione del DNA metilato, maggiormente efficiente sulle isole CpG, basata sull'immunoprecipitazione diretta (*methyl-DNA immunoprecipitation*, MeDIP) con un anticorpo anti-5mC (19).

Infine, sembra molto promettente il recente approccio basato sulla *comparative genomic hybridization* (CGH) e la *quantitative analysis of methylated alleles* (QAMA), soprattutto per quanto riguarda l'analisi differenziale della metilazione nelle patologie (20).

## LE "PATOLOGIE EPIGENETICHE"

Per fare un parallelo con la frequenza di pubblicazioni inerenti l'epigenetica, nel 2000, per pochissime patologie umane veniva riportata un'associazione certa con modificazioni epigenetiche, specificamente la metilazione del DNA: i tumori, la sindrome dell'X fragile, la sindrome *Immunodeficiency, Centromere instability and Facial abnormalities* (ICF) e la sindrome di Rett. La metilazione del DNA può essere coinvolta nella tumorigenesi in differenti modi, principalmente in quanto la 5mC è un *hotspot* mutazionale e anche perché variazioni anomale della metilazione, ovvero la ipermetilazione di oncosoppressori e la ipometilazione di oncogeni, possono contribuire all'insorgenza di un fenotipo cellulare tumorale (21). La sindrome dell'X Fragile è caratterizzata da ritardo mentale causato dall'espansione e relativa ipermetilazione della tripletta CGG nella regione non trascritta al 5' del gene *fragile X mental retardation-1* (FMR1), con conseguente

repressione del gene. Le sindromi ICF e Rett sono caratterizzate da mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nella regolazione della metilazione del DNA (22-23). La ICF è caratterizzata da estrema suscettibilità alle infezioni (per immunodeficienza), dismorfismi, difetti di crescita e ritardo psicomotorio causate da mutazioni del gene *DNMT3b*, che codifica per la DNA metiltransferasi *de novo*. La Rett è una patologia neurologica associata a disfunzioni cognitive e ritardo nello sviluppo cerebrale causate da mutazioni nel gene *MeCP2*, che codifica per una *Methyl-CpG-binding protein*.

Oggi sappiamo che alterazioni della metilazione del DNA sono associate ad un gran numero di patologie e sono il risultato di differenti meccanismi. Molte patologie associate a livelli di metilazione aberranti, ad esempio, mostrano alterazioni dell'imprinting basate sulla metilazione. Fra questi vale la pena citare: le sindromi di Angelman, di Silver-Russell, di Prader-Willi e di Beckwith-Wiedemann, il diabete, la schizofrenia e le sindromi autistiche (24). Emerge di recente come anche molte patologie legate all'invecchiamento abbiano una base, o almeno una componente, epigenetica. Fra queste vanno ovviamente annoverate anche i tumori ed il diabete, ma in particolare si fa riferimento a patologie neurodegenerative quali la malattia di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la demenza frontotemporale (FTD) (25). In molti di questi casi, è stato evidenziato come le alterazioni della metilazione del DNA possano essere indotte in maniera indipendente dall'imprinting genomico ed essere piuttosto conseguenze di fattori ambientali che includono lo stress fisico e mentale, le deficienze nutrizionali, l'esposizione ad inquinanti o specie chimiche (4, 26, 27). L'associazione fra stimoli ambientali e modificazioni epigenetiche è anche molto evidente nel caso di patologie con base autoimmune, fra cui ad esempio il Lupus Eritematoso Sistemico (SLE) e l'Artrite Reumatoide (RA), in cui sono state evidenziate alterazioni della metilazione sequenza-specifiche in geni coinvolti nella funzione immunitaria (28).

Anche nel caso delle patologie cardiovascolari, è stato recentemente dimostrato che la metilazione del DNA può giocare un ruolo in quanto coinvolta nell'omeostasi delle cellule muscolari lisce e di quelle endoteliali. E' noto che alterazioni nella proliferazione, migrazione, differenziamento ed apoptosi di queste cellule sono responsabili di condizioni patologiche associate a malattie cardiovascolari come l'aterosclerosi, l'ipertrofia cardiomiocitaria e l'infarto. Pertanto è possibile ipotizzare che modificazioni epigenetiche, indotte dall'ambiente e in primo luogo dalle abitudini nutrizionali (29), possano essere direttamente coinvolte nell'insorgenza delle patologie cardiovascolari.

