



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – SOTTO - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

Relazione Attività periodo Gennaio- Giugno 2007

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Nicoletta Pasquariello

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi di Roma “Tor Vergata”

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

A. Finazzi-Agrò

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

12 mesi

Titolo: Regolazione della metilazione del DNA da parte di mediatori critici della riproduzione

INTRODUZIONE

Gli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono una classe emergente di mediatori lipidici, isolati dal cervello e dai tessuti periferici. Essi comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poli-insaturi (soprattutto acido arachidonico), e sono capaci di mimare gli effetti del principio attivo della *Cannabis sativa*, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC).

L'azione degli endocannabinoidi si esplica attraverso l'attivazione di recettori cannabici, di tipo 1 (CB1) e di tipo 2 (CB2), e di recettori vanilloidi (TRPV1) e dipende da un "controllo metabolico" della concentrazione cellulare di tali composti. Si pensa che azioni CB1-mediate giochino un ruolo nell'ipotermia, nell'analgesia, nella riduzione del movimento e nella catalessia indotte dai cannabinoidi. Il metabolismo degli endocannabinoidi è finemente regolato da enzimi di sintesi e di degradazione che modulano il loro "tono endogeno". L'attività biologica dell'anandamide, AEA (arachidonoiletanolammide), dipende dalla sua concentrazione nello spazio extra-cellulare che, a sua volta, dipende dai meccanismi di degradazione. Questi comportano due passaggi: i) il trasporto attraverso la membrana plasmatica mediante un carrier specifico (AMT, *AEA membrane transporter*); ii) l'idrolisi ad etanolamina ed acido arachidonico catalizzata da un'anandamide idrolasi specifica (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*). La produzione di AEA è dovuta all'attività sequenziale di una N-acil-transferasi (NAT) e di una fosfolipasi D specifica per le N-acil-fosfatidiletanolammine (NAPE-PLD, *NAPE-hydrolyzing phospholipase D*), che catalizzano il rilascio di AEA dai lipidi di membrana. L'insieme degli endocannabinoidi, dei loro recettori, trasportatori ed enzimi costituisce il "sistema endocannabinoide" (SE).

Negli ultimi anni, è stato evidenziato il ruolo degli endocannabinoidi nella regolazione della fertilità sia maschile che femminile, confermando i risultati scientifici sugli effetti negativi dell'uso illegale di marijuana nel processo di riproduzione. La presenza di CB1R nelle cellule di Leydig di topo (1) e la caratterizzazione del SE nelle cellule del Sertoli murine (2) dimostra il coinvolgimento di queste molecole lipidiche nella secrezione di testosterone e nella regolazione dello sviluppo delle cellule germinali. Più recentemente, il ruolo dell'AEA nella regolazione delle funzioni spermatiche richieste per la fertilizzazione è stato proposto anche nell'uomo (3, 4), sebbene le basi molecolari di questa regolazione rimangono ancora sconosciute. Maggiori informazioni sono, invece, disponibili sul coinvolgimento dell'AEA nel sistema riproduttivo femminile, dove è stato dimostrato che l'espressione della FAAH è sotto il controllo di segnali di fertilità, come il progesterone e la leptina

(5), proponendo anche un meccanismo molecolare che regola finemente la modulazione dell'espressione genica.

La metilazione nella fertilità

Durante lo sviluppo degli organismi multicellulari, le cellule seguono differenti programmi di espressione genica sostanzialmente regolati da modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni (6, 7). Nello sviluppo normale o in situazioni patologiche, alcune cellule vanno incontro ad una generale "riprogrammazione" epigenetica che stabilisce lo schema di espressione finale che la cellula seguirà. Nella fecondazione si assiste a due fasi distinte di riprogrammazione epigenetica: durante la gametogenesi e nello sviluppo pre-impianto (8,9). Il genoma delle cellule germinali primordiali (semplici cellule somatiche all'inizio) subisce una demetilazione del DNA a seguito della quale il genoma dei gameti è metilato *de novo* e acquisisce il suo *imprint* finale. Durante la fase di preimpianto avviene una demetilazione passiva del DNA e una ulteriore riorganizzazione delle modificazioni istoniche. Se il genoma dei gameti maschili è sempre attivamente demetilato, il genoma femminile appare epigeneticamente più stabile (10). La metilazione dunque, diventa un meccanismo fondamentale nel passaggio dalla totipotenza verso il corretto inizio dell'espressione genica embrionale e dello sviluppo stesso dell'embrione. La comprensione dei meccanismi alla base della regolazione della metilazione a livello genico è cruciale per un gran numero di implicazioni mediche e nell'applicazione della tecnologia delle cellule staminali (11).

