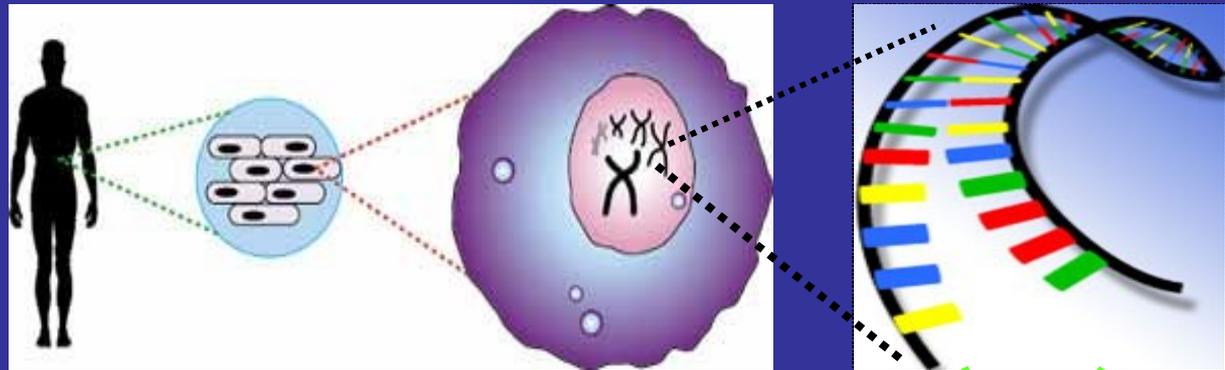


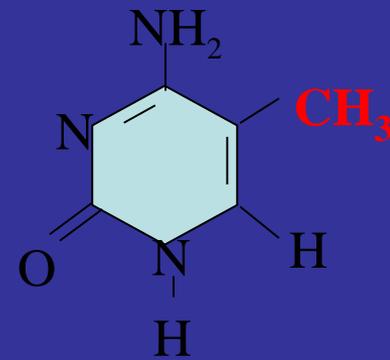
Epigenetica nella regolazione dell'espressione genica



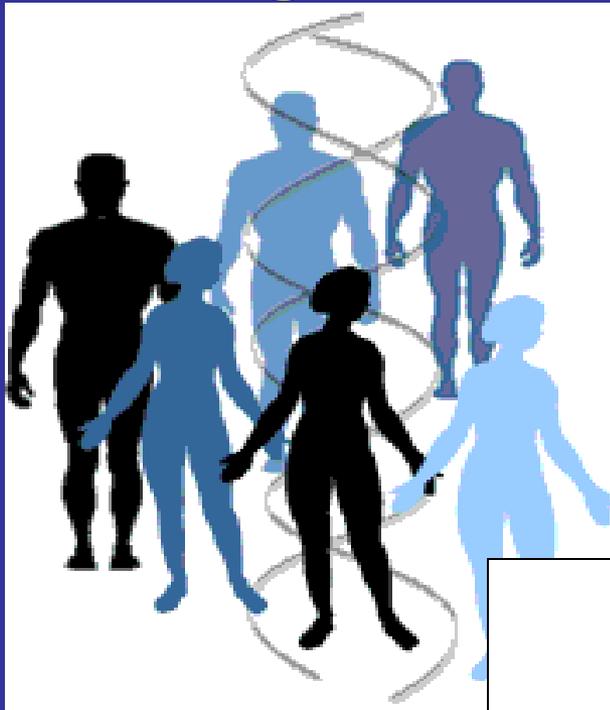
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT

Argomenti della lezione:

- Che cosa è l'epigenetica
- Modelli di regolazione epigenetica
- Alterazioni di regolazione epigenetica



Tutti uguali, Tutti diversi



Polymorphism

"Poly" *many* "morphe" *form*



ACTCAGTTGA

General
population

94%

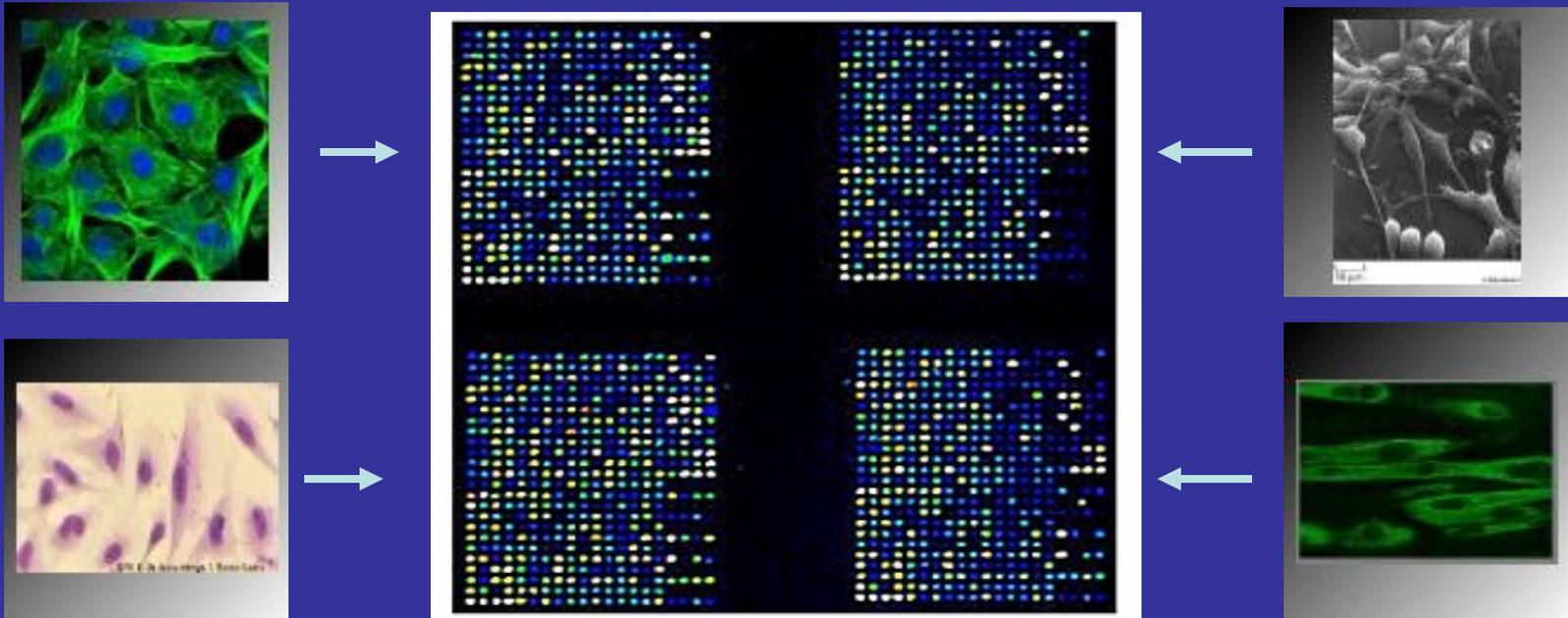
ACTCAGTTTA

Single nucleotide
polymorphism
(SNP)

6%

Le cellule di uno stesso individuo:

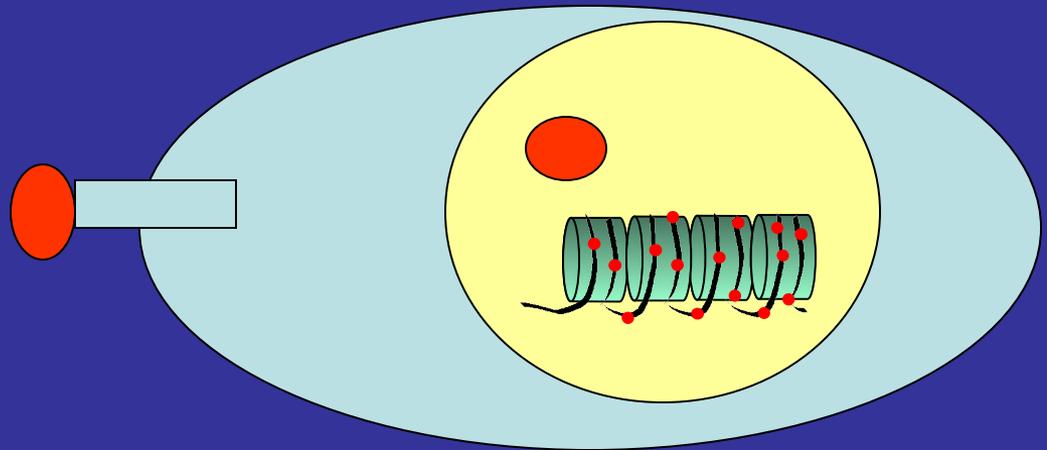
- stesso genoma
- differenti fenotipi
- differenti profili di espressione



Espressione Cellulo/tessuto-specifica:

- stimoli esterni
- ambiente
- fattori di trascrizione

-EPIGENOMA



Che cosa è l' EPIGENETICA?

- Col termine di 'Epigenetica' si indicano modificazioni del DNA e della cromatina che influenzano il genoma e l'espressione genica senza alterare il DNA stesso
- L'epigenoma decide che gene deve essere "ON" oppure "OFF" in una singola cellula, determinando un segnale di espressione genica.
- L'epigenoma può essere ereditato da generazioni di cellule, salvando lo stesso programma genico o può cambiare (plasticità dell'epigenoma)

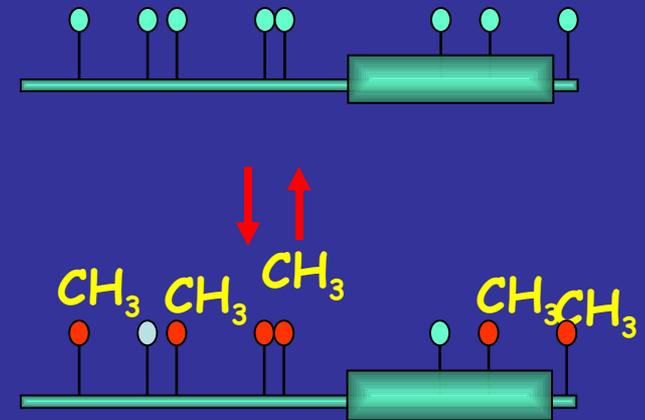
STESSO GENOMA, DIFFERENTE EPIGENOMA

TRE PRICIPALI INFORMAZIONI EPIGENETICHE

1) METILAZIONE DEL DNA METILOMA

Metilazione delle citosine del DNA

Modificazione covalente del DNA in cui DNA-5methyltransferasi trasferisce un Me gruppo da S-adenosylmethionine alla posizione C5 di citosina. La metilazione del DNA avviene ai CpG nucleotidi con un ruolo importante nell' espressione genica e silenziamento di elementi ripetuti

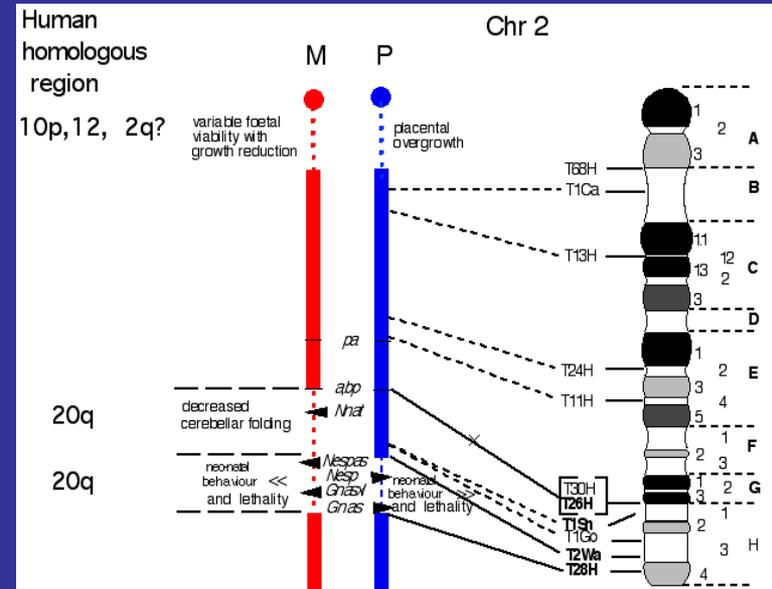


2) 'Genomic Imprinting'

'E una regolazione epigenetica del dosaggio genico. 'E mantenuto in parte da regioni diversamente metilate e riprogrammate normalmente nella linea germinale.