Nella maggior parte dei casi elencati è stato possibile individuare alterazioni della metilazione a carico di specifici geni associati ad una o più patologie. In alcuni, inoltre, le alterazioni sono dovute a mutazioni a carico di

geni che codificano per fattori della metilazione. Ad esempio mutazioni nella DNA metiltransferasi 1 (DNMT1) che causano perdite di funzione dell'enzima e conseguente alterazione dei profili di metilazione, sono responsabili dell'insorgenza di forme ereditarie di neurodegenerazione centrale e periferica fra cui demenza, neuropatia degli organi di senso, perdita dell'udito, atassia cerebellare e narcolessia (30). Anche l'alterazione dell'espressione o delle funzioni delle DNA metiltransferasi può essere associata alla neurodegenerazione. Ad esempio, l'overespressione di DNMT3a induce neurodegenerazione e apoptosi cellulare in pazienti con ALS (31).

Il gene *Frataxin* porta la caratteristica ripetizione GAA responsabile dell'insorgenza dell'Atassia di Friederick, ma è stato anche dimostrato che l'espressione del gene mutante è regolata dal pattern di metilazione in relazione all'età di insorgenza e alla severità del fenotipo (32).

Il gene *Ataxin-2* è coinvolto in un'altra forma di atassia, l'Atassia Spinocerebellare di tipo 2. In questo caso la ripetizione CAG del gene mutante è responsabile solo in parte della grande differenza di fenotipi riscontrati; anche in questo caso la metilazione del gene ne regola l'espressione nonché la gravità del fenotipo e l'età di insorgenza (33). Questo gene è coinvolto anche in altre patologie, ovvero PD, ALS e FTD ed è quindi possibile ipotizzare che sia responsabile almeno in parte della componente epigenetica associata a queste malattie. Nelle forme sporadiche di PD, la componente epigenetica si manifesta anche con l'alterazione della metilazione del gene *SNCA*: il promotore è ipometilato nella corteccia, nella substantia nigra e nel putamen di pazienti affetti da PD. Altri loci associati al rischio di insorgenza di PD sono stati trovati differenzialmente metilati ed espressi nella corteccia e nel cervelletto (*PARK16*, *GPNMB*, *ST1B*) (34).

Nell'ambito delle malattie neurodegenerative, l'AD è sicuramente quella più studiata a causa della sua diffusione e del relativo peso clinico e socio-economico conseguente; inoltre, l'AD è anche paradigmatica in quanto la sua eziologia altamente multifattoriale chiama in causa una componente epigenetica (35-36). Il nostro gruppo di ricerca, ad esempio, ha dimostrato che il gene *Presenilin1* (*PSEN1*), che codifica per una delle proteasi responsabili della formazione del peptide beta-amiloide caratteristico dell'AD, è modulato da metilazione in un modello murino di neurodegenerazione (37) e che il promotore risulta differenzialmente metilato nel cervello e nel sangue di pazienti AD rispetto ai controlli (dati in pubblicazione).

## BIOMARCATORI EPIGENETICI

Nonostante siano ormai state descritte molte regioni del DNA metilate in maniera differente nei pazienti rispetto ai controlli, per alcuni di questi loci è sicuramente necessario un ulteriore approfondimento per capire:

quanto la metilazione differenziale sia confermata su un gran numero di pazienti e quindi caratterizzante e se l'associazione individuata sia funzionalmente associata alla patologia. Nel momento in cui queste condizioni saranno confermate, si potrà dunque pensare che la metilazione differenziale di specifici residui di citosina di un dato gene/promotore possa essere utilizzata come marcatore biologico nella pratica clinica. L'uso della metilazione sequenza-specifica come marcatore biologico ha le premesse per essere utilizzato sia come marcatore per la diagnosi della malattia sia, nel caso in cui vengano applicate anche "terapie epigenetiche", come marcatore di progressione e di efficacia del trattamento.

