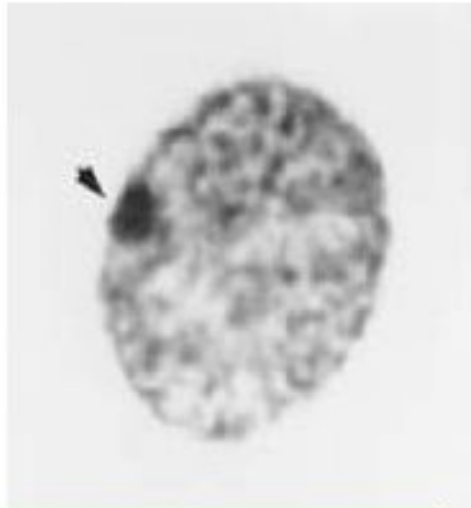




Inattivazione del cromosoma X e eredita' X-linked



Lezione 15



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

X inattivo





L' inattivazione domande



❓ Vengono inattivati tutti i geni della X?

😊 No, inizialmente si riteneva che l'inattivazione coinvolgesse tutto il cromosoma, oggi sappiamo che non vengono inattivati i geni della regione pseudoautosomica : i geni di questa regione hanno un omologo sul cromosoma Y

Non vengono inattivati geni che hanno pseudogeni sul cromosoma Y, e altri geni per i quali non si conosce la ragione. Comunque il cromosoma X risulta inattivato al 90%

❓ C'e' una regione sul cromosoma X da cui inizia l'inattivazione ?

❓ Come avviene e come si mantiene l'inattivazione?



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

La storia continua....I

Anni '70: un aiuto dall 'embriologia



* Negli embrioni di topo entrambe le X sono attive nei primi stadi. L 'inattivazione e ' presente nel trofoblasto e nel 'ectoderma che dara ' origine all 'embrione vero e proprio.

* A differenza dell 'imprinting l 'origine parentale non condiziona l 'attivazione: nel topo XO la X e ' attiva indipendentemente dalla sua origine. Nel topo partenogenetico XmXm una delle X si inattiva



Quali sono gli step del processo?





LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

La storia continua.... II



* **Iniziazione:** evento che si verifica in un particolare momento dell'embriogenesi e identifica un cromosoma X da mantenere attivo e inattivo l'altro. Potrebbe essere legato al rapporto 2A:1X. Nei triploidi XXX le X attive sono 2

* **Mantenimento:** meccanismo in feedback, per cui lo stato di attività al momento della replicazione induca uno stato simile nei cromosomi "figli". Questo si riscontra nei mammiferi euteri, ma dai primi studi nei marsupiali...

☹ Nei marsupiali sia in vivo che in vitro singoli geni si riattivano

* **Stabilizzazione:** Processo che si somma ai precedenti garantendone l'efficacia. Questo meccanismo non sembrerebbe efficiente nei marsupiali.





LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

La storia continua.... III

Anni '80: Tecnologia del DNA ricombinante



X 1983 Gartler & Riggs fanno il punto sulle ipotesi e sui meccanismi che possano controllare il processo. Si comincia a parlare della metilazione.

X A chiusura della loro review:

“E' chiaro che numerosi livelli di controllo sono coinvolti nella inattivazione, e che sono quelli che ci si aspetta in qualunque processo differenziativo.”



La storia continua....IV



X La metilazione: inizialmente si riteneva che la metilazione agendo in cis potesse essere il meccanismo di spreading dell'inattivazione e attraverso metilasi diverse garantire al momento della replicazione il mantenimento .

☹ In realta ' studi sui marsupiali e sui tessuti extraembrionali dei topi hanno chiarito che la metilazione e ' uno dei meccanismi per il mantenimento dell'inattivazione, ma non e ' direttamente coinvolta nel suo nell'inizio.



La storia continua.... V



X Geni che sfuggono all'inattivazione: non tutta la X viene inattivata e cominciano a comparire differenze fra uomo e topo.

***STS, UBE1, RPS4, MIC2 sono inattivati in uomo, ma il corrispettivo nel topo Sts, ube1, Rps4, Mic2 no. E alcuni non mappano nella regione pseudoautosomica**

***Altre differenze emergono dagli studi nei monotremi e marsupiali. Si comincia a pensare che una spiegazione si può trovare nell'evoluzione dei cromosomi sessuali che anche a livello citogenetico mostrano differenze fra le specie la legge di Ohno non sembra vera per il cromosoma X nel suo insieme.**



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

La storia continua.... VI



X La risposta all 'inattivazione e ' individuale o i geni rispondono in blocco? E ' dovuto a una particolare condizione della cromatina del cromosoma X?