'Imprinted genes' : 80% in 'clusters' legati fisicamente

Regolazione coordinata in specifici domini cromosomici



'Centri di controllo Imprinting' (ICs or ICCs) esistono e sono richiesti per il controllo regionale dell' imprinting

Perchè avviene?

Si deve trovare un equilibrio. Esempio:

Padre – promuove la crescita fetale

Madre - controlla la crescita fetale

Meccanismo di Difesa

Patologie della regolazione da imprinting

- Perdita dell'allele non soggetto ad imprinting \Rightarrow assenza di proteina
- Perdita dell'imprinting (LOI, *loss of imprinting*) \Rightarrow livello di proteina raddoppiato rispetto al normale

La sindrome **Prader-Willi** e **Angelman** sono un esempio eccellente dell'imprinting come malattia.

Entrambe sono il risultato di una delezione (nella maggior parte dei casi) nella stessa area del cromosoma 15.

PWS è la sindrome che si instaura se ereditata dal **padre**, **AS** se ereditata dalla **madre**

Prader-Willi

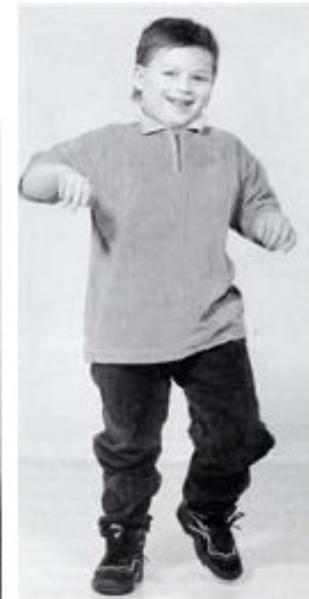
- Bassa statura
- Obesità
- Ipogonadismo
- Mani e piedi piccoli
- Ritardo mentale



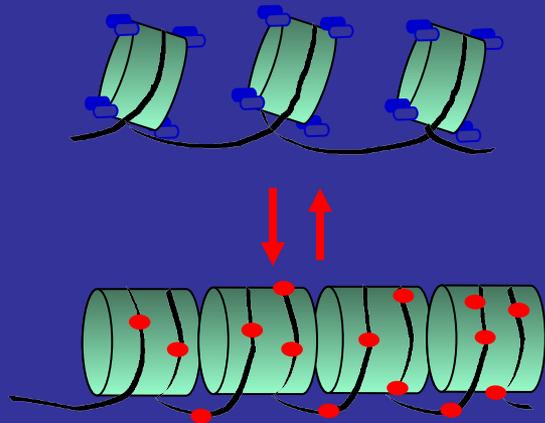
Tratte da Nusbaum et al, Thompson & Thompson
Genetics in Medicine, WB Saunders Co. e da Jorde
et al, Medical genetics, Mosby

Angelman

- Bassa statura
- Ritardo mentale grave
- Convulsioni
- Postura tipica
- Facilità al riso



3) Modificazioni della Cromatina

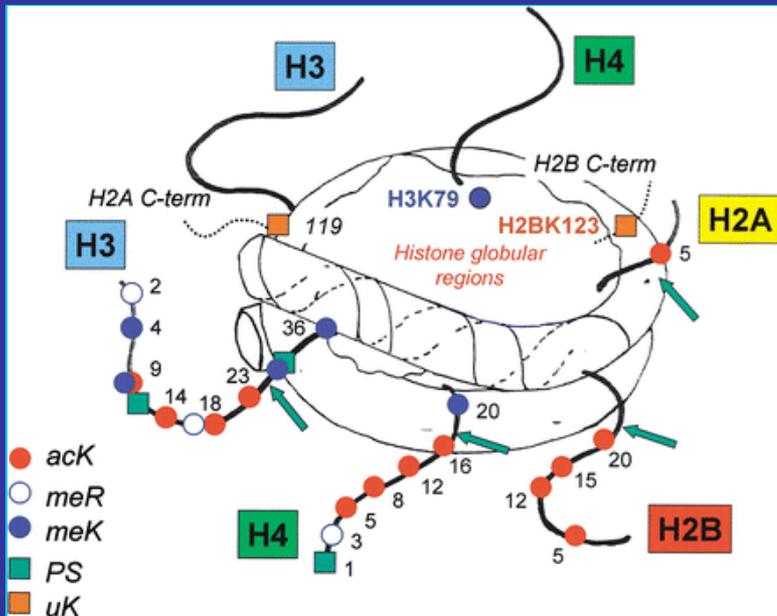
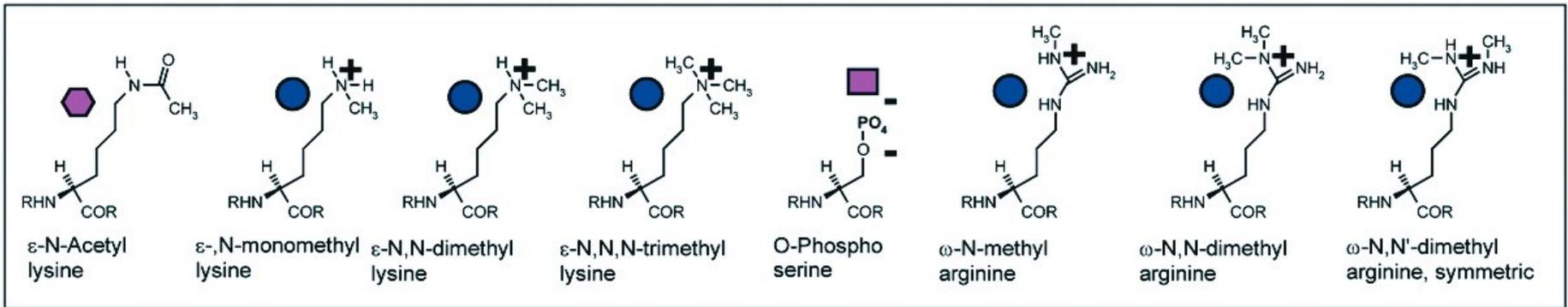


Modificazioni istoniche

Acetilazione, metilazione, fosforilazione etc sono importanti nella regolazione trascrizionale e molti sono mantenuti stabilmente durante la divisione cellulare anche se il meccanismo di questa specifica ereditabilità non è ancora ben compreso. Le proteine che mediano queste modificazioni sono spesso in complesso con quelle che regolano la metilazione del DNA

Codice istonico o 'Signal transduction'? L'enigma....

Categorie delle modificazioni covalenti



Modificazioni:

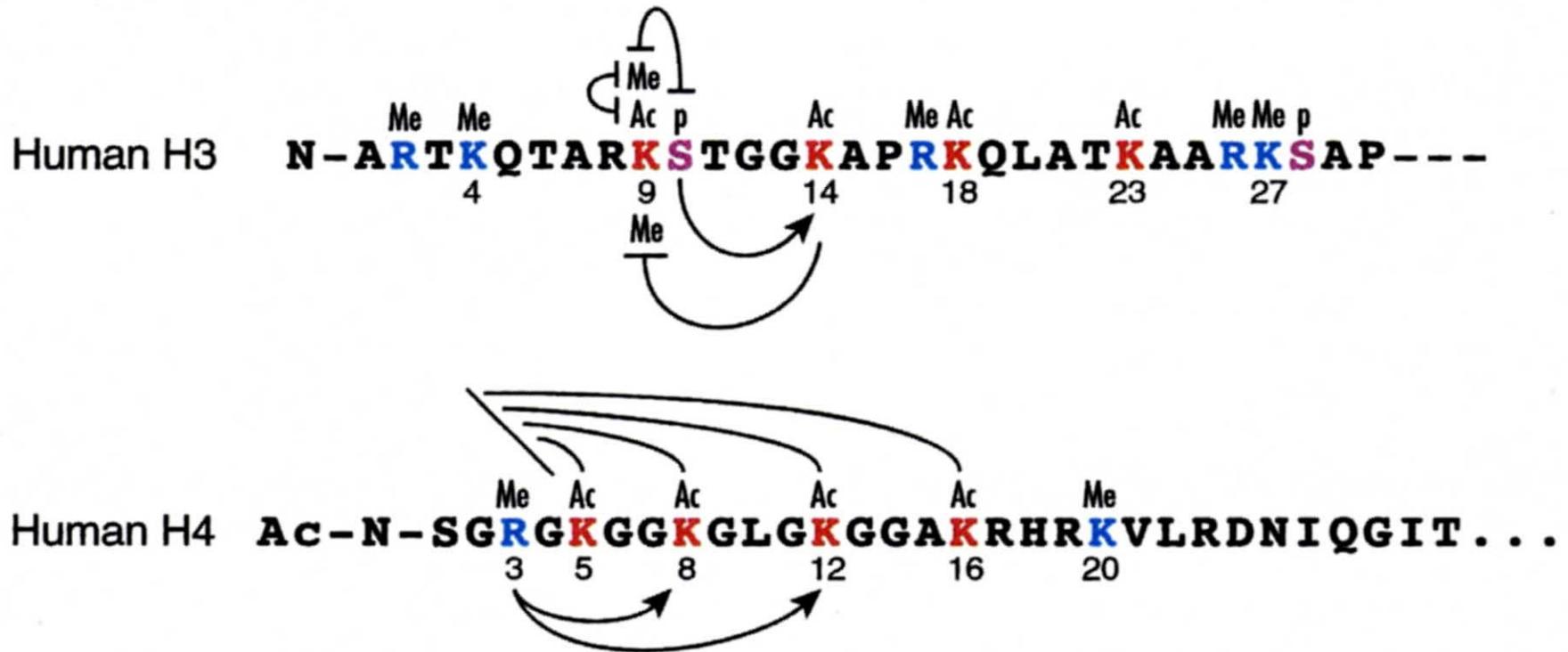
Arg: Mono- & Di-metilazione

His: Fosforilazione (H4)

