

LE NOVITÀ NELLA BIOLOGIA. NASCITA E PROSPETTIVE DELL'EPIGENETICA

di Carlo Soave *

Per molti anni il termine epigenetica ha suscitato parecchie perplessità nel mondo scientifico, come se affermare l'influenza dell'ambiente sull'evoluzione implicasse un ritorno al lamarckismo. Oggi è più chiaro (vedi Enciclopedia Treccani) che l'epigenetica si fonda su «modifiche chimiche, a carico del DNA o delle regioni che lo circondano, che non coinvolgono cambiamenti nella sequenza dei nucleotidi.» I segnali epigenetici, di origine ambientale, sono in grado di influenzare il funzionamento dei geni. Perciò oggi in biologia si parla di «rivoluzione epigenetica» con importanti ricadute anche sul modo di concepire l'evoluzione. Una ricostruzione della nuova area di indagine che parte da lontano, traccia i primi passi (per esempio rilegge il lavoro di Waddington) e illustra le ricerche più recenti.

* Professore Ordinario di Fisiologia vegetale, Università degli Studi di Milano

Certamente la biologia ha qualcosa da dire sull'uomo e su questo penso siamo tutti d'accordo. Ma il biologo, lo scienziato biologo, ha qualcosa da dire sull'uomo? Un grande biologo, Stephen Jay Gould (1941-2002), sosteneva il principio NOMA (*Non Overlapping Magisteria*) tra scienze naturali e scienze umane: la filosofia (e la teologia) da una parte e la scienza dall'altra (quindi anche le scienze naturali e in particolare le teorie evoluzioniste che nascono dalle scienze biologiche) non possono mai entrare in conflitto perché le due discipline si muovono in ambiti completamente diversi. Sottesa a questa posizione c'è l'idea che i filosofi facciano il loro mestiere (tra cui quello di dire quali sono le domande fondamentali dell'uomo) e gli scienziati il loro dove, per definizione, quelle domande non hanno posto. Tuttavia, uno scienziato che indaga la natura è mosso dal desiderio di rispondere alle domande fondamentali: chi sono, da dove vengo, dove vado; ma anche da dove viene e dove va la specie umana e, più in generale, da dove vengono e dove vanno gli organismi viventi e il pianeta intero e l'Universo. È illusorio quindi pensare che gli scienziati che praticano le scienze naturali, certamente materialiste dal punto di vista metodologico, possano arrestarsi sul confine dove inizia la riflessione filosofica: bisogna però che questi «sconfinamenti» siano espressamente dichiarati, condotti con il necessario rigore e infine continuamente verificati alla luce del progresso delle conoscenze scientifiche.

L'epigenetica, soprattutto nei suoi sviluppi più recenti conseguenti al sequenziamento dei genomi, è uno di quegli «avanzamenti» conoscitivi che obbligano a un ripensamento profondo della «natura» degli organismi viventi, uomo compreso.

Epigenetica: le origini

La storia inizia nel 1896 (non si parlava allora di genetica e tanto meno di epigenetica) quando l'americano James Mark Baldwin, psicologo dell'età evolutiva, pubblica su *American Naturalist*, un articolo dal titolo *A new factor in evolution* [1].

Il nuovo fattore, passato alla storia con il nome di «effetto Baldwin» prendeva in considerazione la ben nota capacità degli organismi viventi di adattarsi, durante la loro vita, a nuove condizioni ambientali, a volte anche molto avverse. Questa capacità,



James Mark Baldwin (1861-1934)

sosteneva Baldwin, permette agli organismi di sopravvivere e riprodursi nel nuovo ambiente, generando figli capaci anch'essi di adattarsi e di sopravvivere nelle nuove condizioni fino a che, col passare delle generazioni, si selezionano quei varianti (mutanti) che rendono stabilmente incorporati nel programma genetico di sviluppo quei caratteri inizialmente emersi a seguito dell'adattamento.

Questo concetto, efficacemente sintetizzato da Mary Jane West-Eberhard (biologa evolutiva dello *Smithsonian Tropical Research Institute* di Costa Rica n.d.r.) [2] con l'aforisma «*phenotype first, genotype follows*», non ebbe buona accoglienza da parte dei biologi di allora.