- * Alcuni suggerimenti vengono da *Drosophila* in cui il prodotto di un gene coinvolto nel compenso dose si lega a centinaia di siti lungo il cromosoma.
- * Altri dallo spreading dell 'inattivazione nelle traslocazioni X/A nel topo: la parte autosomica si inattiva meno efficacemente

X Si formula l 'ipotesi che esistano delle "way station" che presenti sul X facilitino la diffusione dell 'inattivazione e che ci sia una risposta individuale dei geni



La storia continua....VII

Anni '90: Clonaggio del centro di inattivazione

X 1991 Brown et al. clonano XIST: mappa in Xq13, e ' espresso solo dal X inattivo e non da quello attivo, in contemporanea Borsani et al clonano l'ortologo di topo Xist

- * Proprio dal topo vengono gli spunti piu ' interessanti perche ' si puo ' studiarne l'espressione anche nell'embrione.
- * E ' espresso anche nell'adulto. Nel maschio e ' espresso solo nella linea germinale dove la X e ' inattiva.....



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

La storia continua....VIII



X Quali devono essere le caratteristiche del centro di inattivazione?

☺ Innesca il processo di inattivazione o modifica uno stato di inattivazione precedente.....

☹ Allora deve essere espresso in un momento particolare dell 'embriogenesi e non nell 'adulto....

☹ Se Xist e ' espresso nell 'adulto allora i loci che innescano il cambio di stato nell 'embriogenesi devono ancora essere individuati....

☺ Se Xist e ' espresso nel maschio solo nella linea germinale allora l 'inattivazione delle cellule somatiche femminili e delle germinali maschile hanno lo stesso meccanismo



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

**Facciamo il punto:
nel 1992 cosa sappiamo del:**

X Segnale di bloccaggio: ancora molte domande senza risposta:

- * Un centro in ogni cellula riceve un segnale, viene bloccato e la X rimane attiva ma come?
- * ... attraverso meccanismi epigenetici con la collaborazione di molecole attivatrici forse autosomiche
- * In *Drosophila melanogaster* dove il dosaggio viene gestito attraverso il rapporto 2A:1X questi locus sono stati identificati, ma nei mammiferi non si trova traccia di questi.
- * Una promessa viene dal locus Xce di topo: alcuni mutanti di questo locus inibiscono la casualità dell'inattivazione, quindi questo potrebbe essere il controllore di Xist.



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

**Facciamo il punto:
nel 1992 cosa sappiamo del:**

X Segnale di spreading: il blocco si e' instaurato, adesso l'informazione si deve diffondere e deve innescare la comparsa delle diverse caratteristiche del X inattivo che da studi negli embrioni hanno una precisa comparsa nel tempo :

- * replicazione tardiva
- * condensazione a formare il corpo di Barr
- * metilazione differenziale
- * sensibilita differenziale alla DNAsi

☺ **quindi**



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

1992 Ipotesi

X Ipotesi: la replicazione tardiva e la metilazione differenziale sono entrambi dei meccanismi “self-maintaining ” nel mantenere stabile l'inattivazione...

☹ i marsupiali hanno solo la replicazione tardiva e non la metilazione: il loro mantenimento e ' meno efficiente

😊 **Modello proposto:** a partire dal centro di inattivazione una proteina scorre lungo il DNA toccando i vari loci. Lo scorrimento e ' bidirezionale e avviene in cis. In questo modo viene modificata la conformazione del DNA e la conformazione modificata influenza la replicazione e impedisce la trascrizione



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

1992 Punti ancora oscuri



Nelle traslocazioni X/A del topo l'inattivazione si diffonde anche sull'autosoma, comprendo varie megabasi, quindi non sono coinvolte sequenze X specifiche.



In *Drosophila* l'effetto variegazione è noto e nel 1991 è stata individuata la proteina HP-1 (heterochromatin protein 1) che risulta associata al DNA nei casi di variegazione per effetto di posizione. Potrebbe esserci un meccanismo analogo nei mammiferi.



Se il modello di attivazione e inattivazione è vero potrebbero esistere elementi che si trovano al confine dei loop che "insulano" i geni che sfuggono all'inattivazione.