Lys: Acetilazione
 Mono-, Di-, & Tri-metilazione
 Ubiquitinazione
 Sumoilazione

Ser/Thr: Fosforilazione

Modificazioni post-Traslazionali sugli istoni H3 and H4



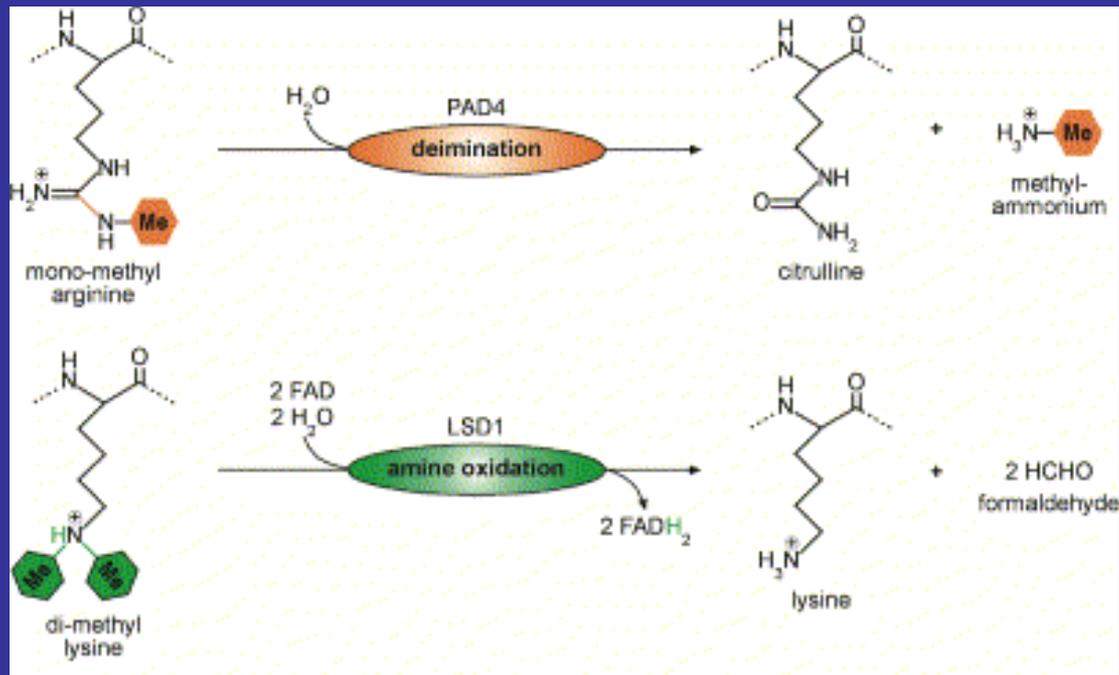
Demetilasi istoniche

Arginina Deiminazione:

Catalizzata da PAD (Protein Arginine Deiminases)
Risulta in citrullina e metil-ammonio

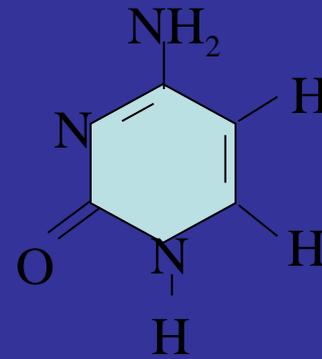
Demetilazione:

Catalizzata da LSD (Lysine-specific Demethylases)

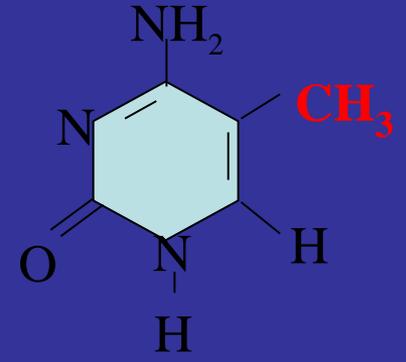


Metilazione del DNA

Nei vertebrati la metilazione interessa solamente la **Citosina** sul dinucleotide CpG : l'enzima citosina metiltransferasi aggiunge un **gruppo metile** al **C5** della citosina:il risultato è la **5-metilcitosina**.



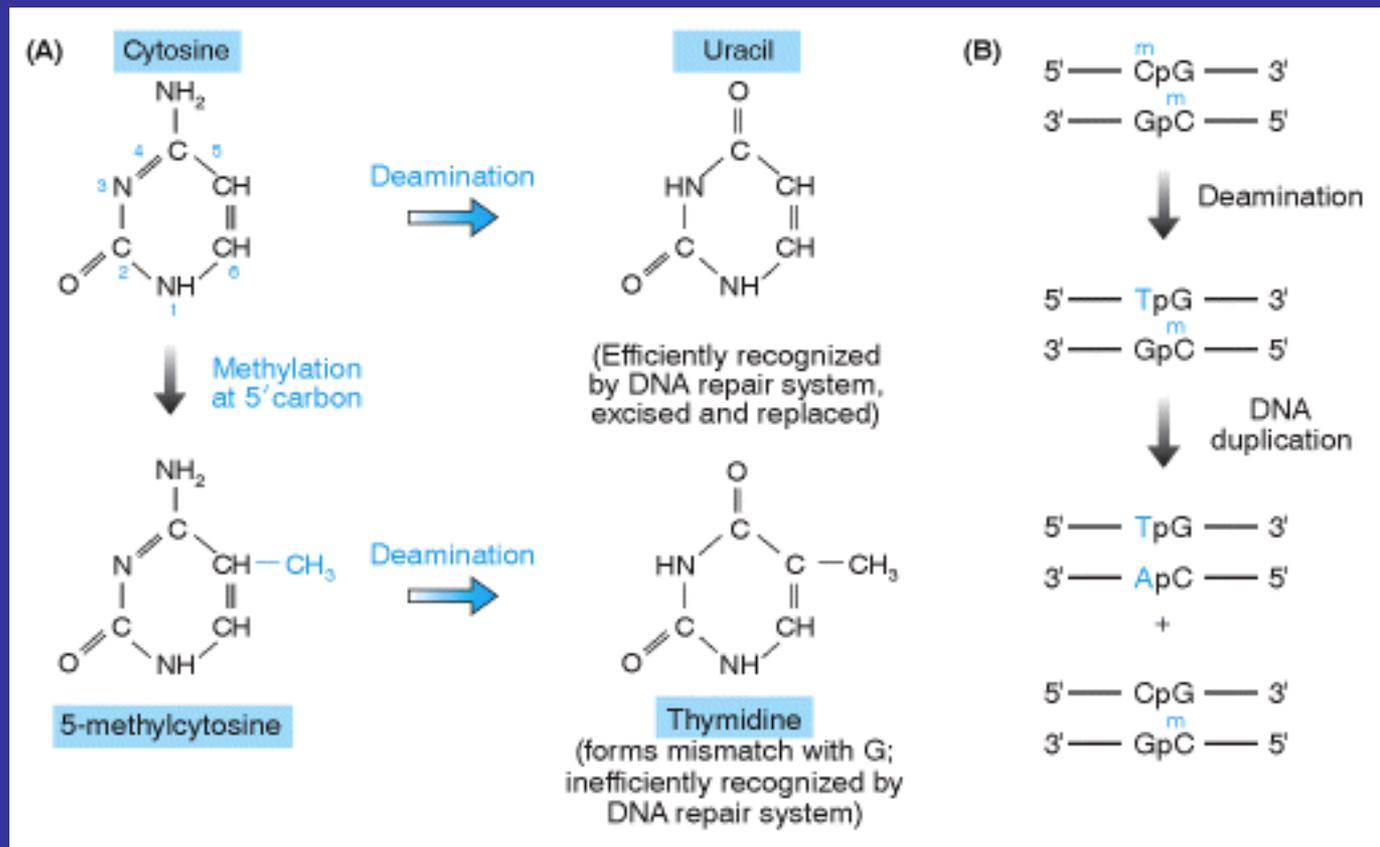
Citosina



Metil-citosina

Metilazione del DNA

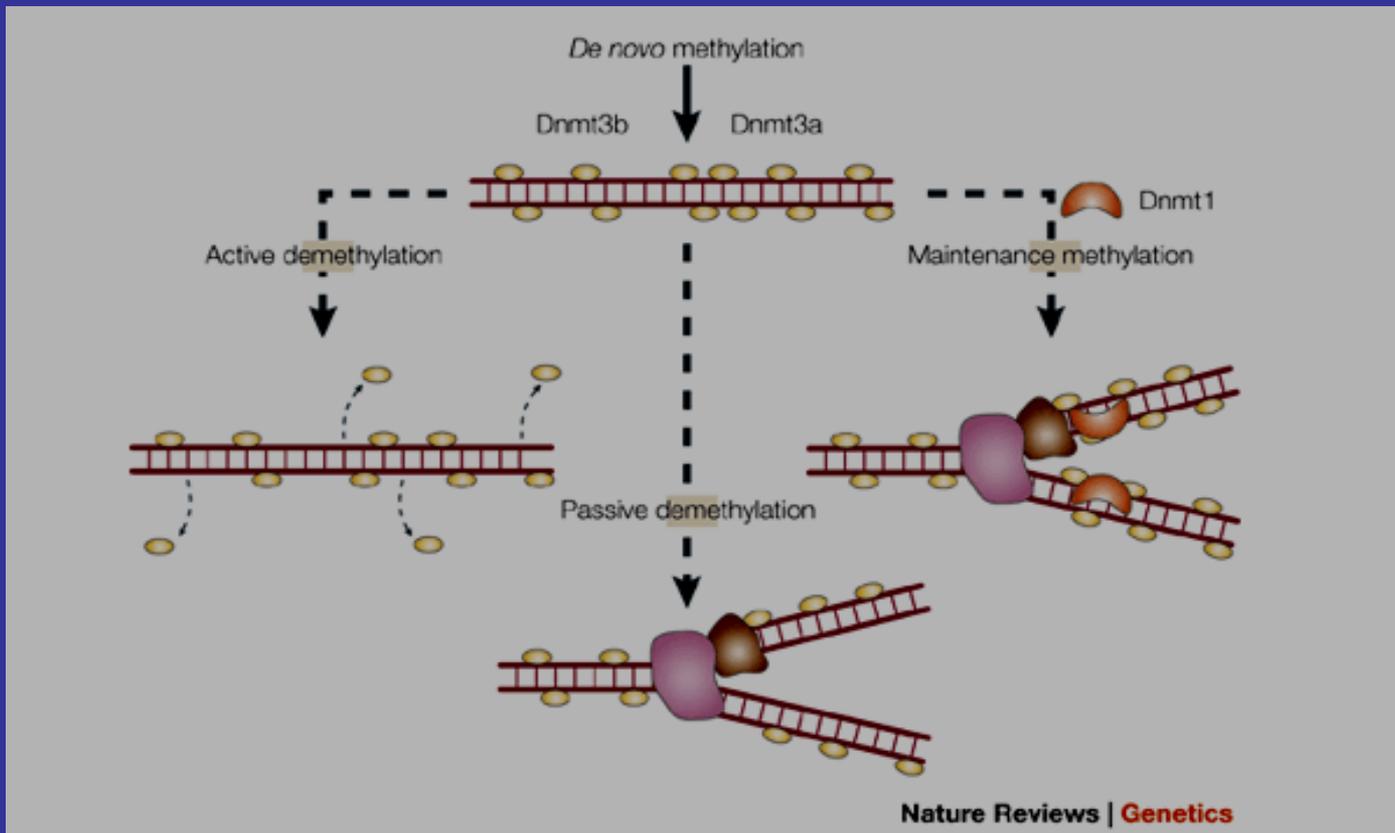
- Le sequenze CpG sono sotto-rappresentate nel genoma (probabilmente per la tendenza della 5-metilcitosina a venire deaminata e mutata in T)