Anche in questo caso, quello che sembra essere il primo possibile campo di applicazione è rappresentato dalle patologie tumorali in cui è stata evidenziata l'ipermetilazione del promotore di geni oncosoppressori. In questi casi, non solo uno specifico pattern di metilazione può essere facilmente misurato e fornire così uno strumento diagnostico precoce, ma può anche costituire una risorsa molto utile per caratterizzare il sottotipo tumorale, l'aggressività e la risposta al trattamento (38). L'alterazione del pattern di metilazione osservato nei tumori è generalmente caratterizzata da ipometilazione globale associata ad ipermetilazione di geni specifici (ovvero i sopra citati oncosoppressori metilati nelle regioni dei promotori) che sono quelli che costituiscono i biomarcatori epigenetici più promettenti e spesso riflettono il potenziale metastatico e la sensibilità alla terapia. Per caratterizzare questi patterns, i metodi basati sull'amplificazione in PCR del DNA modificato con bisolfito di sodio sono generalmente riconosciuti e accettati come i più sensibili e specifici dal punto di vista analitico per studiare la metilazione del DNA a livello di singoli loci. Tali metodi sono oggi complementati da tecniche recenti come ad esempio la *Methylation-specific fluorescent amplicon generation* (MS-FLAG), la *Methylation-sensitive high-resolution melting* (MS-HRM) e la *Sensitive melting analysis after real-time methylation-specific PCR* (SMART-MSP). Fra queste la HRM, che sfrutta la differente temperatura di dissociazione di un amplicone in base alla presenza di coppie CG, caratteristiche del DNA metilato dopo modificazione con bisolfito, è di particolare interesse come strumento diagnostico per via del costo contenuto (39-40).

Alcuni di questi loci sono già in uso nella diagnostica dei tumori; ad esempio la metilazione del gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) è riconosciuta come il marcatore prognostico/predittivo per il glioblastoma benché non sia ancora un'analisi molto diffusa nella gestione del paziente (41). Però, in generale, nonostante le numerose evidenze che legano l'alterazione della metilazione a livello gene-specifico con l'insorgenza o la progressione tumorale, ancora pochissimi geni sono utilizzati come biomarcatori tumorali nella pratica della biochimica clinica. Alcuni geni che mostrano anomalie di metilazione in specifici tipi di tumore solido (colon, pancreas, prostata, vescica,

mammella e ovario) sono comunque ben caratterizzati e catalogati e potrebbero essere utilizzati come biomarcatori dando il via a screening basati sull'analisi di metilazione non solo in biopsie fissate in paraffina, ma anche da prelievi di sangue o urine (42) laddove l'alterazione della metilazione di uno specifico gene sia sistemica o dove ci siano cellule tumorali presenti nei fluidi corporei. Alcuni dei principali marcatori già in uso nella pratica clinica sono riportati in alcune recenti rassegne (43-46). Fra questi, *ALX4*, *FBN2*, *HLTF*, *P16*, *TMEFF1* e *VIM* ipermetilati sono associati ad una prognosi negativa, *APC*, *NEUROG1*, *RASSF1A*, *RASSF2A*, *SDC2*, *SEPT9*, *TAC1* e *THBD* ipermetilati sono stati individuati negli stadi precoci del cancro coloretale mentre *P16* e *TFPI2* sono associati con le recidive di questo tumore. E' stato anche possibile individuare l'ipermetilazione di *BMP3*, *PHACTR3*, *SFRP2*, *SPG20*, *TFPI2* e *TMEFF2* in campioni fecali in associazione con gli stadi precoci del cancro coloretale (43-45). Infine, la metilazione del gene *PITX2* (paired-like homeodomain transcription factor 2) è un promettente marcatore di progressione per vari tipi di tumore ed è particolarmente interessante nel caso del carcinoma mammario (46). I marcatori analizzati sono stati misurati sia in campioni di sangue intero o leucociti, sia nel plasma o nel siero, benché questi ultimi saggi necessitino di ulteriori controlli e validazioni.