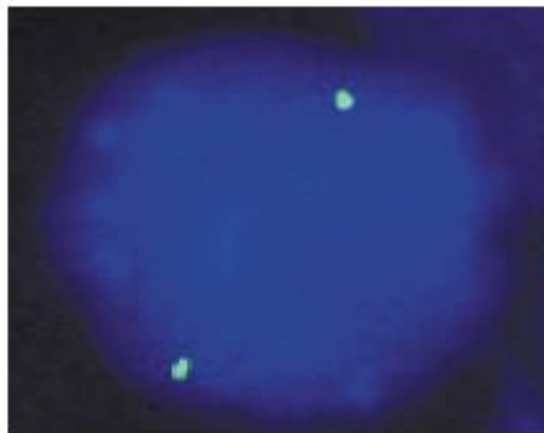
LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

ANNI 2000

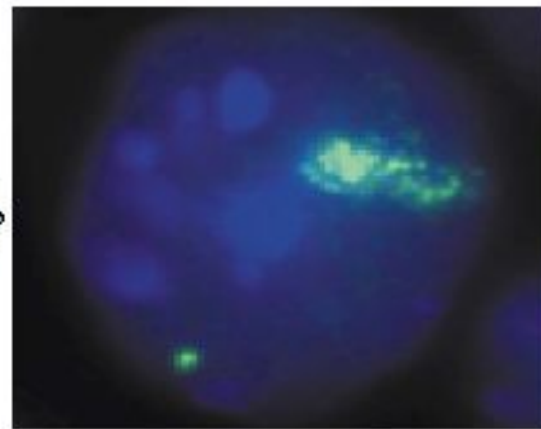
cosa c'è di nuovo

💣 RNA del gene Xist è essenziale per la fase di inizio del processo di inattivazione del cromosoma X, "avvolge" il cromosoma X inattivo

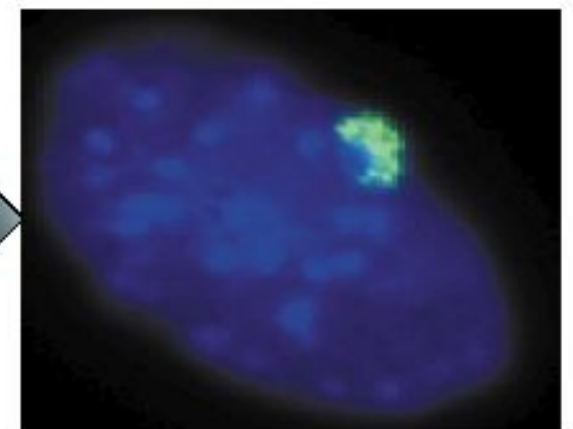
😊 È l'unico gene **SEMPRE** espresso dalla X inattiva
cellule staminali embrionali (ES cells)



cellule
indifferenziate



cellule durante la
differenziazione



cellule
differenziate



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

ANNI 2000

cosa c 'e ' di nuovo

- Nuovo gene scoperto Tsix, un altro RNA non tradotto:
 - trascritto dall 'elica antisenso a Xist (complementare)
 - espresso nelle cellule ES e nel embrione precoce
 - controlla l 'espressione di Xist in cis all 'inizio dell 'inattivazione
 - delezione di Tsix = inattivazione non casuale

I NFLUENZA LA SCELTA E L 'IMPRINTING

I ipotesi sui meccanismi di funzionamento:

1. Masking
2. Interference
3. Repression
4. Chromatin opening



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

ANNI 2000

cosa c 'e ' di nuovo

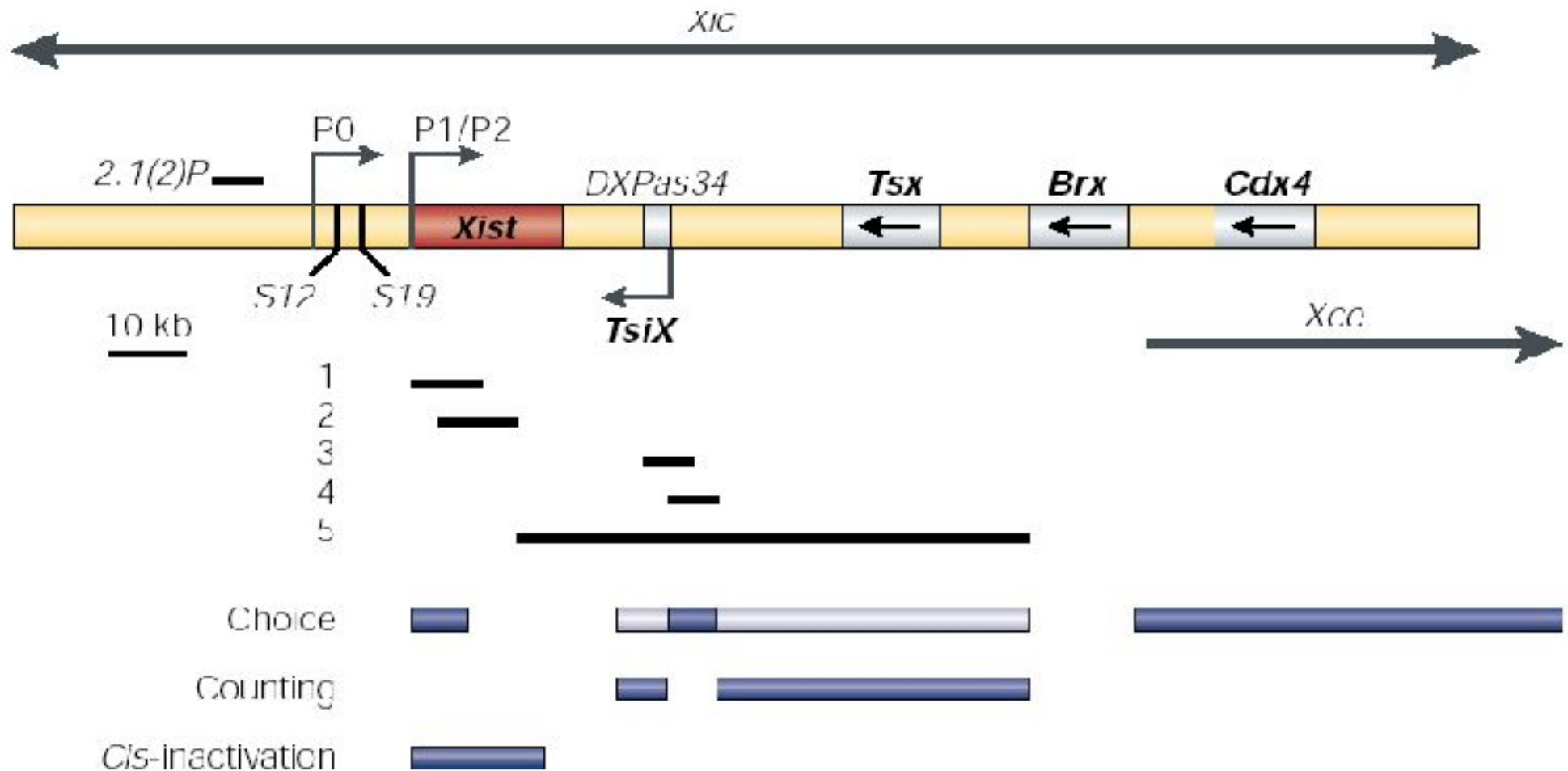
💣 **XIST**, espresso solo dalla X inattiva, mappa in Xq13 (dove era stato mappato il centro di inattivazione, Xce)

💣 **Xce**, elemento di controllo responsabile della scelta di quale X di quale X deve essere inattivata

💣 **TSIX**, repressore in cis dell 'attivit a ' di Xist



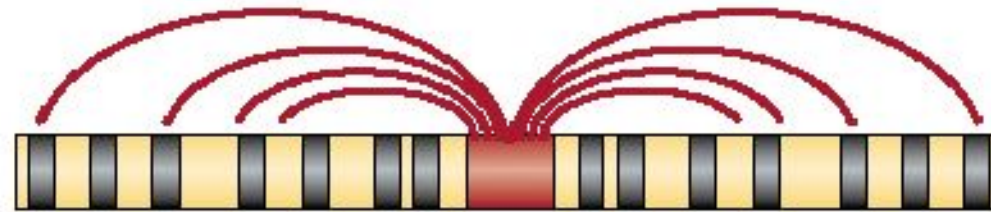
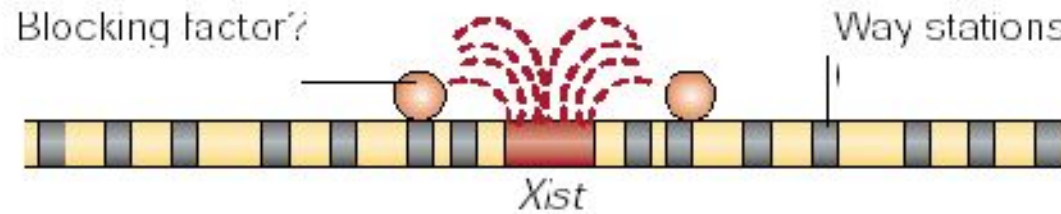
Centro di inattivazione della X