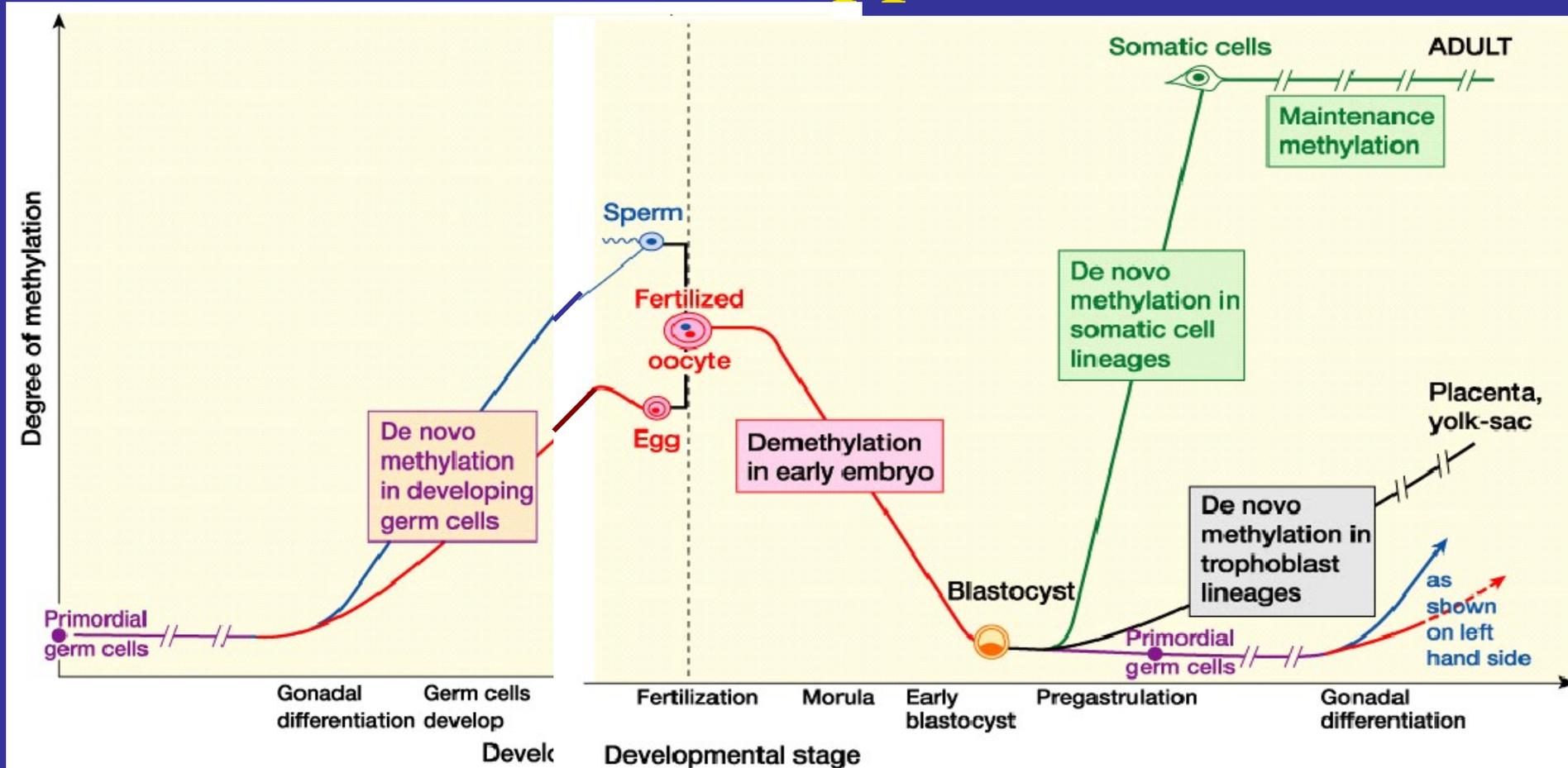
- ma abbondanti nelle regioni promotrici dei geni

Fasi di metilazione:

- Metilazione differenziale *de novo* (Dnmt3a e Dnmt3b);
- Mantenimento della metilazione e trasmissione alle cellule figlie (Dnmt1).
- Demetilazione (natura sconosciuta, per ora, delle demetilasi);



La metilazione è regolata durante lo sviluppo:

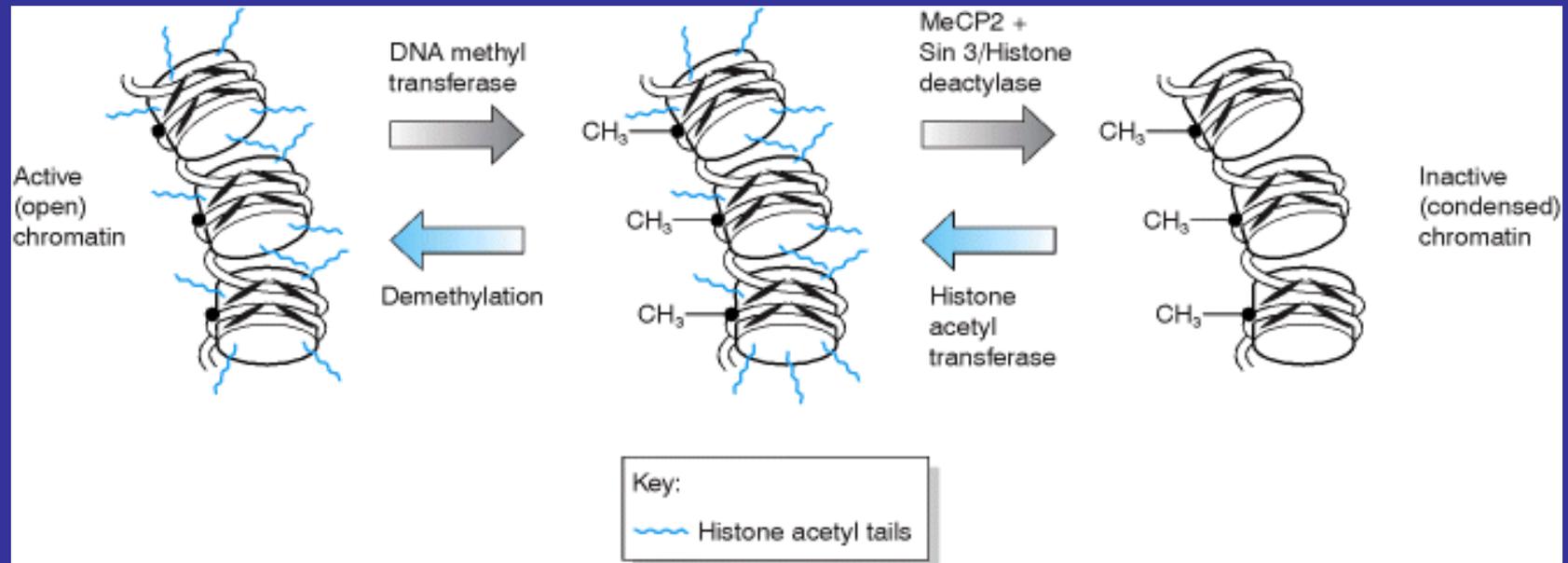


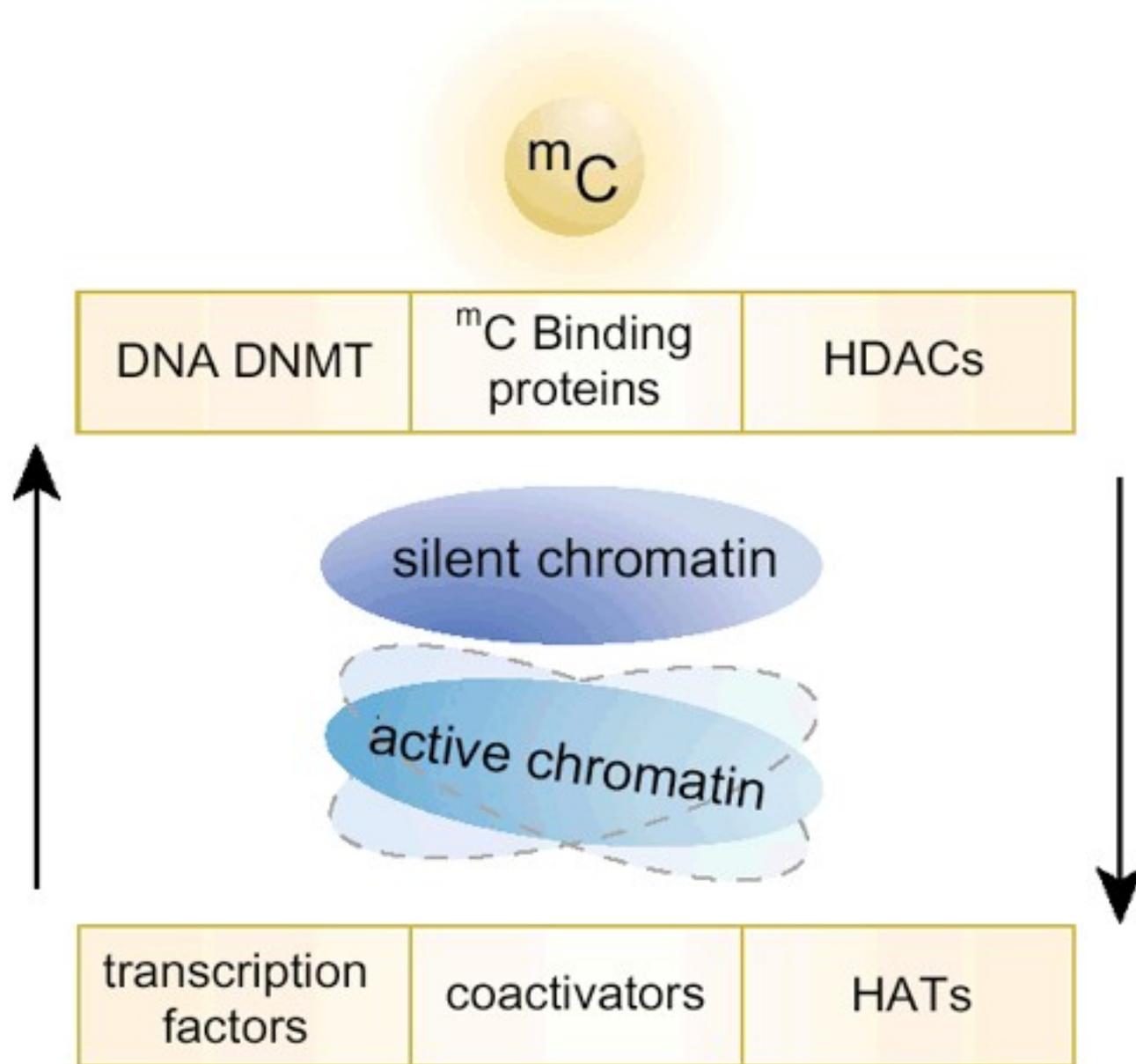
Le principali funzioni della metilazione sono collegate alla repressione della trascrizione:

- Difesa contro i trasposoni: la metilazione e' fondamentale per mantenere silenti i genomi dei trasposoni e dei retrotrasposoni
- Regolazione genica: la metilazione contribuisce a stabilire e mantenere uno stato trascrizionalmente inattivo (eterocromatina)

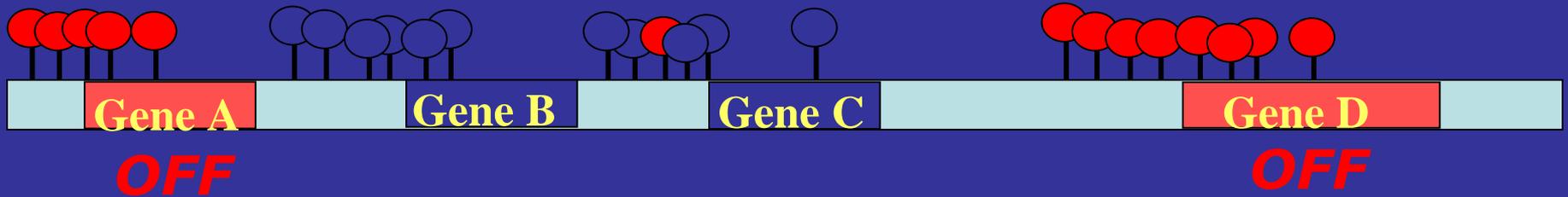
Metilazione e regolazione genica:

- Dnmt metilano il DNA
- Il DNA metilato è legato da proteine che legano il metile
(MeCP2, MBD1-4)
- Queste a loro volta sono in grado di reclutare diversi HDAC -> repressione della trascrizione

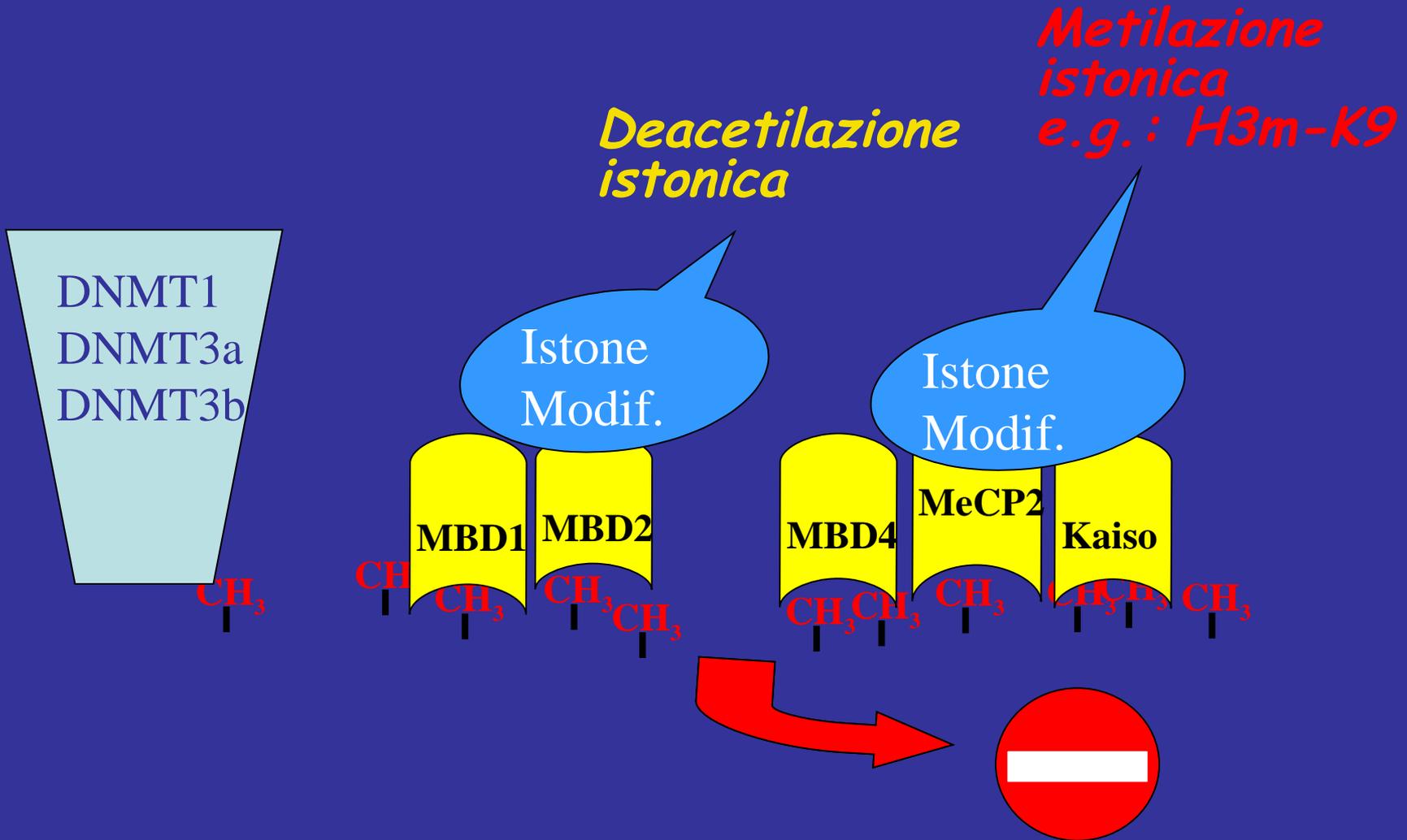




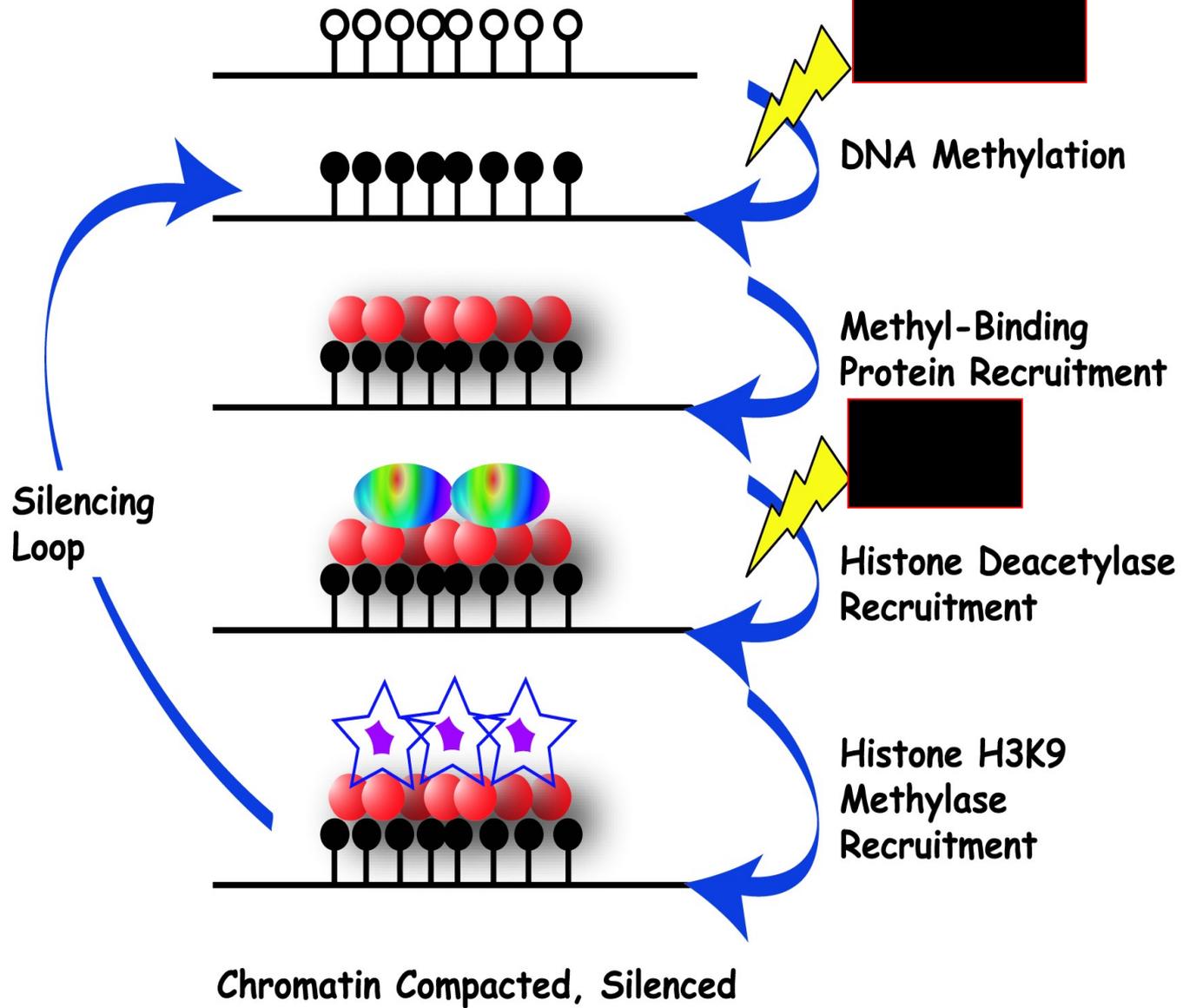
Effetti della CpG metilazione sull'espressione genica



Sequenze di eventi che collegano la configurazione della cromatina e la repressione trascrizionale da metilazione del DNA

