

FOCUS SULLA GENETICA

EPIGENETICA E PATOLOGIE CARDIOMETABOLICHE: NUOVE PROSPETTIVE

Epigenetics and cardiometabolic diseases: new perspectives

**RAFFAELLA LONGO¹, ALESSANDRA FERRARI^{1,2}, RUI SILVA^{1,3}, MARTA MARCHESI¹,
NICO MITRO¹, DONATELLA CARUSO¹, EMMA DE FABIANI¹, MAURIZIO CRESTANI¹**

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Indirizzo attuale: Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California, Los Angeles, Los Angeles, USA;

³Indirizzo attuale: Department of Life Sciences of the Faculty of Sciences & Technology of the University of Coimbra, Coimbra, Portugal; CNC.IBILI – Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

SUMMARY

In recent years the connection between metabolism and epigenetics in cardiometabolic diseases has been highlighted by numerous publications. The availability of metabolites is a crucial factor that affects not only cellular metabolism but also the epigenetic regulation of gene expression, two aspects that can be altered in cardiometabolic diseases. In fact, epigenome modifiers are enzymes that use as intermediate substrates or cofactors of metabolism. This review emphasizes the importance of epigenetic regulation in metabolic pathologies. In particular, we examine the correlations between epigenetics and obesity and type 2 diabetes, important risk factors for cardiovascular diseases. Closely interconnected to these pathologies, non-alcoholic fatty liver disease is also a metabolic pathology of great importance, and we examine possible relations with epigenetic mechanisms. Furthermore, we will discuss possible therapeutic approaches based on the remodeling of the “pathological” epigenome and of the metabolism.

Keywords: *Metabolic diseases, regulation of metabolism, epigenetics, diabetes, obesity, fatty liver disease.*

Indirizzo per la corrispondenza

Maurizio Crestani, PhD
Laboratorio “Giovanni Galli” di Biochimica e
Biologia Molecolare – Spettrometria di Massa
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e
Biomolecolari - DiSFeB
Università degli Studi di Milano
E-mail: maurizio.crestani@unimi.it

Epigenetica

La definizione di epigenetica indica quei meccanismi che influenzano le funzioni del genoma senza implicare cambiamenti della sequenza del DNA. Tra questi meccanismi sono compresi la metilazione del DNA, le modificazioni post-traduziona-

Elenco degli argomenti trattati

- Epigenetica.
- Intermedi del metabolismo regolano l'attività di enzimi modificatori dell'epigenoma.
- Epigenetica nelle malattie metaboliche.
- Interrelazioni tra obesità e diabete di tipo 2 e meccanismi epigenetici.
- Correlazioni tra NAFLD ed epigenetica.
- Prospettive future nell'epigenetica delle malattie metaboliche.

li degli istoni (es. acetilazioni, metilazioni, fosforilazioni, ADP-ribosilazioni) e meccanismi che implicano l'intervento di RNA non codificanti (microRNA, long non-coding RNA). Gli studi pubblicati nell'ultimo decennio indicano che la cromatina e le sue modificazioni rappresentano un'interfaccia tra l'ambiente (nel suo significato

più ampio) che circonda un organismo vivente, il genoma e le funzioni cellulari ad esso sottese. Tramite questa interfaccia gli organismi viventi sono in grado di adattarsi ai cambiamenti ambientali, non solo attuando risposte cellulari ma anche incorporando una memoria epigenetica che può essere trasmessa a generazioni successive. I fattori nucleari che inducono modificazioni epigenetiche richiedono intermedi del metabolismo e cofattori per le relative reazioni enzimatiche e ciò mette in luce un forte legame tra epigenetica e metabolismo che in realtà possono essere riuniti in una visione comprensiva di questi processi (*Figura 1*). Da questa considerazione ne consegue che la disponibilità di intermedi metabolici può influenzare l'attività degli enzimi responsabili delle modificazioni dell'epigenoma e determinare il rimodellamento della cromatina.

In questa sezione, faremo una carrellata di meccanismi mediante i quali l'attività di enzimi coinvolti nelle modificazioni dell'epigenoma può essere modulata da intermedi metabolici.

La metilazione del DNA e degli istoni è mediata rispettivamente da DNA metiltransferasi (DNMT) e istone metiltransferasi (HMT). Questi enzimi catalizzano il trasferimento del gruppo metilico dalla S-adenosil metionina (SAmE) alle citosine presenti nelle isole CpG del DNA, sequenze genomiche ricche in G e C, e sui residui amminoacidici di lisina e arginina nelle code degli istoni; queste reazioni generano il sottoprodotto S-adenosil omocisteina (SAH) (*Figura 2A*). SAmE and SAH sono intermedi del cosiddetto metabolismo ad un carbonio. La diminuzione di assunzione di metionina, l'amminoacido precursore di SAmE e SAH, e di suoi derivati con la dieta altera la metilazione del DNA (1) e degli istoni (2). In quest'ultimo studio gli autori hanno anche evidenziato una ridu-

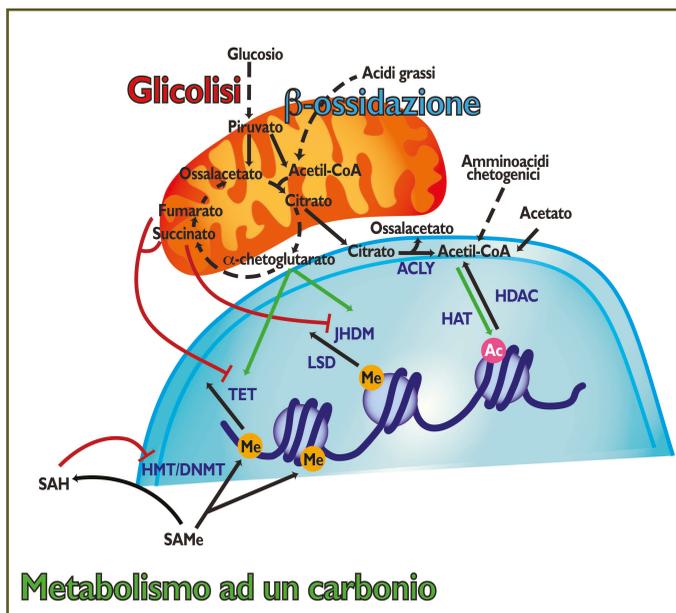


Figura 1 - Integrazione del metabolismo e delle modificazioni dell'epigenoma. Intermedi del metabolismo influenzano l'epigenoma, fungendo da substrato o cofattore degli enzimi modificatori epigenetici. Le frecce verdi rappresentano meccanismi di attivazione; le frecce rosse rappresentano meccanismi di inibizione.