Si veda per esempio Wilhelm Ludwig Johannsen, uno dei padri della genetica quantitativa: «*The genotype-conception [of heredity] is an ahistoric view of the reactions of living beings.[...]. I suggest that it is useful to emphasise this radical ahistoric genotype-conception of heredity in its strict antagonism to the phenotype-view.* [3]» (si noti l'enfasi sulla irrilevanza degli adattamenti - le *reaction of living beings* - nell'ereditarietà). Nella concezione neodarwiniana infatti gli accomodamenti fenotipici possono avere conseguenze evolutive, cioè possono essere ereditati, solo se sono associati a una *preesistente* variabilità genetica nella popolazione: in altre parole la costruzione di un nuovo fenotipo «adatto» al nuovo ambiente dipende dalla selezione di *preesistenti* varianti genetiche presenti nella popolazione. L'effetto Baldwin invece può operare senza questa *preesistente* variabilità genetica: il fenotipo è in grado di adattarsi lasciando tempo e spazio a che il genotipo, con il susseguirsi delle generazioni, possa cambiare (*genotype follows*).

Al fondo è la considerazione riservata allo «sviluppo», al ciclo della vita di ogni vivente, che differenzia le due posizioni: irrilevante nella visione neodarwinista totalmente genocentrica (l'evoluzione come cambiamento nella frequenza dei geni nella popolazione), centrale invece relativamente ai meccanismi dello sviluppo all'interno delle dinamiche evolutive nella visione di Baldwin nel solco classico dei biologi ottocenteschi. C'era però anche un altro elemento in gioco, il sapore lamarckiano della teoria di Baldwin che contrastava con la dottrina di Weismann (August Weismann, 1834-1914, n.d.r.) secondo la quale negli organismi multicellulari la trasmissione ereditaria avviene solo attraverso le cellule germinali e tutte le modificazioni che le cellule del corpo (le cellule somatiche) subiscono durante la loro vita non sono trasmesse alle cellule germinali: l'informazione quindi è a senso unico, dalle cellule germinali alle cellule somatiche, ma non viceversa [4].

Epigenetica: i primi passi

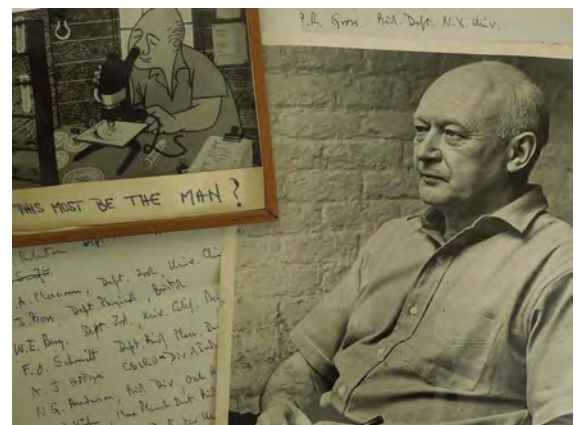
Le idee di Baldwin non andarono comunque totalmente perdute: l'idea dell'adattabilità individuale a nuove condizioni di vita e del ruolo giocato dai comportamenti acquisiti da organismi cresciuti in diversi ambienti nel successivo processo evolutivo furono ripresi da vari autori tra cui Conrad Hal Waddington, genetista ed embriologo, particolarmente interessato ai meccanismi causali attraverso i quali i geni producono effetti fenotipici, in particolare determinano la forma di un organismo agendo durante lo sviluppo.

Waddington nel 1953 introduce un termine, *epigenetics* (epigenetica), per indicare lo studio di cosa connette il genotipo al fenotipo durante tutto il ciclo vitale del vivente e, ben consapevole che l'ambiente in cui si sviluppa l'organismo vivente può modificare la sua forma producendo fenotipi diversi, conia anche il termine di *epigenetic landscape* (paesaggio epigenetico) per indicare l'insieme di fenotipi che un determinato genotipo può produrre quando esposto a diversi ambienti durante lo sviluppo. L'assimilazione genetica è il meccanismo da lui proposto attraverso il quale un carattere acquisito (cioè un carattere indotto da uno stimolo ambientale) può diventare obbligatoriamente espresso anche in assenza dello stimolo e trasmesso alle generazioni successive, cioè ereditato [5].