RISULTATI

Nel primo semestre di attività di ricerca abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base dei processi di metilazione utilizzando un modello cellulare noto, le HaCaT, cheratinociti umani immortalizzati.

Tale scelta è stata dettata in primo luogo dalla difficile manipolazione diretta delle cellule germinali, e, in secondo luogo, dalla conoscenza completa di questo modello cellulare in relazione al sistema endocannabinoide. Ciò ha permesso la messa a punto di tecniche molecolari ed enzimatiche necessarie ad una successiva applicazione al sistema riproduttivo.

Infatti, oltre che essere coinvolto nella regolazione della morte cellulare e nella fertilità, il sistema endocannabinoide ha un ruolo importante nel controllo della proliferazione e del differenziamento in diversi tipi cellulari. E' stato dimostrato che gli endocannabinoidi regolano la neuritogenesi, la crescita assonale e la sinaptogenesi in cellule neuronali differenziate (15), quindi è possibile ipotizzare che questi lipidi siano in grado di influenzare la sorte della cellula, regolando la crescita, la sopravvivenza e il differenziamento. Per meglio comprendere in che modo gli endocannabinoidi,

ed in particolare l'AEA, modulano questi fenomeni, abbiamo deciso di studiare l'effetto degli endocannabinoidi sul differenziamento epidermico. Infatti, è noto che i cheratinociti umani possiedono un sistema endocannabinoide funzionale in grado di legare e metabolizzare l'AEA, e che questo lipide è coinvolto nel controllo del differenziamento epidermico (5). Inoltre, è stato dimostrato che i cheratinociti differenziati risultano avere bassi livelli di AEA endogena, a causa dell'aumento della sua degradazione dovuto all'incremento dell'attività di enzimi AMT e FAAH, e che l'AEA esogena inibisce il differenziamento dei cheratinociti *in vitro*, causando una diminuzione di diversi marcatori del differenziamento epidermico, come la formazione dell'involucro corneo e l'attività transglutaminasica (5). Allo scopo di studiare i meccanismi molecolari coinvolti nel controllo del differenziamento epidermico da parte degli endocannabinoidi, abbiamo trattato con AEA i cheratinociti differenziati in coltura ed abbiamo analizzato l'espressione di differenti geni coinvolti nel differenziamento epidermico, come le cheratine e le transglutaminasi.

Saggi condotti con l'utilizzo di Real-Time PCR

Dopo aver proceduto a trattamenti differenzianti utilizzando calcio e 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) e a trattamenti con anandamide (AEA) e 5-azacitidina (specifico inibitore di metilasi) abbiamo valutato i livelli di espressione di diversi geni coinvolti nei meccanismi di differenziamento e/o proliferazione dei cheratinociti.

I dati ottenuti hanno permesso la visualizzazione di un panorama genicamente regolato e di un effetto da parte dell'AEA riproducibile e chiaro.

Le cellule HaCaT indotte al differenziamento con TPA e calcio (16, 17) mostrano, come atteso, un significativo aumento dei livelli di espressione dei geni notoriamente attivi durante il differenziamento (Figura 1). Si può notare che l'aumento della cheratina 1 (K1), cheratina 10 (K10) e della transglutaminasi 5 (Tgase 5), che sono attivate negli stadi tardivi del differenziamento epidermico (16, 18, 19), è molto più evidente rispetto all'andamento del gene dell'involucrina, tipico dei primi momenti del processo differenziativo (20). Abbiamo notato che il trattamento con AEA riduce in maniera significativa l'attivazione dei geni coinvolti nel differenziamento e ciò è in accordo con un nostro lavoro precedente in cui si osservava come l'AEA fosse in grado di inibire la formazione dell'involucro corneo (21). L'ipotesi è che l'AEA riesca ad inibire il differenziamento dei cheratinociti modificandone il loro profilo di espressione genica.