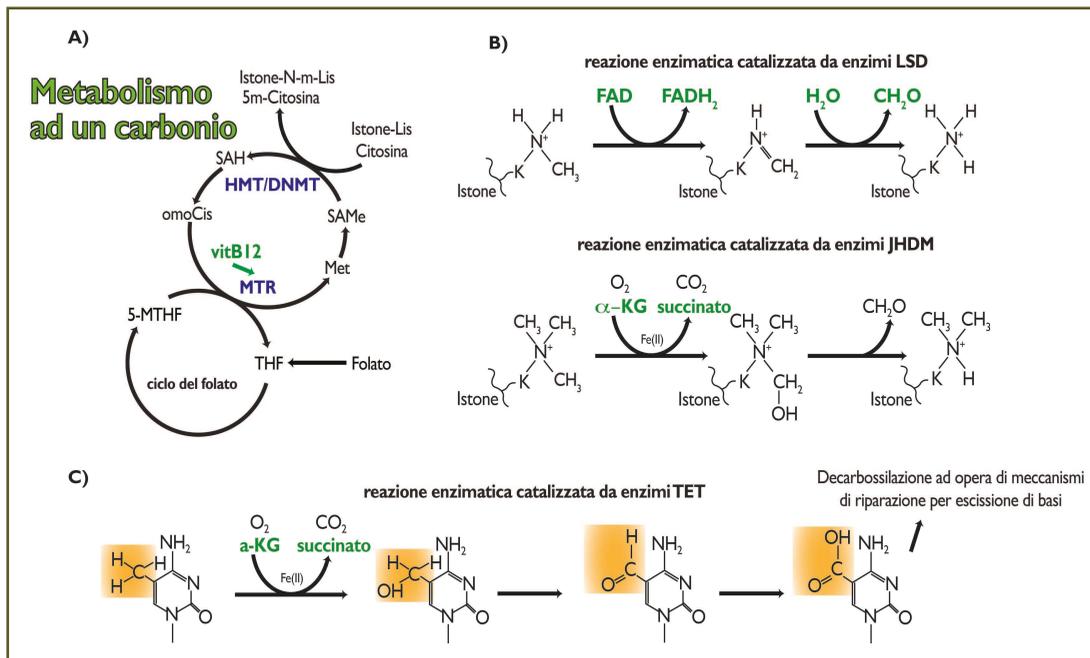


Figura 2 - Intermedi metabolici e cofattori nelle reazioni di metilazione e demetilazione del DNA e gli istoni. a) ciclo della metionina e del folato; b) rappresentazione delle reazioni enzimatiche catalizzate dagli enzimi che demetilano gli istoni; c) demetilazione del DNA. In verde sono rappresentati i cofattori delle reazioni.

zione del marcatore istonico H3K4me3, indicatore di trascrizione attiva, nonché degli enzimi coinvolti nel metabolismo ad un carbonio, suggerendo quindi una regolazione a *feedback* per ridurre l'utilizzo di SAMe in carenza di metionina. Poiché in soggetti umani le variazioni dei livelli di metionina dipendono dalla dieta, è probabile che la metilazione del DNA e degli istoni possa dipendere dalla composizione dei nutrienti attraverso il metabolismo della metionina (2). È importante ricordare che anche folati, vitamina B12 e vitamina B6 sono coinvolti nel metabolismo ad un carbonio e quindi anche i livelli di questi composti possono contribuire alle metilazioni di DNA ed istoni. Si ipotizza che la demetilazione del DNA abbia luogo in due tappe: nella prima reazione gli enzimi Ten-eleven Translocation (TET) convertono le metilcitosine in idrossime-

tilcitosine che poi sono successivamente demetilate. Due differenti tipi di enzimi sono responsabili della demetilazione degli istoni: lysine-specific histone demethylases (LSDs), che utilizzano FAD come cofattore convertito a FADH₂, and Jumonji-C domain containing histone demethylases (JHDM), che viceversa utilizzano ossigeno, Fe(II) e α -chetoglutarato con un meccanismo catalitico simile a quello degli enzimi TET e producono succinato, che, assieme al fumarato, inibisce l'attività degli enzimi JHDM e TET (Figura 2B e 2C). Lo sbilanciamento degli intermedi del ciclo di Krebs α -chetoglutarato, succinato e fumarato può, pertanto, influenzare le modificazioni epigenetiche.

Un'altra importante modificazione delle code istoniche è l'acetilazione in corrispondenza del gruppo amminico ϵ dei residui di lisina. L'equilibrio tra le attività de-

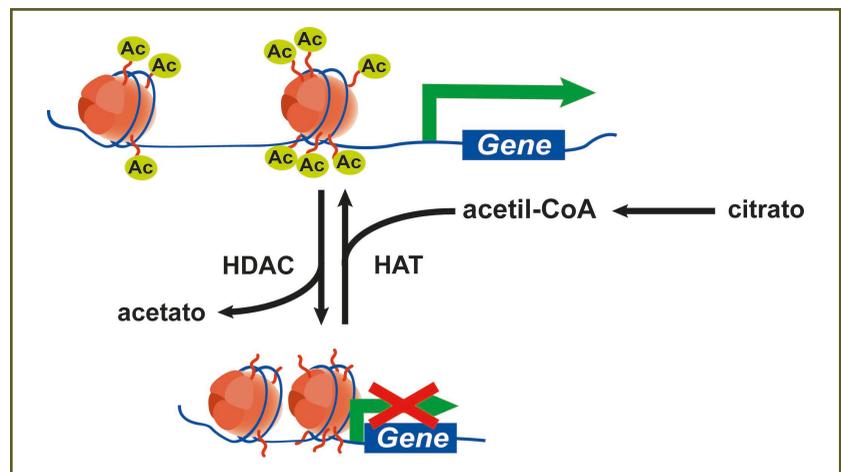
gli enzimi istone acetiltransferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC) determina il livello di acetilazione degli istoni (Figura 3). In generale, l'acetilazione degli istoni si associa ad un aumento della trascrizione perché questa modificazione apre la cromatina rendendola più accessibile ai fattori di trascrizione. Mentre le HDAC, rimuovendo i gruppi acetile, compattano la cromatina e agiscono da corepressori della trascrizione. Il substrato per l'acetilazione degli istoni è l'acetil-CoA, prodotto dalla scissione del citrato operata dall'enzima ATP-citrato liasi (ACLY). Questo enzima è notoriamente coinvolto nelle vie biosintetiche degli acidi grassi e del colesterolo, tuttavia evidenze relativamente recenti hanno messo in luce che ACLY può localizzarsi anche nel nucleo dove consente la produzione di acetil-CoA necessario per l'acetilazione delle lisine nelle code istoniche (3). Oltretutto, è stato dimostrato che la disponibilità del glucosio influenza l'acetilazione degli istoni dipendente da ACLY. Ciononostante, le molecole di acetil-CoA per l'acetilazione della cromatina possono derivare da altre fonti. Recentemente, gruppi di ricerca indipendenti (4, 5) hanno dimostrato che gli acidi grassi