Un passo in avanti viene compiuto cinque anni dopo da Nanney che, in un articolo pubblicato sui *Proceedings of the National Academy of Sciences*, estende il significato del termine epigenetica: non ci si riferisce più ai meccanismi che connettono il genotipo al fenotipo, ma piuttosto ai meccanismi dell'eredità cellulare non basati sulla replicazione semiconservativa del DNA e quindi non dipendenti dalla sequenza del DNA [6].



Wilhelm Ludwig Johannsen (1857-1927)



Conrad Hal Waddington (1905-1975)

Da quel momento l'epigenetica entra nel dominio della genetica e della biologia molecolare e via via sempre più numerose diventano le evidenze delle modificazioni chimiche e topologiche che intervengono sul DNA durante il corso della vita cellulare. Esempi tipici sono la metilazione della citosina nel DNA, le modificazioni delle proteine che avvolgono il DNA, gli istoni, mediante acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione di alcuni residui aminoacidici che alterano la struttura della cromatina (l'acetilazione e la fosforilazione riducono la carica positiva degli istoni e modificano le interazioni elettrostatiche tra istoni e DNA rendendo il complesso meno compatto e più accessibile alle proteine responsabili della trascrizione genica). In sintesi quindi le alterazioni epigenetiche giocano un ruolo importante in tutti i processi in cui è coinvolta l'espressione ma anche la replicazione del DNA e quindi sostanzialmente l'intera vita cellulare. Riprendendo una nota metafora «il DNA (la genetica) è come un libro scritto da una serie continua di lettere senza spazi tra le parole o segni di interpunzione e, anche se diviso in capitoli, i cromosomi, rimane illeggibile; l'epigenetica inserisce gli spazi, le virgole, i punti, le maiuscole e le minuscole, i paragrafi eccetera, rendendo comprensibile il testo.»

Come si controlla l'epigenesi?

Ancora più importante però è conoscere come la cellula decide quali, quante, dove e quando inserire le modificazioni epigenetiche: in altre parole come si controlla l'epigenesi.

Un aspetto cruciale è la scoperta che le chinasi, attivate da segnali citoplasmatici o extracitoplasmatici, attraversano il citoplasma, entrano nel nucleo e fosforilano gli istoni: si realizza qui una comunicazione diretta tra ambiente intra ed extracellulare e la regolazione dell'espressione genica, cioè a dire che le epimutazioni (possiamo chiamarle così in quanto modificando l'espressione genica, silenziando o attivando geni, si comportano come le mutazioni classiche) rispondono alle sollecitazioni ambientali che una cellula sperimenta.

L'altro aspetto da considerare è se le modificazioni epigenetiche che intervengono sul DNA e sulle proteine che lo avvolgono (la cromatina) sono trasmesse alle cellule figlie. Questo è ovvio durante lo sviluppo embrionale se soltanto si pensa al fatto che in un organismo superiore tutte le cellule hanno lo stesso DNA, eppure sono diverse tra loro: una cellula di fegato è diversa da una cellula epiteliale che è diversa da una cellula ossea. Le differenze non stanno nel DNA, che è identico, ma nel come e in quali parti viene usato e ciò dipende dalle modificazioni epigenetiche.

D'altra parte, come si potrebbe spiegare che i circa 20.000 geni presenti nel genoma umano possano servire a generare i 250 tipi diversi di cellule che ci costituiscono e che «nascono» in tempi diversi durante lo sviluppo e ciascuno con circa 100.000 proteine di cui molte specifiche per ogni tipo cellulare. Le diversità sono dovute a modificazioni epigenetiche differenziali: in un caso le epimutazioni fanno sì che si esprimano solo quelle informazioni genetiche che per esempio specificano l'essere cellula di fegato, in un altro caso l'informazione per essere cellula nervosa e così via .