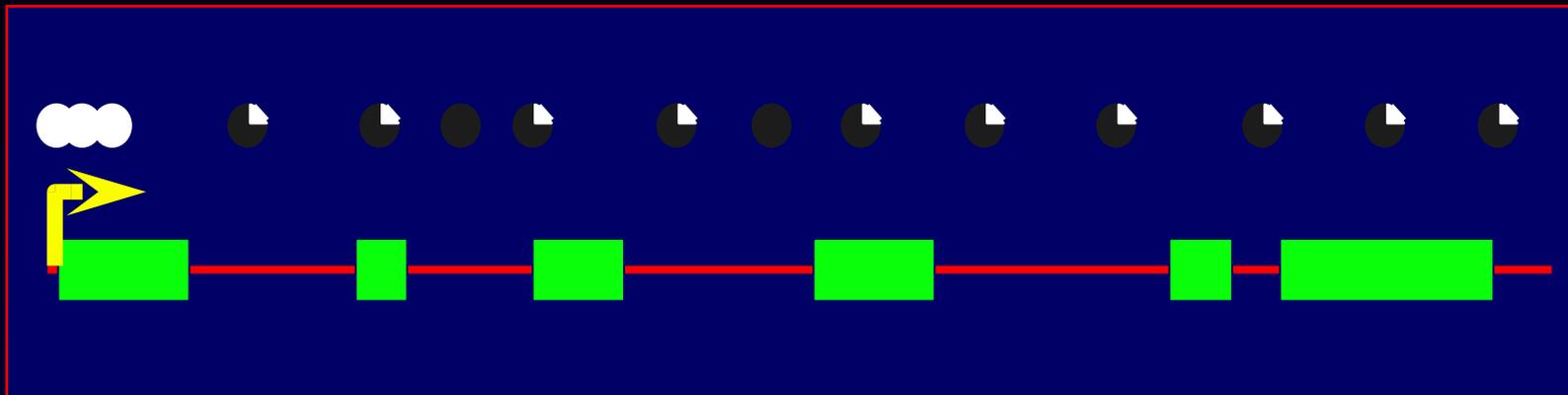


Open Chromatin, Ready for Expression

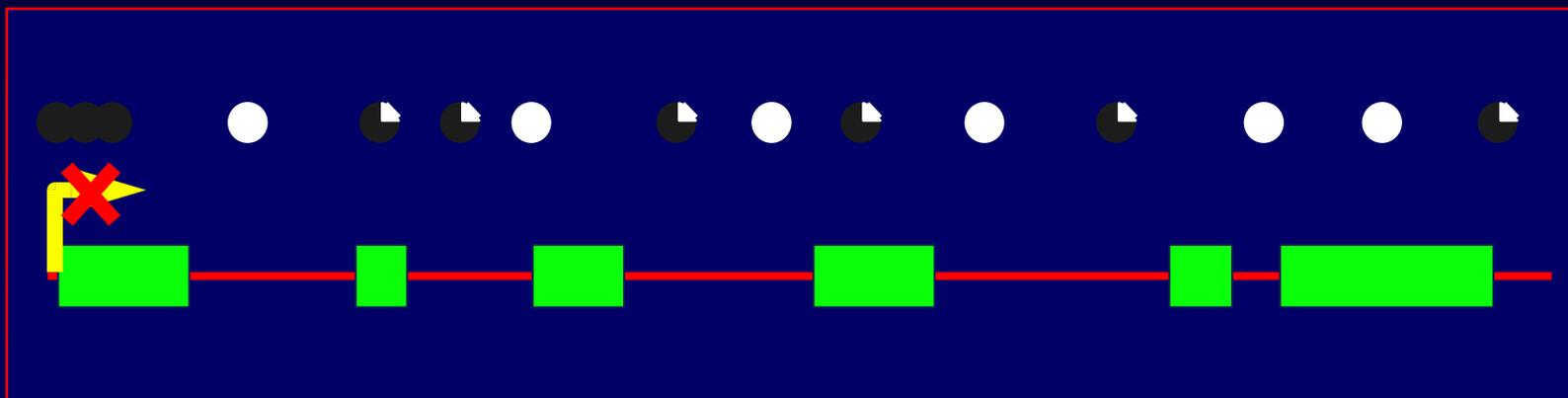


Chromatin Compacted, Silenced

Patterns di Metilazione del DNA nel Genoma

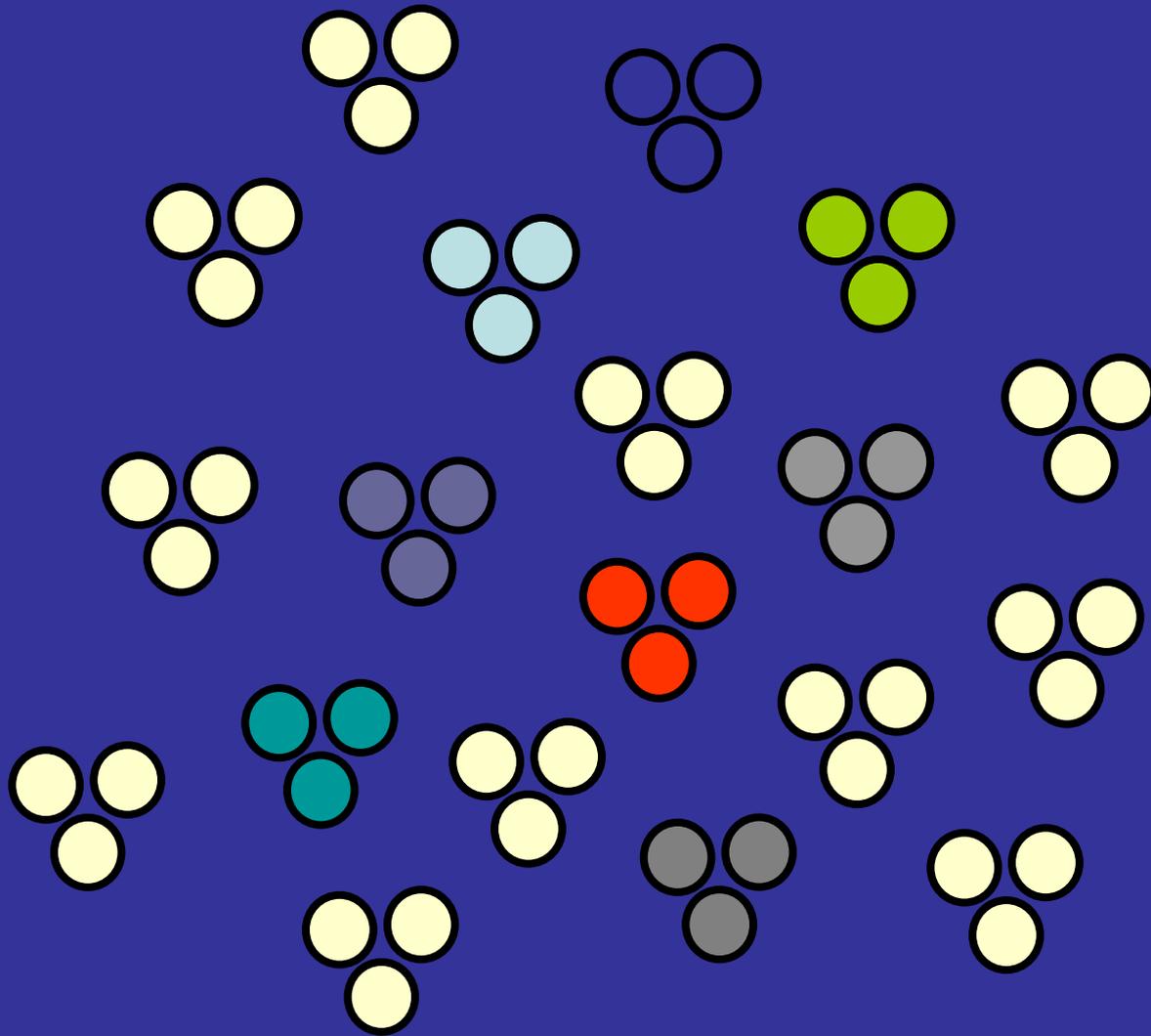


Geni autosomici

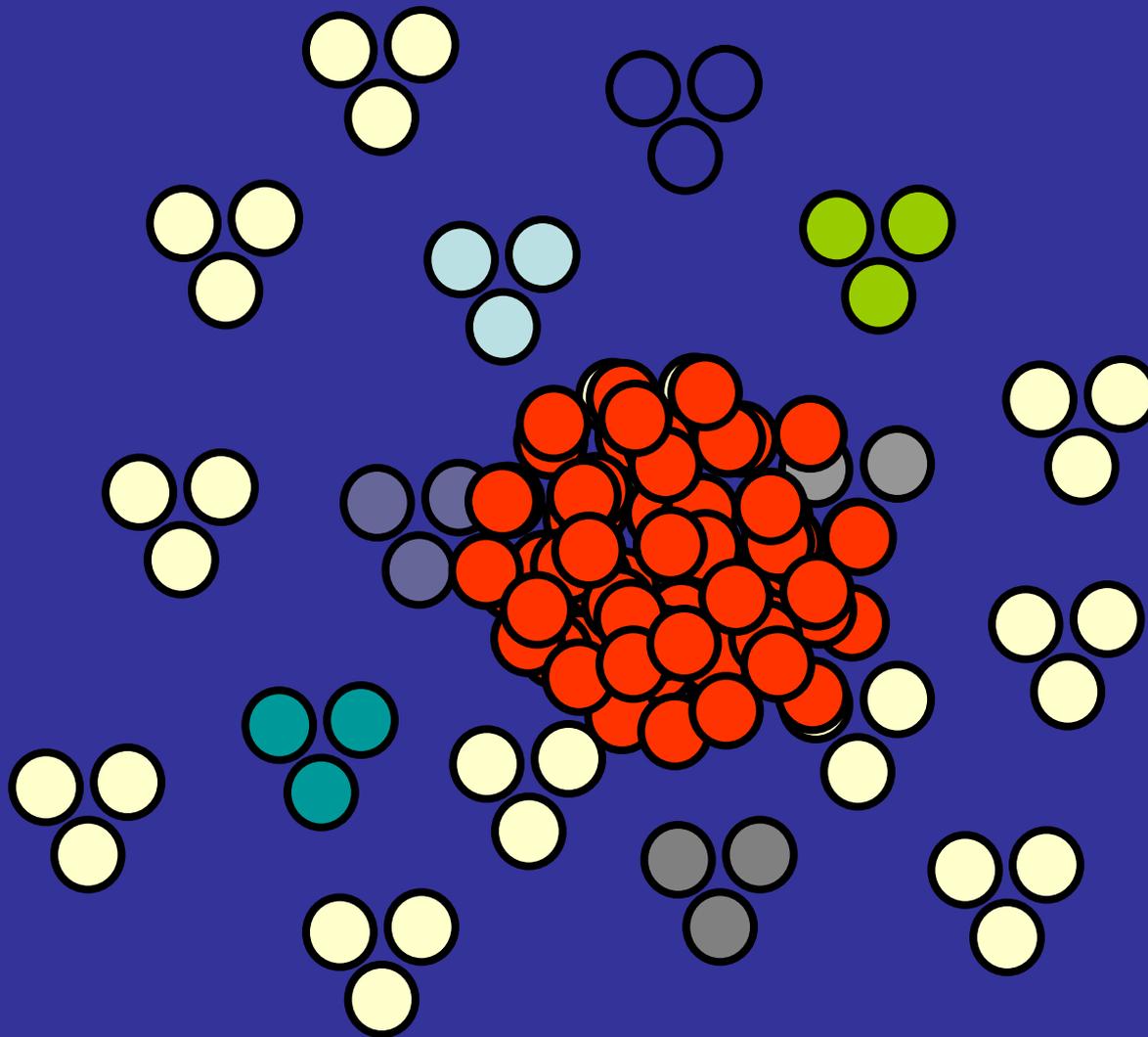


'Imprinted genes'

Mosaicismo epigenetico nell'invecchiamento



Mosaicism epigenetico nell'invecchiamento



Sia ipo- che iper-metilazione sono stati associati all'invecchiamento cellulare:
perdita generica di metilazione, ipermetilazione di geni specifici

Epigenetica & malattia

Table 1 Epigenetic diseases

Disease	Symptom	Aetiology	References
ATR-X syndrome	Intellectual disabilities, α -thalassaemia	Mutations in <i>ATRX</i> gene, hypomethylation of certain repeat and satellite sequences	82
Fragile X syndrome	Chromosome instability, intellectual disabilities	Expansion and methylation of CCG repeat in <i>FMR1</i> 5' UTR, promoter methylation	83
ICF syndrome	Chromosome instability, immunodeficiency	<i>DNMT3b</i> mutations, DNA hypomethylation	84
Angelman's syndrome	Intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (maternal)	85
Prader-Willi syndrome	Obesity, intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11-13 (paternal)	86
BWS	Organ overgrowth	Deregulation of one or more imprinted genes at 11p15.5 (e.g. <i>IGF2</i>)	87
Rett syndrome	Intellectual disabilities	<i>MeCP2</i> mutations	25, 26
α -Thalassaemia (one case)	Anaemia	Methylation of $\alpha 2$ -globin CpG island, deletion of <i>HBA1</i> and <i>HBG1</i>	23
Various cancers	Microsatellite instability	<i>De novo</i> methylation of <i>MLH1</i>	29
	Disruption of Rb, p53 pathway, uncontrolled proliferation	<i>De novo</i> methylation of various gene promoters	4
	Disruption of SWI-SNF chromatin remodelling complex	Mutations in <i>SMF5</i> , <i>BRG1</i> , <i>BRM</i>	36
	Overexpression of <i>IGF2</i> , silencing of <i>CDKN1C</i>	Loss of imprinting	88, 89
Leukaemia	Disturbed haematopoiesis	Chromosomal translocations involving HATs and HMTs	62
Rubinstein-Taybi syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in CREB-binding protein (histone acetylation)	90
Coffin-Lowry syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in <i>Sk-2</i> (histone phosphorylation)	90

ATR-X syndrome, α -thalassaemia, mental retardation syndrome, X linked; BWS, Beckwith-Wiedemann syndrome; CREB, cAMP-response-element-binding protein; HAT, histone acetyltransferase; HMT, histone methyltransferase; ICF, Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome; UTR, untranslated region.