possono fornire acetil-CoA per l'acetilazione degli istoni, attraverso la β -ossidazione negli adipociti del tessuto adiposo bianco (WAT) sottocutaneo. Nelle cellule tumorali l'acetato è impiegato come donatore di gruppi acetile per l'acetilazione istonica in condizione di ipossia (6). Per contro, l'attività delle HDAC è regolata da metaboliti e cofattori. Il β -idrossibutirrato, un corpo chetonico circolante in condizioni di digiuno o sforzo fisico prolungato, inibisce l'attività delle HDAC di classe I (HDAC1, HDAC2 e HDAC3) e protegge dallo stress ossidativo aumentando l'espressione di superossido dismutasi 2 e di catalasi (7). Anche il cofattore NAD^+ regola altre HDAC: le sirtuine, HDAC di classe III, sono attivate quando il rapporto NAD^+/NADH aumenta, condizione che si verifica quando lo stato energetico della cellula è basso in seguito per esempio ad attività fisica. Per questo motivo, le sirtuine sono considerate veri e propri sensori dello stato energetico della cellula.

In questa breve rassegna illustreremo come le alterazioni del metabolismo e la riprogrammazione di varie vie metaboliche possa influenzare la regolazione epigenetica dell'espressione genica in stati patologi-

Figura 3 - Acetilazione e deacetilazione della cromatina.

L'aggiunta di gruppi acetile (Ac) alle code istoniche da parte di enzimi HAT rende accessibile la cromatina agli attivatori della trascrizione, promuovendo la trascrizione dei geni (freccia verde). Gli enzimi HDAC rimuovono i gruppi acetile e compattano la cromatina, agendo da corepressori della trascrizione.



ci su base metabolica. Faremo inoltre alcune considerazioni attuali e possibili opzioni terapeutiche che agiscono modulando l'attività di modificatori dell'epigenoma.

Epigenetica nelle malattie metaboliche

Le malattie su base metabolica, tra cui diabete, obesità e aterosclerosi, affliggono milioni di persone sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. Oltre ad una componente genetica, queste malattie sono legate all'alimentazione ed a modificazioni epigenetiche che possono alterare la trascrizione di specifiche regioni del genoma. Numerosi studi hanno analizzato l'effetto di componenti della dieta sull'epigenoma e sulla trascrizione genica. L'alimentazione può influenzare le modificazioni dell'epigenoma mediante l'inibizione degli enzimi DNA metiltransferasi e istone deacetilasi o fornendo i gruppi funzionali per la metilazione del DNA e le modificazioni post-traduzionali degli istoni. La disponibilità di nutrienti durante la gravidanza può alterare i marcatori epigenetici nella discendenza e questa evidenza rafforza l'ipotesi "siamo ciò che mangiamo ma anche ciò che i nostri genitori hanno mangiato".

Le principali sfide dell'epigenetica nelle malattie metaboliche sono l'identificazione di biomarcatori epigenetici predittivi di suscettibilità individuale all'insorgenza della malattia e della possibile loro trasmissione alle future generazioni, il riconoscimento di fattori ambientali in grado di modulare l'espressione genica mediante meccanismi epigenetici e lo sviluppo di farmaci o componenti della dieta che possano modificare i marcatori epigenetici. In questa sezione discuteremo il ruolo di alcuni metaboliti e di composti bioattivi nella modulazione di marcatori epigenetici collegati a disordini metabolici.

Obesità e diabete mellito di tipo 2

L'obesità è una condizione patologica multifattoriale in cui la predisposizione genetica/epigenetica, il metabolismo, il comportamento alimentare, l'attività fisica e i fattori socio-culturali giocano un ruolo fondamentale. In generale, l'obesità è causata da uno sbilanciamento energetico in cui l'introito calorico supera la spesa energetica e induce un eccessivo accumulo di grasso. L'obesità è ormai considerata una vera e propria epidemia globale. Spesso è associata ad altre alterazioni del metabolismo come insulino-resistenza, intolleranza al glucosio, ipertensione e dislipidemia, a definire un quadro patologico indicato come "sindrome metabolica" o "sindrome X". L'obesità è inoltre un fattore di rischio per lo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 (T2DM). In anni più recenti la combinazione di studi di associazione genome-wide (GWAS) con approcci di metabolomica (mGWAS) ha offerto l'opportunità di studiare l'influenza di fattori genetici sui tratti metabolici. A questo proposito, Kim et al. (8) hanno dimostrato che uno specifico polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) sul gene *FTO* (*Fat mass and obesity associated*) influenza i livelli circolanti di sette metaboliti implicati nel metabolismo di fosfolipidi e aminoacidi, associati ad obesità e T2DM. Il gene *FTO* codifica per una DNA demetilasi α -chetoglutarato-dipendente espressa nell'ipotalamo e coinvolta nella regolazione del bilancio energetico e dell'appetito (9). L'iperespressione di *Fto* in topi aumenta la massa corporea e la massa grassa a causa di un aumento del consumo di cibo (10), viceversa modelli murini *Fto* knock-in con mutazione *loss of function* o *Fto* knock-out hanno un fenotipo magro (11, 12). Nello studio di Jia e colleghi (13) si dimostra che il principale substrato dell'enzima FTO è il residuo di

N6-metiladenosina nell'RNA (m⁶A-RNA). Questa scoperta ha fatto emergere la possibilità che l'alterazione m⁶A-RNA potesse essere un importante marcatore epitrascrittomico (14). Infatti, è stato dimostrato che la presenza di questa alterazione è regolata in risposta a stimoli, quali la disponibilità di energia e di nutrienti (15, 16). Oltre a questa regolazione post-trascrizionale, FTO agisce come coattivatore trascrizionale interagendo con proteine CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) (17).