È evidente anche che le epimutazioni sono stabili: una cellula di fegato rimane cellula di fegato per tutta la sua vita a meno di degenerazione neoplastica; è anche trasmissibile alla progenie: quando si divide, una cellula di fegato dà origine ad altre cellule di fegato. Quindi nelle cellule somatiche le alterazioni epigenetiche sono trasmissibili alla progenie e sono alla base del differenziamento cellulare. D'altra parte, le epimutazioni sono anche responsabili della plasticità fenotipica: i cambiamenti morfologici che avvengono nelle varie linee cellulari durante lo sviluppo sono equivalenti ai cambiamenti morfologici che subisce l'organismo quando si adatta a una nuova condizione ambientale. Alla base vi sono modificazioni epigenetiche nel primo e nel secondo caso: dato poi che l'adattamento è una risposta direzionata, che risponde in modo da poter far fronte alla specifica condizione ambientale insorta (ci si adatta al freddo attivando quelle funzioni geniche necessarie a difendersi in modo tale da mantenere l'omeostasi interna), è evidente che le epimutazioni sono risposte direzionate e non casuali.

Tutto ciò comunque non avrebbe nessuna rilevanza evolutiva se queste epimutazioni non fossero trasmissibili alla progenie: se per esempio le cellule germinali non possiedono queste epimutazioni, oppure le cellule che danno origine alle cellule germinali sono «ripulite» di tutte le modificazioni epigenetiche che hanno accumulato prima di diventare germinali, allora l'epimutazione, al pari di ogni carattere acquisito, non

avrebbe significato evolutivo: solo le mutazioni classiche, quelle nella sequenza propria del DNA, sarebbero alla base della variazione transgenerazionale e substrato per la selezione naturale che di generazione in generazione «sceglie» le combinazioni più favorevoli. Qui però siamo nel campo delle osservazioni empiriche: sono le epimutazioni trasmissibili transgenerazionalmente?

Tralasciando il caso degli organismi monocellulari dove non esiste differenziazione tra cellule somatiche e germinali (e quindi dovremmo indagare se le eventuali epimutazioni accumulate durante la fase vegetativa della cellula sono «ripulite» al momento del passaggio alla fase riproduttiva) vediamo quali sono le evidenze disponibili al riguardo per gli organismi pluricellulari. C'è un famoso caso storico: nel 1742 Linneo riporta la scoperta, in una popolazione di *Linaria vulgaris*, una piccola pianta erbacea annuale, di alcuni esemplari con una insolita morfologia florale; le *Linaria vulgaris* hanno fiori con simmetria bilaterale, ma l'esemplare scoperto ha fiori con simmetria radiale. La scoperta per Linneo, convinto «fissista» («tante specie esistono quante sono state create all'inizio dall'Ente Supremo»), è sconvolgente: «è come se da una mucca nascesse un vitello con la testa di lupo» e chiama queste forme insolite *peloriche* (in greco, mostruose).



Linaria vulgaris (a sinistra) e la sua forma *pelorica* (a destra)

Varianti peloriche sono state poi descritte e studiate anche da J. Wolfgang Goethe (1749-1832) e Charles Darwin (1808-1882) in altre specie e significativo è al proposito questo passo di Darwin: « *Now I crossed the peloric snapdragon (*Antirrhinum majus*) with pollen of the common form and the latter reciprocally with peloric pollen. I thus raised two great beds of seedlings, and not one was peloric [...]. The crossed plants, which perfectly resembled the common snapdragon, were allowed to sow themselves, and out of a hundred and twenty-seven seedlings, eighty-eight proved to be common snapdragon, two were in an intermediate condition between the peloric and normal state, and thirty-seven were perfectly peloric, having reverted to the structure of their grandparent* » [7]. Si noti che le 88 forme comuni e le 37 forme peloriche di *Antirrhinum* ritrovate da Darwin nella seconda generazione filiale (F2) corrispondono a un rapporto 3:1 che dimostra che la forma comune e la forma pelorica del fiore sono determinate da un singolo gene trasmesso alla progenie secondo le regole mendeliane classiche. Nel 1999 tuttavia, è stato dimostrato da E. Coen e coll. che la forma pelorica del fiore di *Antirrhinum* è determinata da una epimutazione del gene *cycloidea*, epimutazione che quindi è trasmessa transgenerazionalmente [8].