Metilazione, regolazione genica e cancro:

Il pattern di metilazione dei geni è alterato nelle cellule tumorali, e metilazione alle isole CpG di certi geni è associata al loro silenziamento specifico

- il promotore del gene **RAR β**

Ciclo cellulare	RB1, INK 4a, INK4b, p14 ARF
‘Signal transduction’	APC, LKB1/STK11, RASSF1
‘Apoptosi’	DAPK, caspase-8
‘riparo del DNA’	MGMT, BRCA1, MLH1
Metabolismo di carcinogeni	GSTP1
Risposta ormonale	ER, PR, RAR
Metastasi	E-cadherin, VHL

E le modificazioni della cromatina ?

Uno squilibrio nell'acetilazione e della metilazione degli istoni può causare alterazioni della struttura della cromatina con regolazione aberrante di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, del differenziamento e/o dell'apoptosi

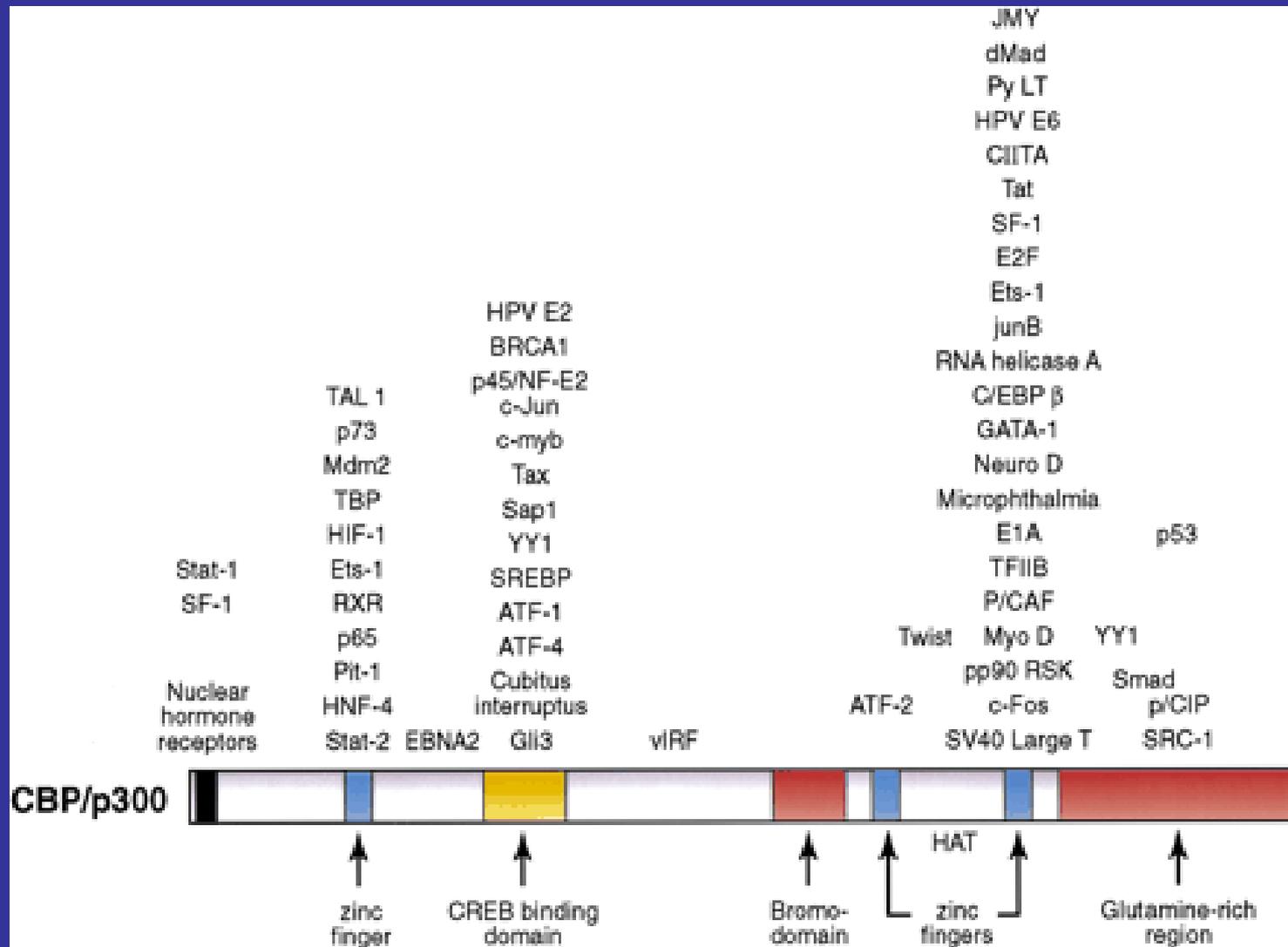
Vediamo qualche esempio:

Acetilazione aberrante nel cancro: coinvolgimento delle HAT-HDAC

HAT (Istone acetiltransferasi):

- Geni codificanti per diverse HAT si trovano traslocati, amplificati, sovraespressi e/o mutati in diversi tumori
- Mutazioni missenso o associate a p300 tronca **NON FUNZIONALE** si trovano associate a tumori del colon/retto e gastrici
- Gli individui con mutazione che inattiva l'attività HAT di CBP -> aumentato rischio di tumori
- perdita di eterozigosi attorno al locus di CBP è associata a carcinomi epatocellulari.
- Traslocazioni di p300 e CBP risultanti in fusioni in frame con diversi geni -> associate a diversi tumori ematologici

L'importanza delle acetilasi degli istoni: CBP/p300

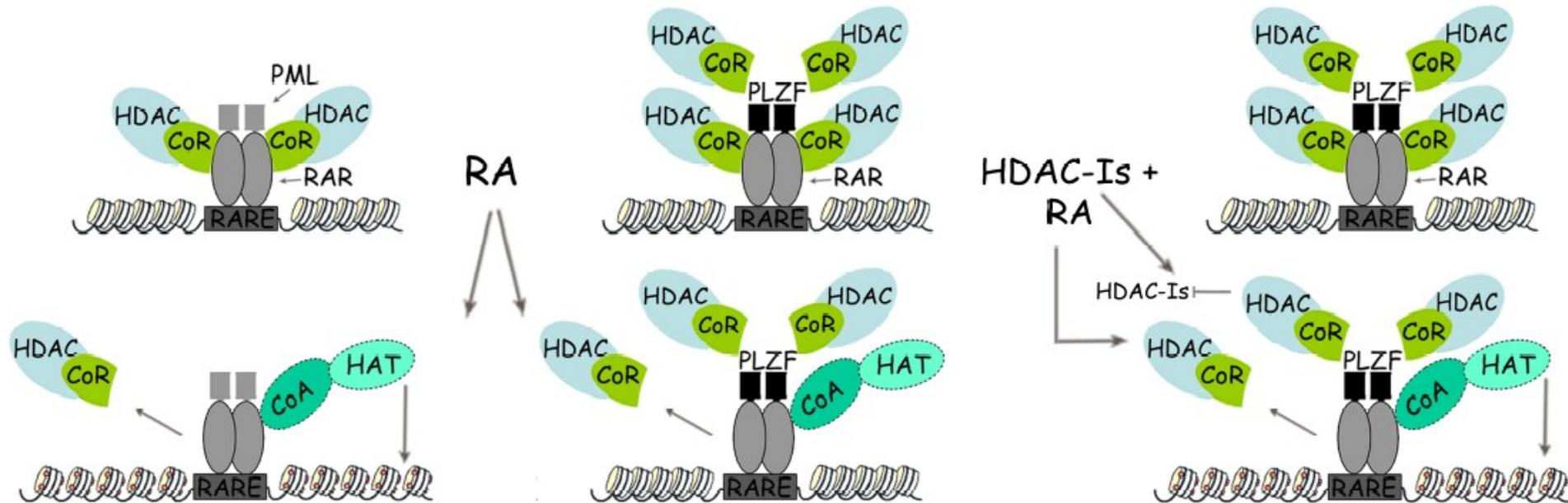


HDAC e cancro

HDAC (istone deacetilasi):

- Linfoma non-Hodgkin: il repressore trascrizionale LAZ3 è anormalmente sovraespresso e causa repressione trascrizionale aberrante (HDAC dipendente) con conseguente trasformazione tumorale
- La leucemia acuta mieloide M2 è associata con t(8;21) che genera una proteina di fusione AML1/ETO che agisce come un potente repressore trascrizionale dominante tramite reclutamento di HDAC

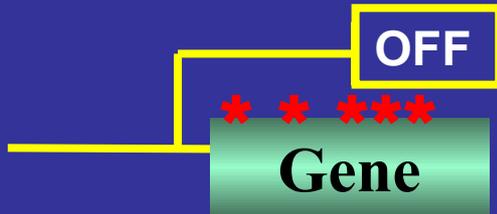
Esempio dell'aberrante reclutamento di HDAC da parte di PML-RAR e di PLZF-RAR nella leucemia promielocitica acuta



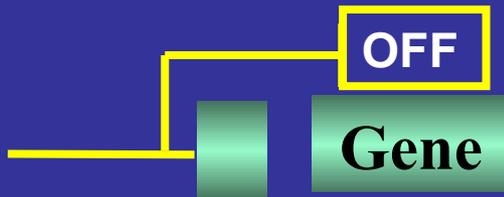
Leucemia acuta promielocitica (APL): PML-RAR α , l'oncoproteina generata da una fusione per traslocazione cromosomica del gene codificante l'attivatore trascrizionale RAR α con il dominio di repressione del gene PML, reprime i geni normalmente attivati da RAR α mediante metilazione e reclutamento di un co-repressore contenente attività HDAC