Recentemente, lo sviluppo di tecnologie high-throughput e l'introduzione di epigenome-wide association studies (EWAS) hanno permesso di approfondire come lo stile di vita e le abitudini alimentari contribuiscano ai cambiamenti epigenetici e come queste alterazioni possano essere correlate allo sviluppo di disfunzioni metaboliche. A questo proposito, Demerath et al. (18) hanno evidenziato l'esistenza di un'associazione tra obesità e arricchimento nelle cellule circolanti di motivi di metilazione su siti CpG di geni che codificano enzimi appartenenti a vie metaboliche, come il metabolismo lipidico ed energetico. In un altro studio, Dick e collaboratori (19) hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione inversa tra l'espressione di *HIF3A* (*hypoxia inducible factor 3A*) nel tessuto adiposo e i suoi livelli di metilazione a livello dei leucociti. A questo proposito, un recente EWAS su profili di metilazione associati ad obesità ha identificato siti CpG nei leucociti i cui livelli di metilazione rispecchiano quelli presentati nel tessuto adiposo (20). La dimostrazione che i profili epigenetici nelle cellule circolanti possano fornire una buona rappresentazione dei profili epigenetici dei tessuti implicati nel metabolismo, come il tessuto adiposo, è molto rilevante in quanto permetterebbe di misurare fa-

cilmente e rapidamente marcatori epigenetici di obesità e comorbidità associate. Un altro studio ha validato 94 CpG associati a BMI (indice di massa corporea), di cui 70 CpG di nuova identificazione, e 49 associati a circonferenza vita (WC, waist circumference) (33 di nuova identificazione) (21). Gli autori hanno anche individuato che l'ipermetilazione di CpG nel gene *CUX1* (*cut-like homeobox 1*) è associato ad un alto BMI. Il gene *CUX1* è stato proposto come regolatore dell'espressione di *FTO* e *RPGRIP1L* (*retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 like*) (22), e, poiché causa una riduzione della sensibilità alla leptina e un aumento dell'appetito e del consumo di cibo, predispone ad obesità. Ad ogni modo, è importante ricordare che le varianti di predisposizione genetica ed epigenetica forniscono solo una parziale spiegazione della suscettibilità allo sviluppo di obesità e T2DM.

Nella seguente sezione forniremo alcuni esempi di come diversi metaboliti possano regolare la risposta trascrizionale attraverso meccanismi epigenetici e di come questo possa correlarsi allo sviluppo di patologie metaboliche.

Intermedi del ciclo di Krebs

Come già ricordato in precedenza, α -chetoglutarato, fumarato e succinato giocano un ruolo importante nella regolazione delle modificazioni epigenetiche. α -chetoglutarato è cofattore degli enzimi TET (*Figura 2C*), mentre l'accumulo di succinato e fumarato, causato da inibizione di succinato deidrogenasi o fumarato idratasi, a sua volta inibisce TET (*Figura 1*). Anche le istone demetilasi JHDM utilizzano α -chetoglutarato come cofattore (*Figure 1 e 2B*). Disregolazioni della metilazione degli istoni sono state correlate allo sviluppo di disfunzioni metaboliche. Nel 2009 due studi hanno evidenziato il

ruolo di JHDM2A (*(H3K9-specific) demethylase 2a*): lo studio di Tateishi et al. (23) ha mostrato che topi con mutazioni *loss of function* di questo gene sviluppano obesità e iperlipidemia nell'età adulta. Gli autori attribuiscono ciò all'aumento di H3K9me2 in enhancer di *Ppara* (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) e *Ucp1* (*uncoupling protein 1*) a livello del tessuto adiposo bruno. In un altro studio Inagaki e colleghi (24) hanno dimostrato che il fenotipo obeso dei topi *Jhdm2a*^{-/-} è correlato ad una ridotta espressione di diversi geni, tra cui *ApoC1*, inibitore del legame di VLDL al loro recettore e quindi dell'accumulo di lipidi nel tessuto adiposo, *Glut4*, trasportatore del glucosio insulino-dipendente, il fattore anti-adipogenico *CoupTFII* ed infine *Adamts9* che codifica per una metallo-proteasi associata a T2DM.

Il ciclo di Krebs contribuisce alla definizione del rapporto NAD⁺/NADH, che, come già accennato in precedenza, influenza le modificazioni epigenetiche regolando l'attività delle sirtuine. A questo proposito, è stato dimostrato che la restrizione calorica, un regime alimentare proposto come possibile strategia per contrastare l'obesità, induce l'attivazione di SIRT1 aumentando il rapporto NAD⁺/NADH (25). Conseguentemente, a seguito dell'attivazione di SIRT1, è stata osservata un'associazione tra riduzione di *Pparg* e dei suoi geni bersaglio e immagazzinamento di grasso.

Acetil-CoA

La disponibilità di acetil-CoA influenza il rimodellamento della cromatina e il metabolismo dei lipidi

L'acetilazione/deacetilazione degli istoni è una delle modifiche epigenomiche più studiate. Citrato e acetil-CoA giocano un ruolo centrale nella regolazione dei livelli di acetilazione degli istoni, essendo

rispettivamente il substrato e il prodotto della reazione enzimatica catalizzata a livello nucleare da ATP-citrato liasi (ACLY). Inoltre, HAT e HDAC hanno un ruolo tessuto-specifico e la loro rilevanza nell'obesità è emersa in seguito a studi che hanno analizzato il fenotipo conseguente ad ablazione di specifiche isoforme di questi enzimi in diversi tessuti. HDAC3, HDAC di classe I, regola il metabolismo lipidico a livello epatico. Knutson e colleghi (26) hanno dimostrato che l'ablazione epatica di *Hdac3* causa una profonda disregolazione del metabolismo ed induce epatomegalia ed epatosteatosi con alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico. Questi effetti negativi sono dovuti all'attivazione del circuito regolatorio di PPAR γ nel fegato. Successivamente, è stato dimostrato che l'associazione di HDAC3 con il genoma nel fegato segue una ritmicità circadiana (27). Mediante l'utilizzo di un altro modello knock out specifico nel fegato, è stato dimostrato che HDAC3 è reclutata sul genoma durante la fase non attiva e di digiuno nei roditori e reprime l'espressione dei geni importanti per la sintesi e il sequestro dei lipidi, permettendo così l'indirizzamento di intermedi metabolici alla gluconeogenesi (28). Viceversa, nella fase attiva HDAC3 non è reclutata sul genoma, permettendo così la derepressione dei geni lipogenici. È interessante notare che in questo modello knock out vi è epatosteatosi severa ma la tolleranza al glucosio non è alterata. Gli autori attribuiscono ciò all'aumentata espressione di geni importanti per un corretto sequestro di lipidi in gocce lipidiche. Tuttavia, è importante ricordare che in questo studio i topi knock out sono stati esposti a dieta arricchita in grassi per un breve periodo, presumibilmente non sufficiente per indurre alterazioni sistemiche del metabolismo. Il nostro gruppo ha dimostrato che

HDAC3 regola il metabolismo lipidico anche nel tessuto adiposo (4). L'ablazione di *Hdac3* in questo tessuto, infatti, induce un rimodellamento del metabolismo con l'instaurarsi di un ciclo futile di β -ossidazione degli acidi grassi e *de novo* lipogenesi, atto a supportare la termogenesi, un processo che richiede grandi quantità di energia, mediante il *browning* del WAT. Questo peculiare fenotipo metabolico è causato da un'aumentata acetilazione a livello di specifiche regioni della cromatina che regolano geni chiave, quali *Pparg*, *Ppara* e *Ucp1*. In questo contesto, citrato e acetil-CoA svolgono un ruolo fondamentale, essendo precursori sia della sintesi *de novo* di acidi grassi ma anche dell'acetilazione della cromatina. In linea con questi risultati, abbiamo anche mostrato che l'inibizione di HDAC di classe I contrasta l'aumento di peso in modelli murini di obesità genetici ed indotti dalla dieta attraverso l'aumento della capacità ossidativa del WAT (29, 30).