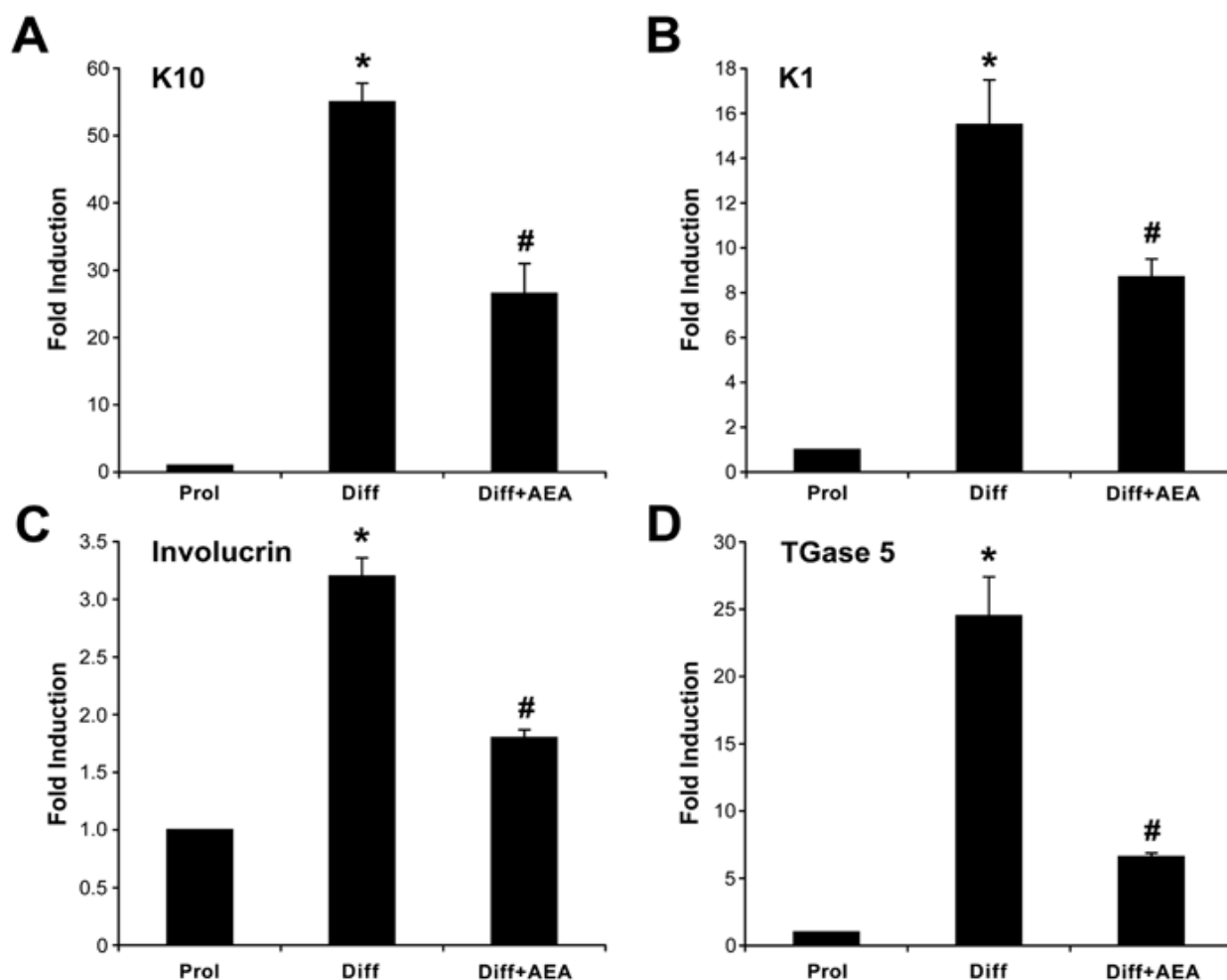


Figura 1.