Anche nell'ambito delle patologie a carico del sistema nervoso, la perturbazione dei meccanismi epigenetici è emersa come caratteristica centrale; molte di queste alterazioni sono misurabili nei tessuti centrali e, occasionalmente, periferici. Mentre nel primo caso la possibilità di usare le modificazioni epigenetiche come biomarcatori è ovviamente molto limitata dal difficile accesso a biopsie di tessuto, nel caso le modificazioni siano presenti a livello sistemico potranno avere un significativo valore traslazionale come biomarcatori per lo screening, la diagnosi precoce e la prognosi. L'unica possibilità di misurare eventi epigenetici ristretti al sistema nervoso centrale, è dato dall'analisi delle cellule eventualmente presenti nel liquor; nonostante la scarsità di questo materiale, la sensibilità delle tecniche per lo studio della metilazione, che si spinge fino al livello di singola cellula, può comunque garantire l'esecuzione dell'analisi. Come per i tumori, questi marcatori sono molto promettenti anche per lo sviluppo di terapie personalizzate e per monitorare la progressione e le risposte al trattamento (47). Ad oggi, sono stati indicati un numero molto elevato di geni caratterizzati dalla presenza di profili di metilazione alterati a carico dei loro promotori. Un elenco di quelli che hanno fornito i risultati più consistenti include: *B3GALT4*, *ZADH2*, *RIN3*, *MEF2C*, *ANK1*, *BIN1*, *RHBDF2*, oltre al già citato *PSEN1* attualmente in studio dal nostro gruppo di ricerca (36, 48-50). La metilazione di questi loci correla molto bene con i risultati dei test neurologici e con i marcatori biochimici classici dell'AD, ovvero la presenza di amiloide 1-42 e tau iperfosforilata nel sangue e nel liquor. Come in altri casi, la validità di tali marcatori andrà verificata nel sangue dei pazienti in studi clinici sufficientemente ampi.

Benché le patologie tumorali e quelle neurodegenerative rappresentino al momento gli ambiti applicativi più promettenti per l'introduzione di marcatori epigenetici nella pratica clinica, l'interesse si è allargato anche alle altre patologie caratterizzate da una componente epigenetica, come ad esempio il diabete (51) e le patologie allergiche (52).

## CONCLUSIONI

L'utilizzo della metilazione del DNA come marcatore biologico risulta molto attraente considerando l'attuale orizzonte della terapia clinica che si sta orientando sempre di più verso la medicina personalizzata. Infatti, il pattern di metilazione individuale di un dato gene target, può fornire indicazioni molto importanti per caratterizzare una patologia a livello individuale e per predire la risposta ai trattamenti farmacologici. Inoltre l'applicazione in campo diagnostico è favorita dalla stabilità dell'analita target, cioè il DNA, e dall'accuratezza, precisione, sensibilità e risoluzione molto elevate dei saggi, potenzialmente in grado di rivelare il pattern di metilazione a livello di singola citosina. Per contro, proprio la variabilità individuale, che caratterizza le modificazioni epigenetiche, potrebbe rappresentare una potenziale complicazione perché diminuisce la predittività clinica dei saggi. In molti casi, anche a causa di un insufficiente potere statistico degli studi effettuati, i geni esaminati non hanno mostrato il potenziale per essere utilizzati come marcatori diagnostici individuali, suggerendo l'opportunità di concepire dei pannelli costituiti da più geni. Sarà quindi necessario validare le analisi proposte su coorti di pazienti molto numerose per poter stabilire valori quantitativi e pattern di metilazione di riferimento adeguati.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging*. 2002;6:39-42.
- Borro M, Cavallaro RA, Gentile G, et al. One-carbon metabolism alteration affects brain proteome profile in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;22:1257-68.
- Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiol Aging*. 2011;32:1192-5.
- Nicolia V, Lucarelli M, Fuso A. Environment, epigenetics and neurodegeneration: Focus on nutrition in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2015;68:8-12.
- Fuso A. Aging and Disease: the epigenetic bridge. In: Tollefsbol TO, ed. *Epigenetic in human disease*; 2nd edition. London: Elsevier Science Publisher, 2018:935-974.
- Saluz H, Jost JP. Major techniques to study DNA methylation. *EXS* 1993;64:11-26.
- von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss*