Composti bioattivi possono modulare l'acetilazione degli istoni

Sostanze naturali, come polifenoli e altri composti estratti dalle piante, sono considerati nuovi potenziali agenti terapeutici in grado di contrastare le patologie metaboliche tra cui obesità, T2DM e aterosclerosi. I polifenoli sono comuni in vegetali, frutti, tè verde e vino rosso e hanno proprietà antiossidanti. È interessante notare che alcune delle loro proprietà sono associate a modulazione dell'attività deacetilasi. Uno tra i polifenoli più noti, il resveratrolo, ha proprietà anti-obesogeniche perché inibisce il differenziamento adipocitario e la *de novo* lipogenesi, stimolando invece la lipolisi con meccanismi dipendenti da SIRT1 (31). La curcumina, invece, induce rimodellamento della cromatina alterando l'equilibrio tra acetilazione/deacetilazione in condizioni diabetiche (32).

Metabolismo ad un carbonio

I nutrienti possono regolare i livelli di metilazione principalmente attraverso due meccanismi:

- 1) cambiamenti nella disponibilità di molecole donatori di metili;
- 2) alterazione dell'attività di enzimi coinvolti nella metilazione. Inoltre, gruppi metili sono anche utilizzati per la modificazione post-traduzionale di alcune proteine, per la sintesi di ormoni e di altre molecole come creatina, carnitina e fosfatidilcolina (PC).

Il metabolismo ad un carbonio è costituito da un insieme di vie biochimiche che donano o rigenerano unità carboniose, mediando la metilazione di tutte le molecole con attività biologica.

Folato e vitamina B12

Il ciclo del folato è direttamente connesso al ciclo della metionina: la metilazione avviene mediante la conversione di SAME che, dopo aver donato un gruppo metile, si converte a SAH e omocisteina (Figura 2A). SAME è prodotta dalla metionina che può essere a sua volta rigenerata in presenza di un donatore di gruppi metili, il 5-metil-tetra-idrofolato (5-MTHF). La metionina sintasi (*MTR*, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase) è un enzima chiave per la rigenerazione della metionina. La vitamina B12 funge da cofattore della metionina sintasi. Inoltre, questa vitamina è cofattore dell'enzima mitocondriale metil-malonil-CoA mutasi che produce il succinil-CoA, intermedio del ciclo di Krebs. Infatti, la carenza di vitamina B12 è associata ad un accumulo di malonil-CoA che, quindi, riduce la β -ossidazione mediante inibizione dell'enzima limitante CPT1 (carnitina palmitoil transferasi 1). Molte evidenze suggeriscono che lo stato nutrizionale durante le prime fasi della vita può indurre modificazioni dell'epigenoma

che predispongono al rischio di sviluppare patologie metaboliche nelle fasi adulte della vita. La malnutrizione paterna, sia come denutrizione sia come ipernutrizione, è stata associata ad aumentato rischio per la progenie di sviluppare malattie metaboliche. Ad esempio, figli di genitori obesi hanno un aumentato rischio di sviluppare obesità rispetto a figli di genitori magri. Uno dei casi di studio più famosi è quello concernente la cosiddetta “carestia invernale olandese”, verificatasi nei Paesi Bassi negli anni 1944-1945. Individui esposti alla carestia durante il periodo pre-natale hanno riportato un profilo di metilazione di geni importanti per lo sviluppo di malattie metaboliche differente da quello dei fratelli non esposti (33). Tra i vari geni è riportata una riduzione della metilazione a carico del gene *IGF2* (*insulin like growth factor 2*). Quest’ultimo è stato associato ad aumentato rischio di obesità, dislipidemia e insulino-resistenza (34). In un altro studio è riportato invece che l’integrazione di acido folico nel periodo peri-concezionale aumenta il livello di metilazione del gene *IGF2* nella progenie (35). Anche l’esposizione ad ipernutrizione materna durante il periodo pre-natale può causare alterazioni della metilazione di regioni CpG del promotore del gene *RXR α* (*retinoid x receptor α*) associato ad successivo aumento di obesità (36). Parallelamente, è stato dimostrato che la supplementazione di alimenti che favoriscono la metilazione (colina, betaina, acido folico e vitamina B12) è in grado di prevenire l’amplificarsi dell’obesità attraverso le generazioni (37). Altre condizioni che possono associarsi a carenza di queste vitamine sono un insufficiente apporto con la dieta, per esempio nella popolazione che segue dieta vegana o vegetariana, o nell’alcolismo cronico. Anche la popolazione anziana è generalmente soggetta a carenze di macro- e micronutrienti

a causa di iponutrizione, a sua volta determinata dalla presenza di altre patologie o fattori psicologici.

Report clinici e studi di popolazione hanno associato il metabolismo della vitamina B12 a cardiomiopatie (38). Infatti, sia la carenza di folato che di vitamina B12 inducono ipertrofia cardiaca, accompagnata da alterazioni dell’ossidazione mitocondriale degli acidi grassi (39). A sua volta, questa osservazione si correla ad una ridotta espressione di *PPAR α* , principale regolatore della β -ossidazione, e *ERR α* (*estrogen related receptor α*); inoltre, in questa condizione è stato evidenziato uno sbilanciamento dei livelli di acetilazione/metilazione di *PGC1 α* , regolatore mitocondriale, da parte di *SIRT1*, causando ridotta espressione dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nell’ossidazione mitocondriale degli acidi grassi e nella respirazione mitocondriale.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) è una patologia epatica strettamente connessa a obesità e T2DM. Caratterizzata da un accumulo patologico di grasso negli epatociti, questa patologia mostra diversi gradi di severità, da steatosi a fibrosi e cirrosi. Un sottogruppo di NAFLD, la cosiddetta steatoepatite (NASH), può progredire anche a stadi più severi e si correla ad un aumentato rischio di carcinoma epatocellulare (HCC). La NAFLD è multifattoriale ed è stata associata ad alterazioni dell’epigenoma. A questo proposito, è stato suggerito che un buon marcatore per valutare la progressione di NAFLD a NASH possa essere la metilazione del DNA in specifici CpG. Infatti, sono stati riportati 69.247 siti CpG differenzialmente metilati in pazienti con NA-