Poiché è noto che i livelli di metilazione cambiano durante il differenziamento dei cheratinociti (19) e che inibitori della metilazione promuovano tale fenomeno (18), abbiamo investigato la possibilità che l'AEA influenzasse i livelli di espressione genica attraverso un'alterazione della metilazione del DNA.

Il trattamento delle cellule HaCaT con TPA e calcio in presenza di 5-azacitidina (5AC), un inibitore della metilazione del DNA (24, 25), alla concentrazione 1 μ M, risulta in un aumento di circa due volte dell'espressione del gene della K10, se confrontato con le stesse cellule trattate con i soli trattamenti differenzianti. Ciò suggerisce che l'inibizione dei meccanismi di metilazione del DNA permettono un aumento trascrizionale di questo gene. Di notevole importanza è l'abolizione dell'effetto dell'AEA sui livelli di espressione della K10 dovuto al trattamento con 5AC, che riporta

le cellule a livelli tipici del differenziamento senza AEA (Figura 2). Questi dati suggeriscono che l'inibizione del differenziamento da parte dell'AEA avviene attraverso cambiamenti dello schema di metilazione della cromatina.

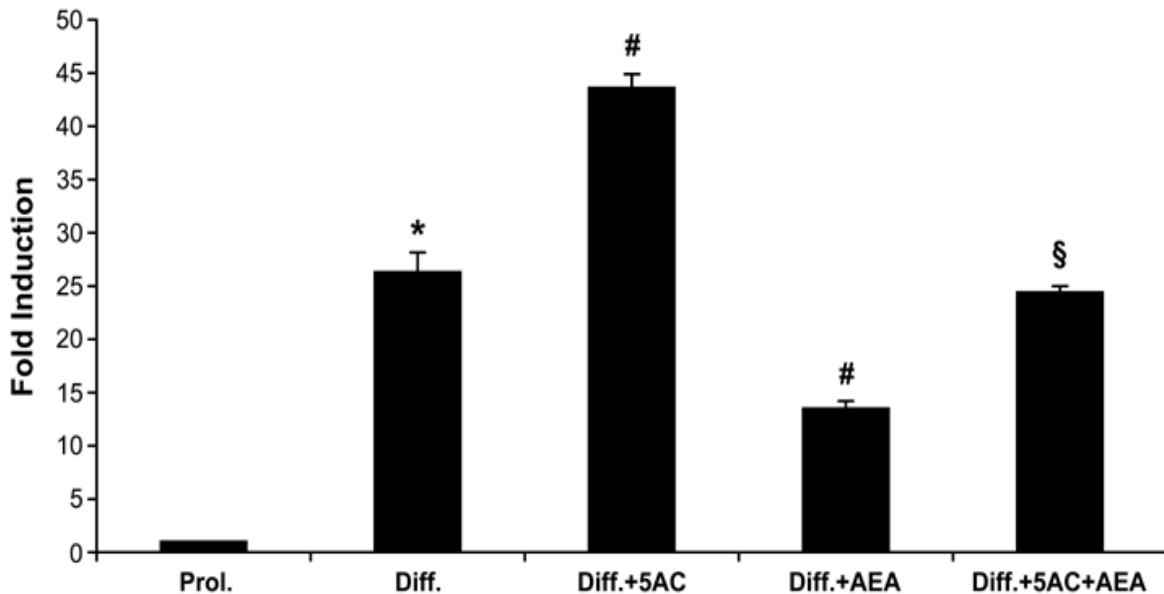


Figura 2.