- Med Wkly 2013;143:w13799.
8. Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 1990;10:4987-9.
  9. Fuso A, Scarpa S, Grandoni F, et al. A reassessment of semiquantitative analytical procedures for DNA methylation: comparison of bisulfite- and HpaII polymerase-chain-reaction-based methods. *Anal Biochem* 2006;350:24-31.
  10. Fuso A, Ferraguti G, Scarpa S, et al. Disclosing bias in bisulfite assay: MethPrimers underestimate high DNA methylation. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118318.
  11. Kawai J, Hirotsune S, Hirose K, et al. Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5604-8.
  12. Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-12.
  13. Sadikovic B, Haines TR, Butcher DT, et al. . Chemically induced DNA hypomethylation in breast carcinoma cells detected by the amplification of intermethylated sites. *Breast Cancer Res* 2004;6:R329-37.
  14. Fazzari MJ, Grealley JM. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods Mol Biol* 2010;620:243-65.
  15. Fouse SD, Nagarajan RO, Costello JF. Genome-scale DNA methylation analysis. *Epigenomics*2010;2:105-217.
  16. Shi H, Maier S, Nimmrich I, et al. Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications. *J Cell Biochem* 2003;88:138-43.
  17. Rauch TA, Pfeifer GP. DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods* 2010;52:213-7.
  18. Sørensen AL, Collas P. Immunoprecipitation of methylated DNA. *Methods Mol Biol* 2009;567:249-62.
  19. Pålmeke N, Santacruz D, Walter J. Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods* 2011;53:175-84.
  20. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:315-24.
  21. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol*. 2000;183:145-54.
  22. Hendrich B. Methylation moves into medicine. *Curr Biol* 2000;10:R60-63.
  23. Kumar A. Rett and ICF syndromes: methylation moves into medicine. *J Biosci* 2000;25:213-4.
  24. Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, et al. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 1999;154:635-47.
  25. Lill CM, Bertram L. Towards unveiling the genetics of neurodegenerative diseases. *Semin Neurol* 2011;31:531-41.
  26. Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, et al. Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology* 2012;33:833-7.
  27. Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2009;667:82-97.
  28. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med* 2011;12:535-45.
  29. Zaina S, Lund G. Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4:261-74.
  30. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 2011;43:595-600.
  31. Chestnut BA, Chang Q, Price A, et al. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J Neurosci* 2011;31:16619-36.
  32. Evans-Galea MV, Carroddus N, Rowley SM, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 2012;71:487-97.
  33. Laffita-Mesa JM, Bauer PO, Kourí V, et al. Epigenetics DNA methylation in the core ataxin-2 gene promoter: novel physiological and pathological implications. *Hum Genet* 2012;131:625-38.
  34. International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genet* 2011;7:e1002142.
  35. Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2008;3:e2698.
  36. Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, et al. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis* 2012;29:571-88.
  37. Fuso A, Nicolia V, Ricceri L, et al. S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice. *Neurobiol Aging*2012;33:1482.e1-16.
  38. Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem*. 2004;37:595-604.
  39. Khandige S, Shanbhogue VV, Chakrabarty S, et al. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward. *Oncol Res* 2011;19:105-10.
  40. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:219-40.
  41. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011;21:74-87.
  42. Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1707-21.
  43. Noehammer C, Pulverer W, Hassler MR, et al. Strategies for validation and testing of DNA methylation biomarkers. *Epigenomics* 2014;6:603-22.
  44. Henriksen SD, Madsen PH, Krarup H, et al. DNA Hypermethylation as a Blood-Based Marker for Pancreatic Cancer: A Literature Review. *Pancreas*. 2015;44:1036-45.
  45. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, et al. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis* 2016;18:549-61.
  46. Aubele M, Schmitt M, Napieralski R, et al. The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Dis Markers* 2017;2017:4934608.
  47. Qureshi IA, Mehler MF. Developing epigenetic diagnostics and therapeutics for brain disorders. *Trends Mol Med*. 2013;19:732-41.
  48. Madrid A, Hogan KJ, Papale LA, et al. DNA Hypomethylation in Blood Links B3GALT4 and ZADH2 to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018;66:927-34.
  49. Boden KA, Barber IS, Clement N, et al. Methylation Profiling RIN3 and MEF2C Identifies Epigenetic Marks

- Associated with Sporadic Early Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Rep* 2017;1:97-108.
50. De Jager PL, Srivastava G, Lunnon K, et al. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci* 2014;17:1156-63.
  51. Montagnana M, Lippi G, Danese E. Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. *Biochim Clin* 2018;42:97-103
  52. De Palma FDE, Paparo L, Nocerino R. Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino. *Biochim Clin* 2018;42:103-11.