FLD avanzata confrontati a pazienti con NAFLD lieve (40). È stato anche osservato che la NAFLD si correla a uno spostamento della metilazione vicino a siti di inizio della trascrizione, influenzando così l'espressione di geni connessi all'omeostasi lipidica ed energetica. Tra questi geni, sono riportati cambiamenti nella metilazione di geni appartenenti alla famiglia delle apolipoproteine (*APO*), coinvolte nel trasporto dei lipidi, e *STARD* (*steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer domain*) associato a trasporto del colesterolo e lipidi. Un altro gene coinvolto, consistentemente alla letteratura precedente, è *FGF21* (*fibroblast growth factor 21*), che codifica per un ormone espresso a livello del fegato e del tessuto adiposo, regolatore del metabolismo energetico. L'espressione epatica di *FGF21* è indotta in condizioni di digiuno e da agonisti di PPAR α (41) e gioca un ruolo chiave nell'indurre perdita di peso e miglioramento delle alterazioni del metabolismo glucidico in topi obesi (42).

Metabolismo ad un carbonio

Alterazioni del metabolismo ad un carbonio si associano spesso a disfunzioni del metabolismo epatico. Infatti, è stato dimostrato che diete povere di molecole donatori di metili inducono accumulo epatico di trigliceridi, predisponendo a NAFLD e alla progressione in NASH (43). Un altro studio ha dimostrato che topi nutriti con diete povere in donatori di metili sviluppano steatosi epatica, accompagnata da alternazione della metilazione del DNA e delle modificazioni istoniche (44). Viceversa, l'integrazione di donatori di metili può migliorare la steatosi epatica ripristinando la metilazione in siti CpG presenti in promotori di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, per esempio *Fasn* (*fatty acid synthase*) (45). Inoltre, è stato dimostrato

che l'integrazione di donatori di metili con la dieta è in grado di prevenire la NAFLD indotta da una dieta ricca di grassi nei ratti (45). Quest'effetto protettivo si associa a modificazioni del profilo di metilazione di geni quali *Fasn* e *Srebf2* (*sterol regulatory binding factor 2*) (45). Anche la deplezione di folato può indurre steatosi epatica, aumentando l'espressione di geni coinvolti nella sintesi di lipidi (46).

Acetil-CoA

La progressione della steatosi epatica è influenzata anche dall'acetilazione degli istoni. Ad esempio, p300, una proteina che fa parte della famiglia delle HAT, attiva il fattore di trascrizione ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) e aumenta l'espressione di geni importanti per la sintesi di lipidi tramite acetilazione degli istoni e di proteine non-istoniche, favorendo l'insorgenza di NAFLD (47). MeCP2 (Methyl CpG-binding protein 2), una proteina che lega le isole CpG e interagisce con HDAC3, induce condensazione della cromatina e repressione genica ed è stata implicata nell'insorgenza di steatosi epatica. Infatti, l'ablazione epatica di *Mecp2* impedisce il reclutamento di HDAC3 su specifici loci e aumenta l'acetilazione di H3K27 a livello di geni, quali *Sqle* (*Squalene epoxidase*), *Fasn* e *Cd36* (*cluster of differentiation 36*), inducendo dislipidemia e NAFLD (48). Vista la rilevanza dell'acetilazione degli istoni nella patogenesi di NAFLD, è possibile speculare che la modulazione dei livelli di acetil-CoA possa essere un approccio terapeutico perseguibile per il trattamento di questa patologia.

Meccanismi epigenetici basati su RNA-interference

Oltre alle modificazioni del DNA e degli istoni, anche i microRNA (mi-RNA)

sono regolatori epigenetici coinvolti nella progressione di NAFLD. Infatti, i mi-RNA circolanti sono importanti regolatori per l'omeostasi epatica e sono stati proposti come possibili nuovi biomarcatori per la diagnosi e bersagli terapeutici per il trattamento di lesioni epatiche e di epatocarcinomi.

Ad esempio, la disregolazione dell'espressione di miR-122 è stata associata a diverse patologie epatiche: nei pazienti affetti da NASH i livelli di miR-122 sono fortemente ridotti rispetto a quelli di pazienti con steatosi o soggetti sani e questo induce la disregolazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico (49).

Un altro mi-RNA usato come marcatore di NAFLD è miR-21: la sua espressione è aumentata nei pazienti NAFLD rispetto ai controlli sani (50). È molto interessante notare che l'integrazione di folato può influenzare l'espressione dei mi-RNA importanti per la NAFLD, probabilmente inducendo cambiamenti nella metilazione dei loro promotori. È stato dimostrato, inoltre, che l'assunzione di diete povere di colina e folato in topi induce lesioni epatiche da NAFLD e i livelli circolanti di miR-34a, miR-122, miR-181a, miR-192 e miR200b correlano con la severità della patologia (51).

Prospettive future nell'epigenetica delle malattie metaboliche

Nonostante un'aumentata sensibilità generale su questi temi, le patologie metaboliche hanno un'aumentata incidenza e colpiscono la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti affetti. Per queste ragioni, vi è una grande urgenza di strategie terapeutiche efficaci e sicure. Interventi sullo stile di vita, trattamenti farmacologici e chirurgici sono alcune delle strategie

Glossario

- 5-MTHF:** 5-methyltetrahydrofolate
- ACLY:** ATP-citrate lyase
- CD36:** cluster of differentiation 36
- C/EBPs:** CCAAT/enhancer binding proteins
- ChREBP:** carbohydrate-responsive element-binding protein
- CPT1:** carnitine palmitoyltransferase
- CUX1:** cut-like homeobox 1
- DNMT:** DNA methyltransferases
- EWAS:** epigenome-wide association studies
- FASN:** fatty acid synthase
- FGF21:** fibroblast growth factor 21
- FTO:** fat mass and obesity associated
- H3K4me3:** histone H3 lysine 4 trimethylated
- H3K9me2:** histone H3 lysine 9 dimethylated
- HAT:** histone acetyltransferases
- HCC:** hepatocellular carcinoma
- HDAC:** histone deacetylases
- HIF3A:** hypoxia inducible factor 3A
- HMT:** histone methyltransferases
- IGF2:** insulin-like growth factor 2
- JHDM:** jumoni-C domain containing histone demethylases MeCP2, Methyl CpG-binding protein 2
- mGWAS:** metabomics genome-wide association studies
- MTR:** 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
- NAFLD:** non-alcoholic fatty liver disease
- NASH:** non-alcoholic steatohepatitis
- PC:** phosphatidylcholine
- PPAR α :** peroxisome proliferator-activated receptor α
- PPAR γ :** peroxisome proliferator-activated receptor γ
- PGC1 α :** peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
- RPGRIP1L:** retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 like
- RXR α :** retinoid X receptor α
- SAH:** S-adenosyl homocysteine
- SAMe:** S-adenosyl methionine
- SQLE:** squalene epoxidase
- SREBF2:** sterol regulatory element-binding transcription factor 2
- STARD:** steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer domain
- TET:** ten-eleven Translocation
- UCP1:** uncoupling protein 1
- WAT:** white adipose tissue