PROSPETTIVE FUTURE

Dato che l'attivazione dei geni coinvolti nel differenziamento epidermico richiede la demetilazione locale delle sequenze promotrici e la conseguente apertura della cromatina, abbiamo verificato se l'azione dell'AEA coinvolgesse la metilazione del DNA. In effetti, in presenza di un inibitore della metilazione del DNA, come la 5-azacitidina, l'AEA non è più in grado di bloccare l'attivazione trascrizionale della K10. Utilizzando differenti tecniche, come il saggio di sensibilità alla DNasi I e la PCR specifica per la metilazione (MS-PCR), intendiamo dimostrare se l'azione dell'AEA sulla trascrizione genica della K10 sia regolata dalla metilazione del DNA in maniera specifica. Questo meccanismo molecolare potrebbe essere alla base dell'effetto degli endocannabinoidi non solo nel differenziamento epidermico, ma in maniera più generale su crescita e differenziamento cellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. [Wenger T, Ledent C, Csernus V, Gerendai I](#). The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun.* (2001); 284(2):363-8.
2. [Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agro A](#). Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology.* (2003); 144(1):20
3. [Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Mahony MC, Giuffrida A, Picone RP, Makriyannis A](#). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev.* (2002); 63(3):376-87
4. [Maccarrone M, Bari M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A](#). Progesterone activates fatty acid amide hydrolase (FAAH) promoter in human T lymphocytes through the transcription factor Ikaros. Evidence for a synergistic effect of leptin. *J Biol Chem.* (2003); 278(35):32726-32.
5. [Maccarrone M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A](#). Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. *J Biol Chem.* (2003); 278(15):13318-24.
6. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* (2002); 16, 6–21.
7. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* (2002); 3, 662–673.
8. Adenot P.G., Mercier Y., Renard J.-P. and Thompson E.M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, (1997); 124, 4625–4625.
9. Santos F., Hendrich B., Reik W. and Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* (2002); 241, 172–182.
10. Reik W. and Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat. Genet.*, (2001); 27, 255–256.
11. Aoki F., Worrall D.M. and Schultz R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.*, (1997); 181, 296–307.

12. Rushmer R.F., Buettner K.J.K., Short J.M., Odland G.F.,. The Skin. *Science* (1966); 154, 343-348.
13. Plewig G., Marples R.R.,. Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. Part 1. *J Invest Dermatol* (1970); 54, 13-18.
14. Saurat J.M., Grosshans E., Laugier P., Lachapelle J.M.,. *Dermatologie et venerologie*. Editore Masson (1990).
15. Fuchs E., Yang Y., Dowling J., Yu Q.C., Guo L., Intermediate filament cytoarchitecture and BPAG1: a gene encoding two different types of intermediate filament linker proteins. *In Cytoskeletal-Membrane Interactions and Signal Trasduction* (1997); (P. Cowin and M.W. Kymowsky, eds), pp. 167-181, Landes Bioscience, Austin, TX.
16. Candi, E., Oddi, S., Terrinoni, A., Paradisi, A., Ranalli, M., Finazzi-Agrò, A., and Melino, G. Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* (2001); 276, 35014–35023.
17. Savini, I., Catani, M. V., Rossi, A., Duranti, G., Melino, G., and Avigliano, L. Characterization of keratinocyte differentiation induced by ascorbic acid: protein kinase C involvement and vitamin C homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* (2002); 118, 372–379.
18. Ming, M. E., Daryanani, H. A., Roberts, L. P., Baden, H. P., and Kvedar, J.C. Binding of keratin intermediate filaments (K10) to the cornified envelope in mouse epidermis: implications for barrier function. *J. Invest. Dermatol.* (1994); 103, 780–784.
19. Candi, E., Oddi, S., Paradisi, A., Terrinoni, A., Ranalli, M., Teofoli, P., Citro, G., Scarpato, S., Puddu, P., and Melino, G. Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* (2002); 119, 670–677.
20. Eckert, R. L., Yaffe, M. B., Crish, J. F., Murthy, S., Rorke, E. A., and Welter J. F. Involucrin-structure and role in envelope assembly. *J. Invest. Dermatol.* (1993); 100, 613–617.
21. Maccarrone, M. Involvement of the endocannabinoid system in cancer. In *Endocannabinoids: The Brain and Body's Marijuana and Beyond* (CRC Press, ed.) (2006) pp. 451–466, Boca Raton, FL., USA.