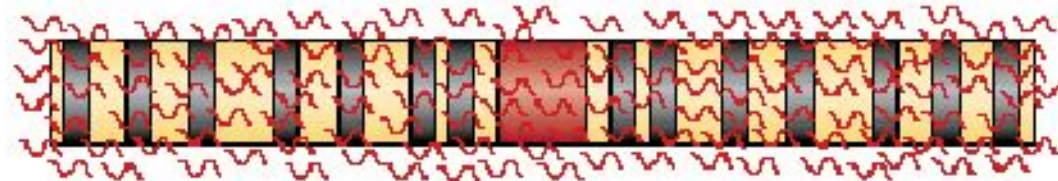


LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

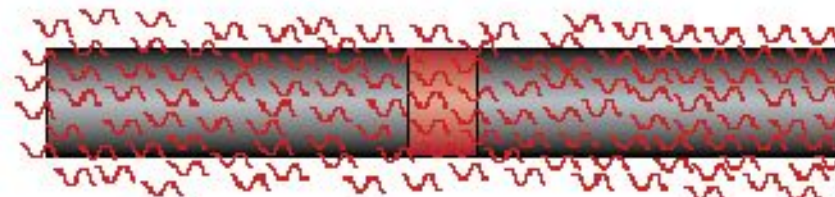
Modello complessivo per l'inattivazione



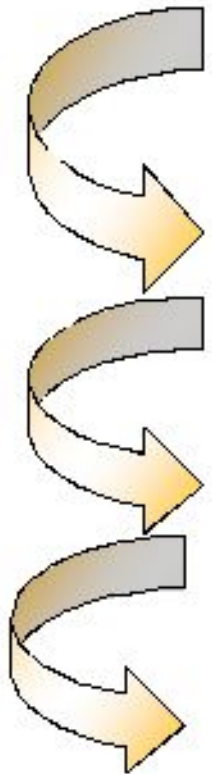
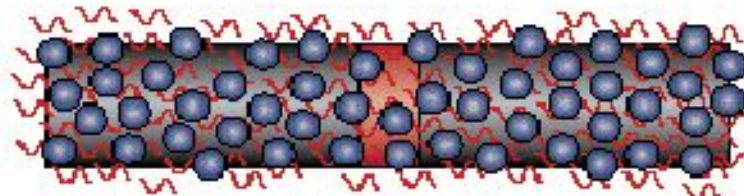
Xist RNA coating
in cis



Establishment of the
inactive
state, asynchronous
replication



● MacroH2A recruitment
Histone H3 and H4
hypoacetylation





L' inattivazione



Come avviene e si mantiene l'inattivazione?



Il clonaggio di Xist (X-inactive specific transcript) non ha chiarito completamente il meccanismo: il prodotto di questo gene (15Kb) non ha ORF, si ritiene che appartenga alla classe dei geni il cui prodotto funzionale non è una proteina, ma un mRNA.



Viene trascritto solo dal cromosoma inattivo, e' espresso nel nucleo, promuove il processo di inattivazione rimodellando la cromatina attraverso l'ipoacetilazione degli istoni e la metilazione dei geni.



Dall'inattivazione deriva l'eterocromatizzazione (corpo di Barr e la replica tardiva del cromosoma X inattivato)



L' inattivazione



❓ Come avviene e si mantiene l'inattivazione?

😊 Si ritiene che l'inattivazione venga ottenuta metilando le isole CpG. I geni presenti sul cromosoma inattivato sono ipermetilati se confrontati con gli omologhi dell'altro cromosoma o del cromosoma X del maschio.

💣 Ricordare che le isole CpG sono presenti al 5' dei geni e si ritiene che rappresentino il sito di inizio della trascrizione.

😊 Una volta che la metilazione è avvenuta al momento di duplicare il DNA la citosina metilata verrà riconosciuta come tale dall'enzima che metilerà la citosina dell'elica neosintetizzata, garantendo il mantenimento




L' inattivazione e l'eredita' X-linked

Ipotesi di Mary Lyon:

Uno dei due cromosomi X presenti nella linea somatica femminile, viene precocemente inattivato durante lo sviluppo embrionale. L'inattivazione e' casuale. Come risultato la femmina e' un mosaico di cellule funzionalmente emizigoti per uno o l'altro dei cromosomi X.



 La femmina portatrice di una patologia X-linked e' "protetta" dalla presenza nel 50% delle sue cellule di un gene funzionante. L'inattivazione non casuale di un cromosoma X per effetto di un riarrangiamento puo' aiutare a clonare un gene malattia



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

Articoli per integrare (studiarli!!)

NIH Public Access
Author Manuscript
Full Text Provided by www.ncbi.nlm.nih.gov

Published in final edited form as:
Cellular Reprogramming *Genet Biol* 2013; 13: 242-254. doi:10.1038/cr.2013.10

**XIST RNA and Architecture of the Inactive X chromosome:
 Implications for the Repeat Genome**

Lisa L. Hall and Jeanne B. Lawrence¹
 Department of Cell Biology, University of Massachusetts Medical School, 55 Lake Avenue North,
 Worcester MA, 01655, USA

NIH-PA Author Manuscript



Full text provided by www.sciencedirect.com



X inactivation Xplained

Anton Wutz¹ and Joost Gribnau²

Current Biology, Vol. 13, R242–R254, March 18, 2003, ©2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
 DOI 10.1016/S0960-9822(03)00162-3

Review

Molecular Links between X-Inactivation and Autosomal Imprinting: X-Inactivation as a Driving Force for the Evolution of Imprinting?