Epigenetica ed evoluzione

Negli ultimi quindici anni casi di mutazioni epigenetiche che sono trasmesse alle generazioni successive sono diventati sempre più frequenti e sono stati descritti nei batteri, protisti, funghi, piante, animali: Eva Jablonka e Gal Raz ne descrivono in una recente *review* più di 100 casi [9]. Non è più possibile quindi chiedersi se le mutazioni epigenetiche esistono o no e se sono o non sono ereditabili: bisogna invece chiedersi se sono rilevanti ai fini evolutivi. Un esempio tratto da un lavoro sperimentale di Robert A. Waterland e Randy Jirtle [10] e i commenti in proposito di Jablonka e di Marion Lamb possono essere illuminanti. Waterland e Jirtle riportano che una dieta ricca di acido folico nei topi causa epimutazioni nel DNA delle cellule germinali e queste epimutazioni sono trasmesse alla progenie: si tratta quindi di una mutazione indotta dall'ambiente, in questo caso dalla dieta ricca di acido folico (si veda anche il recentissimo caso pubblicato su *Nature* di una dieta ricca di grassi somministrata a ratti maschi e le conseguenze sulle figlie femmine [11]).



Topi clonati con differente metilazione di DNA

Ma cosa c'è di diverso in queste epimutazioni rispetto a una mutazione indotta per esempio dai raggi X? Ambedue sono mutazioni indotte da agenti esterni. La differenza è che nel caso dell'epimutazione indotta da acido folico, la gran parte dei topi trattati presenta la stessa epimutazione nello stesso sito sul DNA, mentre con i raggi X le mutazioni sono in siti diversi da individuo a individuo: nel primo caso quindi la mutazione è direzionata e non casuale. È evidente la rilevanza evolutiva di un simile

meccanismo: di fronte a una particolare situazione ambientale, la popolazione subisce in gran parte dei suoi individui una modificazione mirata che può essere più o meno adattativa nei confronti delle sfide poste dall'ambiente.

La rilevanza evolutiva dei sistemi epigenetici ereditabili non si ferma qui: le epimutazioni sono più frequenti ma meno stabili (possono revertire con una certa frequenza) rispetto alle mutazioni classiche nelle basi del DNA. Ciò conferisce flessibilità alle popolazioni di fronte alle fluttuazioni dell'ambiente: a seguito di una nuova condizione ambientale gli organismi reagiscono rapidamente con modificazioni epigenetiche che, poi, possono essere rimpiazzate da stabili mutazioni classiche (effetto Baldwin) o rapidamente revertire nel caso di ritorno alla situazione ambientale originaria. D'altra parte, i risultati delle ricerche dei team diretti da Joseph R. Ecker (*Salk Institute for Biological Studies*) e di Detlef Weigel (*Max Planck Institute*) confermano che il DNA è un oggetto molto più fluido di quanto si pensasse: soprascritto sul codice genetico c'è un altro codice, il «codice epigenetico».

Il lavoro dei ricercatori dei due gruppi è consistito nel mappare l'epigenoma, cioè localizzare la posizione di tutte le metilcitosine (3 milioni sulle circa 14 milioni di citosine totali) nell'intera sequenza del genoma di *Arabidopsis thaliana*, la piantina modello per eccellenza di tutta la biologia vegetale. L'analisi è stata compiuta su una pianta progenitrice completamente omozigote e su piante discendenti da essa per 30 generazioni successive di autofecondazione. Ci si attende in questo caso che le sequenze del DNA (sia genomiche che epigenomiche) siano essenzialmente identiche tra l'antenato comune e i discendenti fatte salve le mutazione spontanee (intorno a $7 \cdot 10^{-9}$ sostituzioni di basi per sito per generazione negli esperimenti del gruppo Salk); invece la localizzazione e la frequenza delle metilcitosine nelle piante discendenti è significativamente diversa, al punto che è possibile stimare una frequenza di epimutazioni (per citosina per generazione) quasi centomila volte più elevata di quella delle mutazioni classiche. Inoltre le nuove epimutazioni non sono silenti ma hanno conseguenze sull'espressione dei geni e quindi ultimamente sulle proteine da essi codificate [12]. Questo risultato è denso di conseguenze: prima di tutto suggerisce che il codice epigenetico è molto più fluido del codice genetico e questa fluidità ha conseguenze sui tratti biologici dell'individuo. Non sappiamo poi quanto queste epimutazioni siano casuali o indotte specificamente in modo adattativo dalle diverse condizioni ambientali (certo è che l'adattamento, come il differenziamento cellulare, ha una sostanziale base epigenetica). È come se sul testo di un romanzo si potesse leggere, prendendo una lettera ogni tre, un nuovo romanzo, romanzo però che cambia a ogni generazione di lettori o ogni qualvolta il libro viene letto dallo stesso lettore in un diverso ambiente. Ma chi è in realtà il «lettore»? L'epigenetica ci dice che il lettore non è il DNA, ma è la cellula (o l'organismo) in cui è contenuto il DNA a «scegliere» quali parti del DNA usare (analogamente a un artigiano che sceglie quali strumenti usare per fare un determinato oggetto), quando usarle durante la sua vita e in risposta alle situazioni ambientali cui viene esposta e trasmettendo l'esperienza maturata nella sua vita alla prole.