Genetica

Mutazione



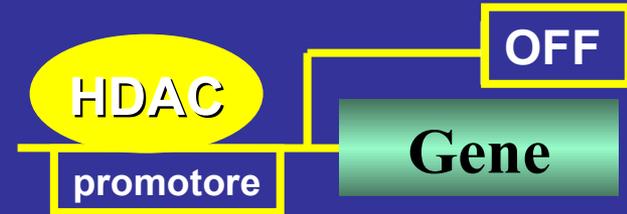
Delezione



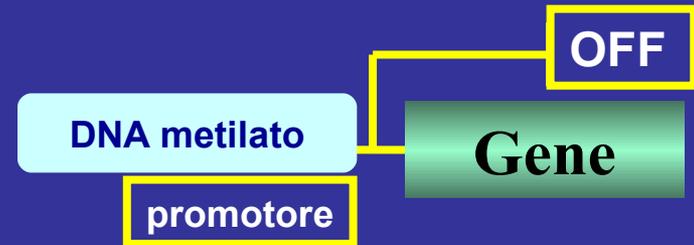
↓
Terapia genica

Epigenetica

Rimodellamento della cromatina

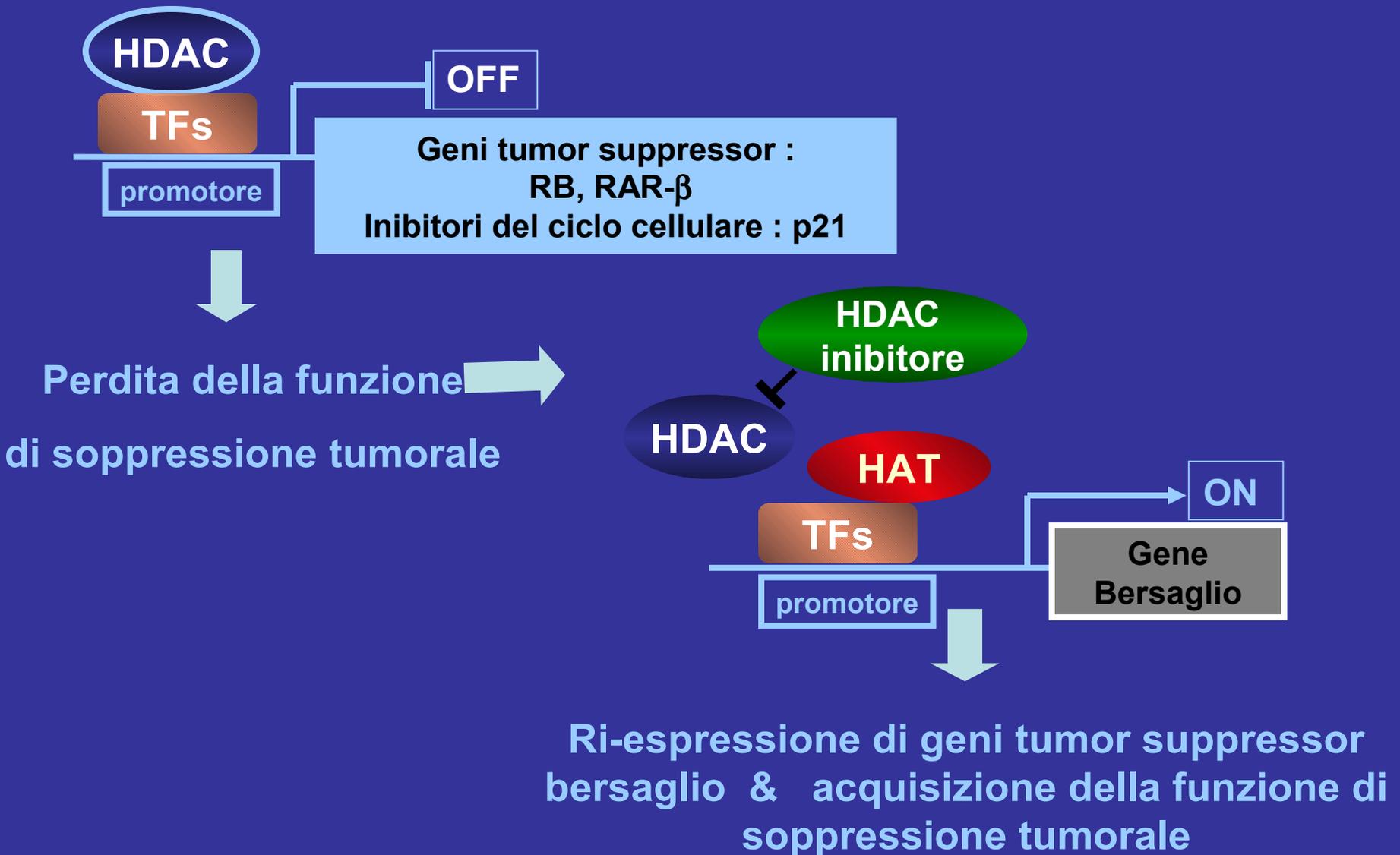


Metilazione del DNA



↓
Terapia epigenetica

Concetto generale della terapia epigenetica

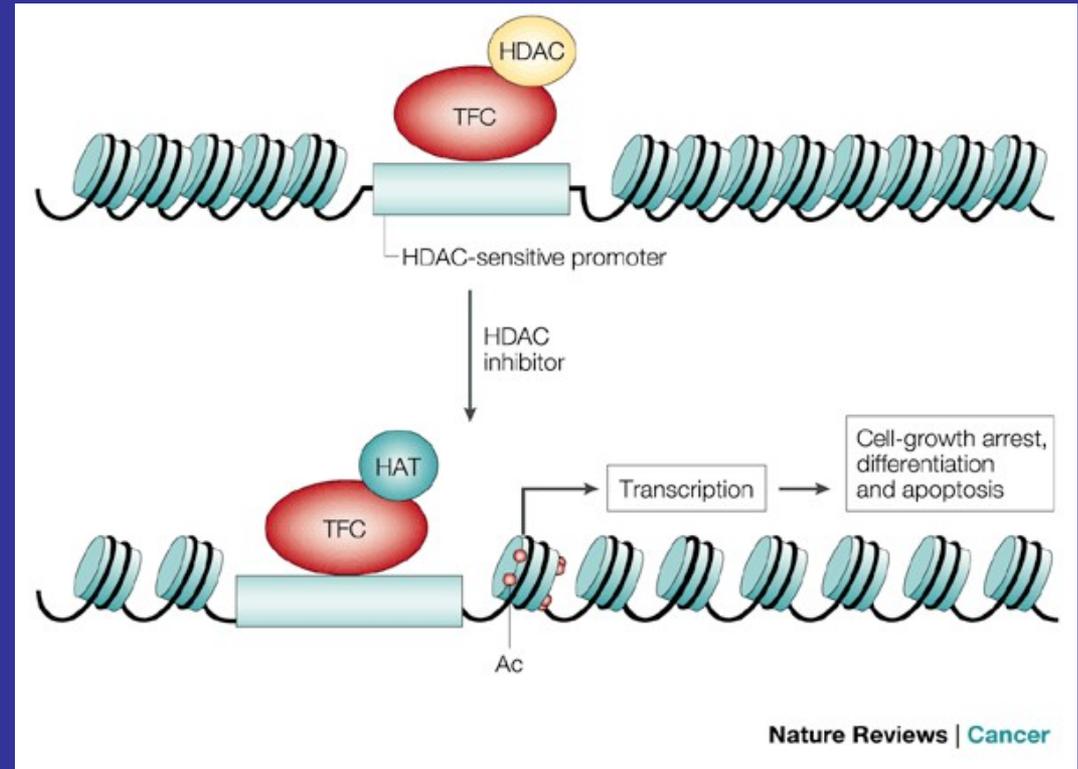


Terapia epigenetica : riacquisizione di funzione genica

Gene silenziato	Funzione	Evidenze
ER	Recettore E2	Riacquisizione di espressione e 'signaling'
RARB2	Retinoic receptor	Funzione Tumor suppressor riacquisita
MLH1	'Mismatch repair'	Correzione del difetto
P16/INK4a	Regolazione del ciclo	Riacquisizione del RB checkpoint
P14/ARF	Inibizione MDM2	Riacquisizione della normale distribuzione cellulare di MDM2

Inibitori delle HDAC: una nuova terapia anti-cancro

- Questi inibitori causano
 - arresto del ciclo cellulare,
 - differenziamento
 - apoptosi
- (documentati in tutti i tipi cellulari trasformati)



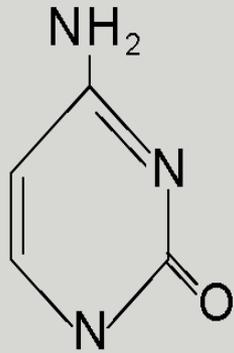
- Noti Geni bersaglio:

–CDKN1A (p21/WAF1), TRAIL/TNFR10, CDKN2A (p16)

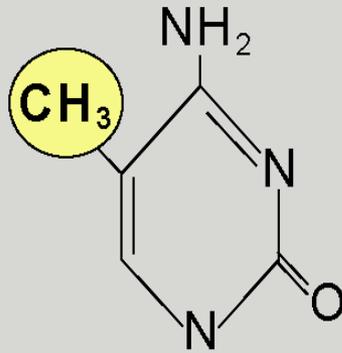
Cooperatività tra modulatori dell'azione epigenetica

- 5-aza-2'-desossicitidina -> ipometilazione e riattivazione di 'tumor suppressors' silenziati
- Può cooperare con inibitori delle HDAC quali TSA, SAHA con potenziale riduzione delle dosi richieste e della tossicità, e minori possibilità di insorgenza di meccanismi di resistenza

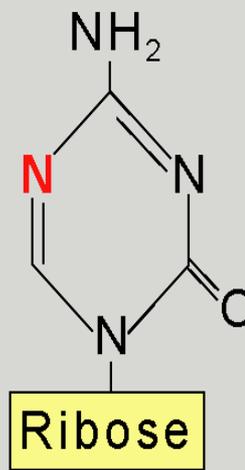
Analoghi Ipometilanti della Citosina



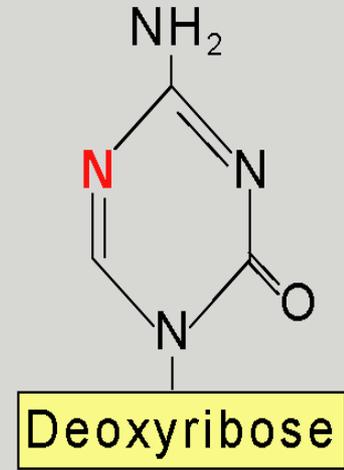
Cytosine



*5-methyl-
cytosine*



*5-aza-
cytidine*



*5-aza-2'-deoxy-
cytidine*

Nuovi modulatori sono rappresentati da inibitori enzimatici delle DNMT.

Ricapitolando...

1. L'epigenetica regola l'espressione genica non alterando il DNA (sequenza)
2. Esistono molteplici tipi di regolazione come
 - La metilazione del DNA
 - L'imprinting genomico
 - Le modificazioni istoniche
3. Meccanismi di alterazione epigenetica sono alla base di molteplici patologie fra cui le neoplasie
4. Si può riprogrammare l'epigenoma cellulare con modulatori epigenetici

Lecture aggiuntive
Su siti internet di interesse



Modificazioni della cromatina e metilazione del DNA

www.epitron.eu

<http://www.epigenome-noe.net>

www.geneimprint.com

www.geneimprint.com/articles/pdf/reikwalterrev.pdf

• **Prader-Willi syndrome** - www.geneclinics.org/profiles/pws/

• **Angelman syndrome** - www.geneclinics.org/profiles/angelman/