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect



Origin and evolution of X chromosome inactivation

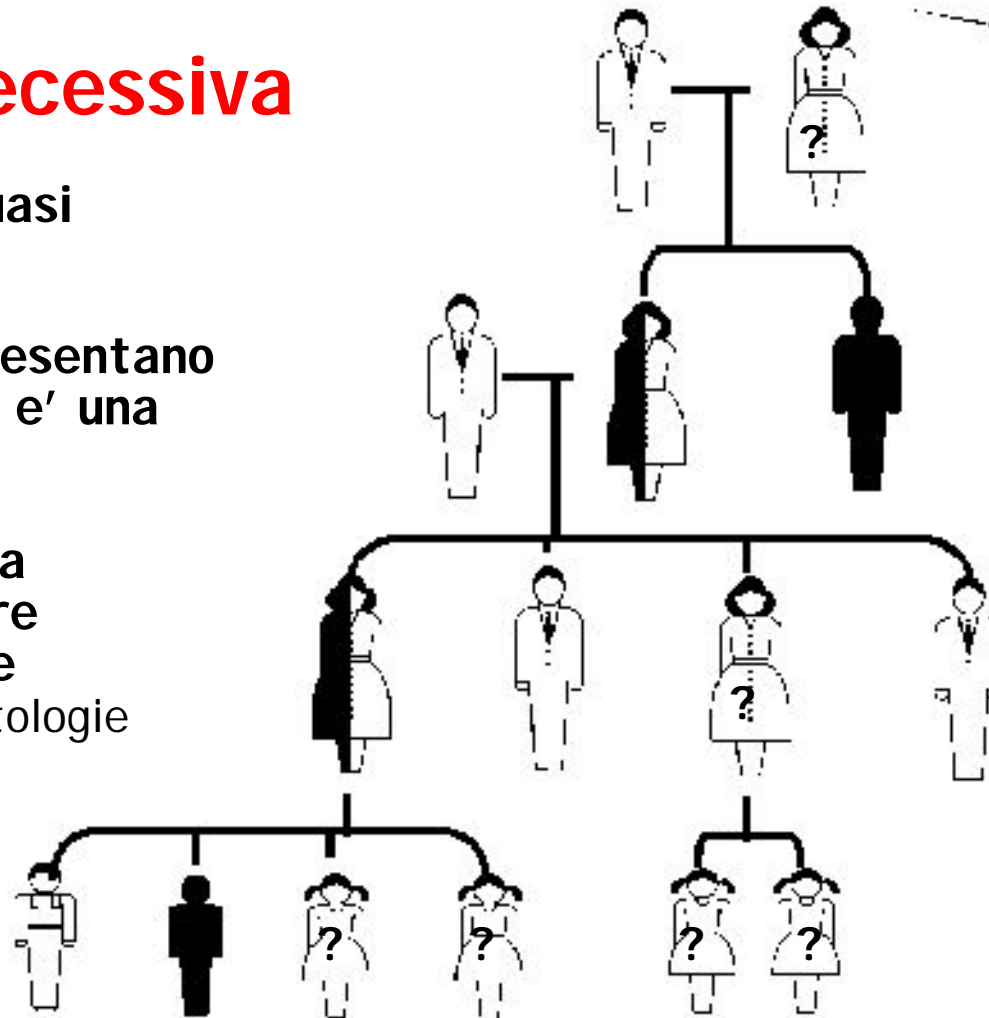
Joost Gribnau and J Anton Grootegoed
 By NA



X-linked recessiva



- *Esprimono il carattere quasi esclusivamente i maschi
- * I genitori di solito non presentano il carattere soprattutto se e' una patologia grave.
- * Lo stato di portatrice della madre e' certo se ha il padre fratelli o parenti maschi che manifestano (nel caso delle patologie gravi il padre non e' mai affetto)