Questionario di auto-apprendimento

A. L'acetilazione delle lisine degli istoni richiede:

1. metionina
2. acetil-CoA
3. corpi chetonici

B. Gli enzimi istone deacetilasi (HDAC):

1. rendono la cromatina più rilassata e più accessibile ai fattori di trascrizione
2. rendono la cromatina meno rilassata e meno accessibile ai fattori di trascrizione
3. rimuovono gruppi metilici dagli istoni

C. Quale tra i seguenti intermedi metabolici è coinvolto nella metilazione degli istoni e del DNA:

1. piruvato
2. S-adenosilmetionina (SAME)
3. acetil-CoA

D. La supplementazione di alcuni componenti della dieta che favoriscono la metilazione degli istoni (colina, betaina, acido folico e vitamina B12):

1. favorisce l'obesità
2. favorisce l'insorgenza di diabete mellito di tipo 2
3. previene l'amplificarsi dell'obesità attraverso le generazioni

E. Le diete povere di molecole che donano gruppi metilici:

1. prevengono l'accumulo di lipidi nel fegato e la NAFLD
2. favoriscono l'accumulo di lipidi nel fegato e predispongono alla NAFLD
3. proteggono dall'insorgenza di diabete mellito di tipo 2

F. La carenza di folati può:

1. proteggere da steatosi epatica
2. prevenire l'insorgenza di insulino-resistenza
3. indurre steatosi epatica

G. Nei pazienti affetti da NASH:

1. i livelli di miR-122 sono aumentati rispetto ai soggetti sani
2. i livelli di miR-122 sono ridotti rispetto ai soggetti sani
3. i livelli di miR-122 non differiscono rispetto ai soggetti sani

Risposte corrette:

A2, B2, C2, D3, E2, F3, G2

ad oggi utilizzate, ma l'effetto terapeutico è ancora modesto e presenta variabilità individuali.

Recentemente, l'aumentata conoscenza degli aspetti genetici ed epigenetici di queste patologie ha stimolato nuovo interesse nello studio di possibili approcci di terapia personalizzata. I modificatori dell'epigenoma utilizzano intermedi del metabolismo per le loro reazioni enzimatiche. Conseguentemente, è possibile che le fluttuazioni dei livelli di questi metaboliti, principalmente determinati dalla dieta, possa avere un impatto sulla regolazione dell'espressione genica tale da indurre in alcuni casi alla progressione di queste patologie.

Molti marcatori epigenetici sono teoricamente reversibili, suggerendo che possibili terapie con molecole bioattive potrebbero favorire il ripristino di profili epigenetici più favorevoli. La nutriepigonomica/nutriepigenetica, che studia l'impatto di nutrienti bioattivi sulle modificazioni dell'epigenoma, potrebbe, infatti, fornire un ulteriore contributo su questi aspetti. Come abbiamo appena descritto, le modificazioni degli istoni e del DNA giocano un ruolo importante nella patogenesi delle malattie metaboliche. Ad ogni modo, bisogna puntualizzare che possibili approcci in grado di normalizzare l'epigenoma sono ancora da definire. A questo proposito, lo sviluppo di farmaci epigenetici che abbiano come bersagli i modificatori dell'epigenoma potrebbe essere una strategia promettente per ristabilire un corretto assetto dell'epigenoma e "correggere" il fenotipo patologico, soprattutto nelle prime fasi della progressione della patologia. Tuttavia, molto rimane da risolvere poiché è necessario chiarire i meccanismi di plasticità dell'epigenoma e come ciò si associ allo sviluppo di patologie metaboliche.

Conclusioni

In questa rassegna abbiamo citato numerosi studi che evidenziano una stretta connessione tra metabolismo ed epigenetica nel contesto delle patologie su base metabolica. Una migliore e più profonda comprensione delle dinamiche molecolari che orchestrano la risposta epigenetica alla disponibilità di nutrienti consentirà di esplorare nuove possibili strategie terapeutiche per il trattamento delle patologie cardiometaboliche.

Ringraziamenti

Ci scusiamo di non aver citato numerose ed importanti pubblicazioni per limitazioni di spazio. Questa rassegna è supportata dai progetti EU FP7 606806 NR-NET e FP7 602757 HUMAN a MC, da Progetto Fondazione CARIPLO 2015-0641 a MC da Progetto Dipartimento di Eccellenza del Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR). Desideriamo inoltre ringraziare la Sig.ra Elda Desiderio Pinto per la preziosa assistenza amministrativa.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni la connessione tra metabolismo ed epigenetica nelle patologie cardiometaboliche è stata evidenziata da numerose pubblicazioni. La disponibilità di metaboliti rappresenta un fattore cruciale che condiziona non solo il metabolismo cellulare ma anche la regolazione epigenetica dell'espressione genica, due aspetti che possono essere alterati nelle malattie cardiometaboliche. Infatti, i modificatori dell'epigenoma sono enzimi che utilizzano come substrati o cofattori intermedi del metabolismo. Questa rassegna pone l'accento sulla rilevanza della regolazione epigenetica nelle patologie su base metaboliche. In particolare, prendiamo in esame le correlazioni tra epigenetica e obesità e diabete di tipo 2, importanti fattori di rischio per le patologie cardiovascolari. Strettamente interconnessa a queste patologie, anche la steatosi epatica non alcolica è una patologia su base metabolica di grande rilevanza di cui esaminiamo possibili relazioni con i meccanismi epigenetici. Inoltre, discuteremo possibili approcci terapeutici basati sul rimodellamento dell'epigenoma "patologico" e del metabolismo.