Molte domande restano aperte

E allora cosa si può dire in conclusione? Possiamo ripetere ciò che disse il genetista Walter Gilbert mostrando al pubblico un CD contenente la sequenza del genoma umano: «qui c'è un essere umano, qui ci sono io»? Oppure, sulla base di quanto scoperto in *Arabidopsis*, e non c'è ragione di credere che sia diverso negli animali e nell'uomo in quanto anch'essi possiedono un codice epigenetico, ciò che dice Ecker, il leader del gruppo Salk, «*the genes are not our destiny*».

Personalmente propendo per il secondo punto di vista: sembrava tutto chiaro, tutto risolto e invece ..., invece c'è ancora molto da scoprire e da capire. Meglio così perché, citando Shakespeare, «ci sono più cose in cielo e in terra, Orazio, di quante ne sogni la tua filosofia». E questa è una fortuna perché così possiamo restare sempre umili e curiosi.

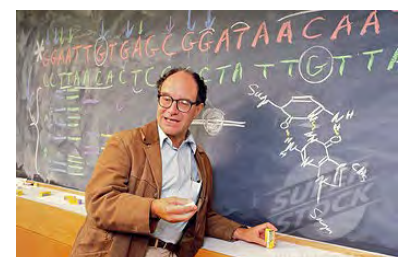
Carlo Soave
(Professore Ordinario di Fisiologia vegetale, Università degli Studi di Milano)



Al "Max Planck Institute for Developmental Biology" si coltiva *Arabidopsis thaliana* per studiare le variazioni epigenetiche (Image: Bernd Schuller)



Diversi mutanti di *Arabidopsis thaliana*



Walter Gilbert (1932-...), premio Nobel per la Chimica 1980

Indicazioni bibliografiche

- [1] Baldwin J.M., 1896, *A new factor in evolution*, American Naturalist 30, 441– 451, 536–553.
- [2] West-Eberhard M.J., 2003, *Developmental plasticity and evolution*, Oxford University Press, New York.
- [3] Johannsen W., 1911, *The genotype conception of heredity*, Am. Nat. 45:129–1591.
- [4] Weismann A., 1893, *The germ-plasm: a theory of heredity*, trad. di Parker e Ronnfeldt, Walter Scott, London.
- [5] Waddington C.H., 1953, *Genetic assimilation of an acquired character*, Evolution 7, 118–126.
- [6] Nanney D.L., 1958, *Epigenetic control systems*, Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 712–717.
- [7] Darwin C., 1868, *The variation of animal and plants under domestication*, Vol II. Kessinger Publishing, MT USA 2004.
- [8] Cubas P., Vincent C., Coen E., 1999, *An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry*, Nature 401, 157–161.
- [9] Jablonka E., Raz G., 2009, *Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms and implications for the study of heredity and evolution*, Quarterly Review of Biology, 84, 131-176.
- [10] Waterland R.A., Jirtle R.L., 2003, *Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation*, Mol. Cell. Biol. 23, 5293–5300.
- [11] Ng S.F., Lin R.C., Laybutt D.R., Barres, R., Owens J.A., Morris M.J., 2010, *Chronic high-fat diet in fathers programs –cell dysfunction in female rat offspring*, Nature 467, 963-966.
- [12] Schmitz R.J., Schultz M.D., Lewsey M.G., O'Malley R.C. Urich, M.A. Libiger, O., Schork N.J., Ecker J.R., 2011, *Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants*, Science 334, 369-373.