Parole chiave: *Malattie metaboliche, regolazione del metabolismo, epigenetica, diabete, obesità, steatosi epatica*

Bibliografia

1. Feil R, Fraga MF. (2012) Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 97-109.
2. Mentch SJ, Mehrmohamadi M, Huang L, Liu X, Gupta D., Mattocks D, Gómez Padilla, et al. W. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* 2015; 22: 861-873.
3. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* (80-). 2009; 324: 1076-1080.
4. Ferrari A, Longo R, Fiorino E, Silva R, Mitro N, Cermenati, G., et al. HDAC3 is a molecular brake of the metabolic switch supporting white adipose tissue browning. *Nat. Commun.* 2017; 8: 93
5. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA., et al. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Rep.* 2016; 17: 1463.1472.
6. Gao X, Lin SH, Ren F, Li JT, Chen JJ, Yao CB, et al. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat. Commun.* 2016; 7: 1-14.
7. Imai SI, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000; 403: 795-800.
8. Kim YJ, Lee HS, Kim YK, Park S, Kim JM, Yun JH, et al. Association of metabolites with obesity and type 2 diabetes based on FTO genotype. *PLoS One.* 2016; 11: 1-11.
9. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Sau-

- dek V, Hewitson KS, et al. (The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007; 31: 1469-1472.
10. Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Wells S, et al. UKPMC Funders Group Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet*. 2011; 42: 1086-1092.
 11. Church C, Lee S, Bagg EAL, McTaggart JS, Deacon R, Gerken T, et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet*. 2009; 10.1088/0022-3700/17/7/024
 12. Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, Rüther U. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*. 2009; 458: 894-898.
 13. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, et al. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol*. 2011; 7: 885.
 14. Saletore Y, Meyer K, Korfach J, Vilfan ID, Jaffrey S, Mason CE. The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome Biol*. 2012; 13: 175.
 15. Nowacka-Woszuk J, Pruszyńska-Oszmalek E, Szydłowski M, Szczerbal I. Nutrition modulates Fto and Irx3 gene transcript levels, but does not alter their DNA methylation profiles in rat white adipose tissues. *Gene*. 2017; 610: 44-48.
 16. Mizuno TM, Lew PS, Luo Y, Leckstrom A. Negative regulation of hepatic fat mass and obesity associated (Fto) gene expression by insulin. *Life Sci*. 2017; 170: 50-55.
 17. Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, La Serna I, Chin K-V. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010; 401: 390-395.
 18. Demerath EW, Guan W, Grove ML, Aslibekyan S, Mendelson M, Zhou, et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum. Mol. Genet*. 2015; 24: 4464-4479.
 19. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D., Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis. *Lancet*. 2014; 383: 1990-1998.
 20. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira M. et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: A genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci. Rep*. 2017; 7: 1-13.
 21. Sayols-Baixeras S, Subirana I, Fernández-Sanlés A, Sentí M, Lluís-Ganella C, Marrugat, J, Elosua R. DNA methylation and obesity traits: An epigenome-wide association study. The REGICOR study. *Epigenetics*. 2017; 12: 909-916.
 22. Stratigopoulos G, LeDuc CA, Cremona ML, Chung WK, Leibel RL. Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RP-GRIP1L) genes and coordinates leptin receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 2011; 286: 2155-2170.
 23. Tateishi K, Okada Y, Kallin EM, Zhang Y. Role of Jhd2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature*. 2009; 458: 757-761.
 24. Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura, et al. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHD-M2a-deficient mice. *Genes to Cells*. 2009; 14: 991-1001.
 25. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R. et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature*. 2004; 429: 771-776.
 26. Knutson SK, Chyla BJ, Amann JM, Bhaskara S, Huppert SS, Hiebert SW. Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J*. 2008; 27: 1017-1028.
 27. Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Laza MA. A Circadian Rhythm Orchestrated By Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. 2012; 331: 1315-1319.
 28. Sun Z, Miller RA, Patel RT, Chen J, Dhir R, Wang H, et al. Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat. Med*. 2012; 18: 934-942.
 29. Galmozzi A, Mitro N, Ferrari A, Gers E, Giaraldi F, Godio C. et al. Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes*. 2013; 62: 732-742.
 30. Ferrari A, Fiorino E, Longo R, Barilla S, Mitro N, Cermenati G. et al. Attenuation of diet-induced obesity and induction of white fat browning with a chemical inhibitor of histone deacetylases. *Int. J. Obes*. 2017; 41: 289-298.
 31. Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Tews D, Unterkircher T, Debatin KM, Fulda S, Wabitsch M. Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am. J. Clin. Nutr*. 2010; 92: 5-15.
 32. Yun M., Jialal I, Devaraj S. Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin. *J. Nutr. Biochem*. 2011; 22: 450-458.

33. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105: 17046-17049.
34. Martinez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalkinske KL. Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 2014; 5: 71-81.
35. Gine R, Steegers-Theunissen P, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C. et al. Periconceptional Maternal Folic Acid Use of 400 mg per Day Is Related to Increased Methylation of the IGF2 Gene in the Very Young Child. *PLoS One.* 2009; 4: e7845.
36. Godfrey KM, Crozier SR, Emerald BS, Gale CR, Inskip HM, Cooper C. et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes.* 2011; 60: 1528-1534.
37. RA, W, M, T, KG, T, MT, R, S, M. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int. J. Obes.* 2008; 32: 1373-1379.
38. Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM., Freund JN, Dulluc I, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie.* 2013; 95: 1033-1040.
39. Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J. Pathol.* 2011; 225: 324-335.
40. Murphy SK, Yang H, Cynthia A, M, Herbert P, Andrew D, Abdelmalek MF, et al. Relationship Between the Methylome and Transcriptome in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: (Functional methylation in NAFLD). *Gastroenterology.* 2013; 145: 1076-1087.
41. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 2007; 5: 415-425.
42. Inagaki T. Research Perspectives on the Regulation and Physiological Functions of FGF21 and its Association with NAFLD. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2015; 6: 147.
43. Kajikawa S, Imada K, Takeuchi T, Shimizu Y, Kawashima A, Harada T, Mizuguchi, K. Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. *Dig. Dis. Sci.* 2011; 56: 1065-1074.
44. Pogribny IP, Trynyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA, et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J. Hepatol.* 2009; 51: 176-186.
45. Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the fatty acid synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes Nutr.* 2013; 8: 105-113.
46. Champier J, Claustrat F, Nazaret N, Montange MF, Claustrat B. Folate depletion changes gene expression of fatty acid metabolism, DNA synthesis, and circadian cycle in male mice. *Nutr. Res.* 2012; 32: 124-132.
47. Tian Y, Wong VWS, Chan HLY, Cheng ASL. Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23: 471-482.
48. Kyle SM, Saha PK, Brown HM, Chan LC, Justice MJ. MeCP2 co-ordinates liver lipid metabolism with the NCoR1/HDAC3 corepressor complex. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25, 3029-3041.
49. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology.* 2008; 48: 1810-1820.
50. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 99-103.
51. Tryndyak VP, Latendresse JR, Montgomery B, Ross SA, Beland FA, Rusyn I, Pogribny IP. Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 262: 52-59.