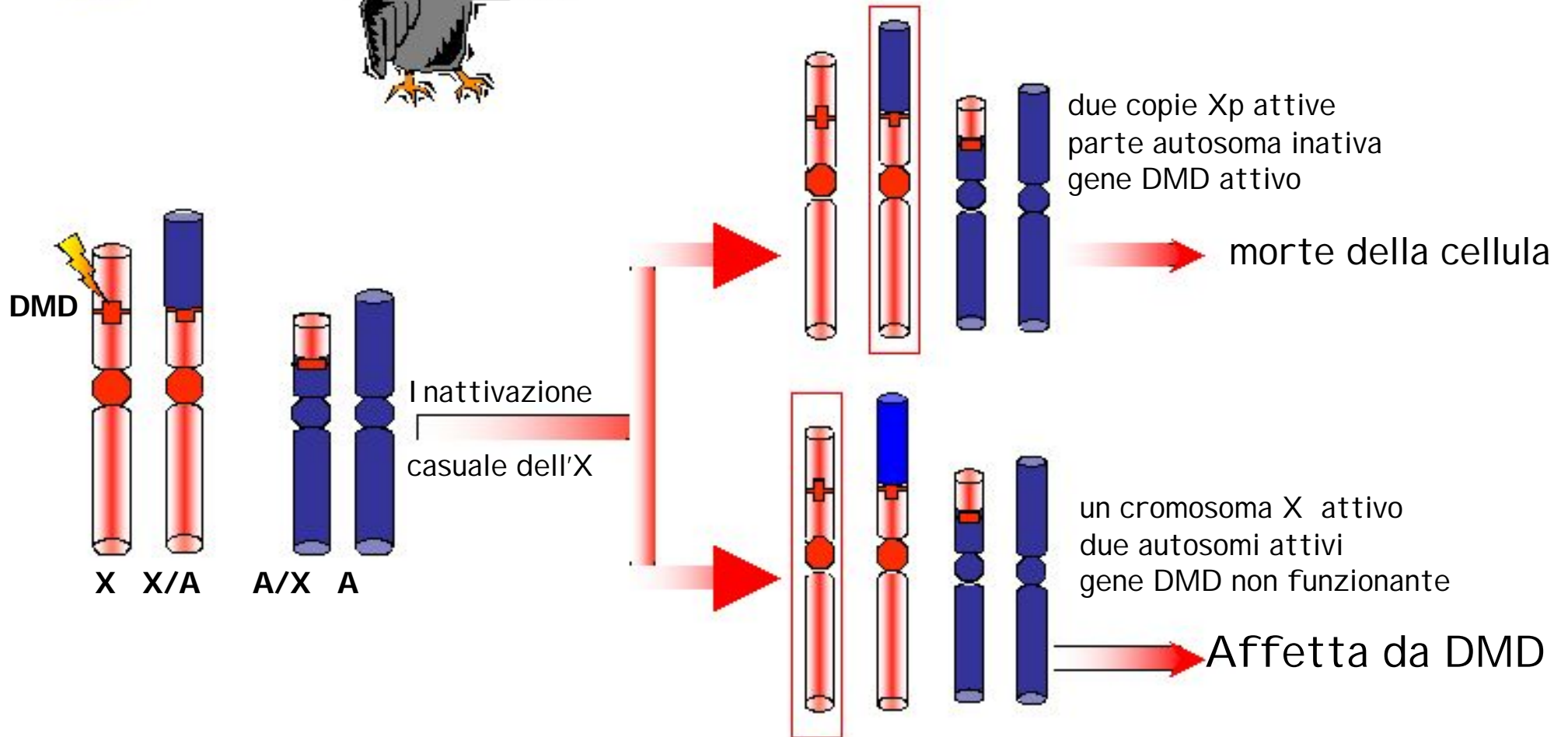
- *Le femmine possono manifestare il carattere:
 1. se il padre lo presenta e la madre eterozigote
 2. se l'inattivazione del cromosoma X non e' casuale



LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014



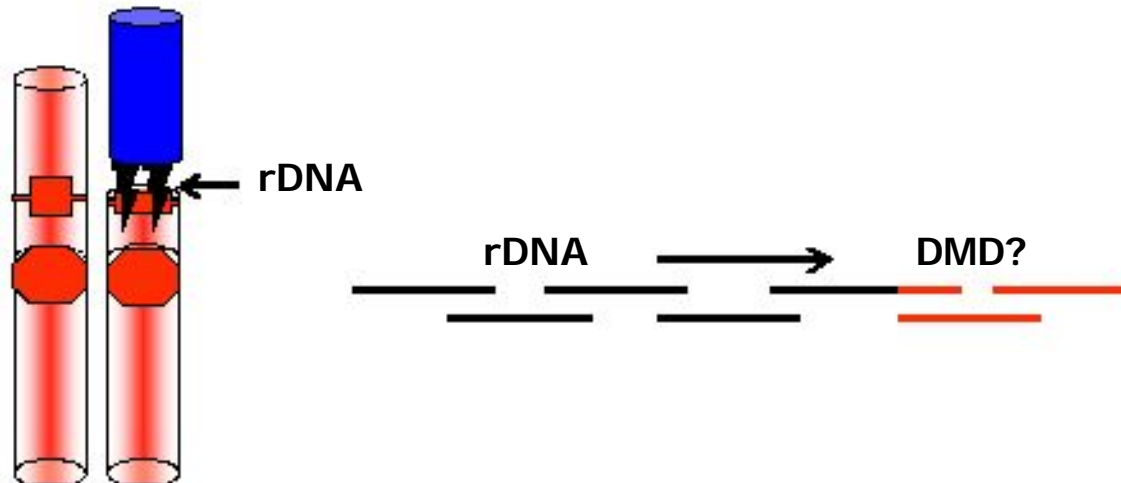
DMD Inattivazione





DMD-XJ

1985 A Toronto un gruppo di ricercatori utilizzando il Dna di una donna DMD portatrice di una traslocazione X/21, riuscì a clonare il breakpoint, e individuò una serie di cloni (XJ) che, oltre ad essere polimorfici, evidenziavano delezioni in alcuni pazienti DMD.







DMD- Clonaggio



1986 A Boston il gruppo di Kunkel utilizzando il DNA di un paziente, BB, portatore di un delezione citogenetica ed affetto da DMD, retinite pigmentosa, ritardo mentale e malattia granulomatosa cronica riesce a clonare il gene DMD.

 La loro strategia si basò sul clonaggio per sottrazione: il paziente era depresso per una grossa regione genomica, il suo DNA fatto riassociare con DNA normale avrebbe lasciato in soluzione le sequenze normali non presenti nel DNA depresso.

 Con quei cloni fu testata una libreria di cDNA di muscolo e vennero clonati circa 8 cDNA che, testati sui pazienti, misero in evidenza delezioni. Lo zoo-blot confermò trattarsi di un gene conservato, la sequenza evidenziò nei pazienti mutazioni puntiformi di varia natura.



DMD - Distrofina



Quale e' il prodotto del gene DMD?



💣 L'RNA e' lungo 13kb, la proteina ha un peso molecolare superiore a 400kDa, e' espresso dal muscolo, anche se costituisce solo lo 0.002% delle proteine totali. L'estremita' N -terminale costituisce il dominio legante l'actina, segue un ampio dominio a bastoncino, con 24 ripetizioni di sequenze simili composte da 109 amminoacidi. Dopo questo dominio e' presente un dominio ricco in cisteina legante il Calcio, infine l'estremita' C -terminale (420AA) interagisce con le altre proteine.





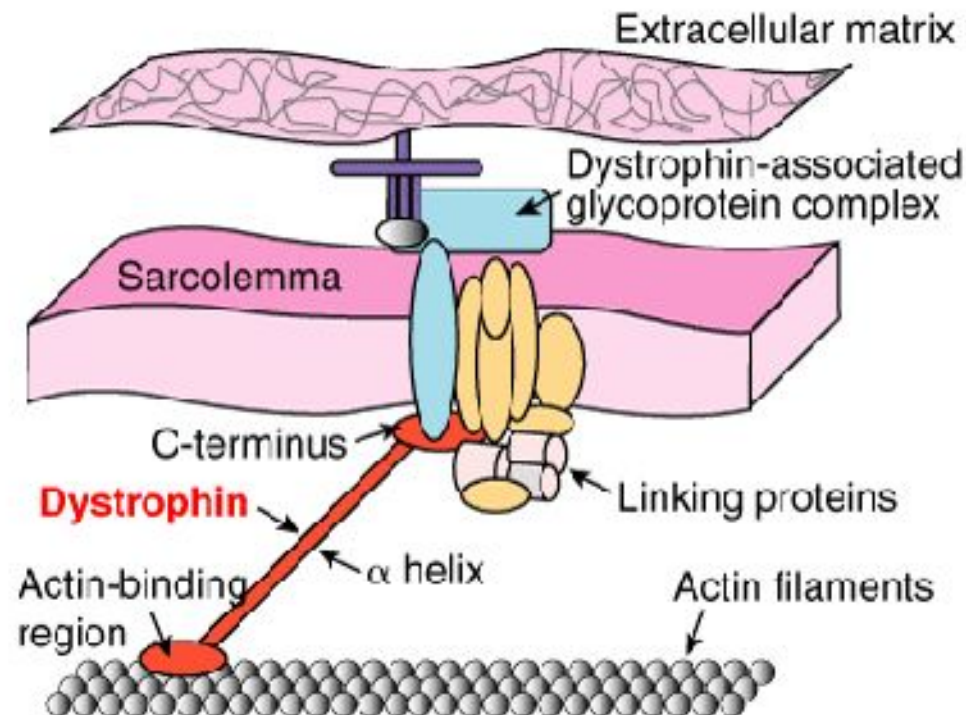
DMD-Distrofina



Quale e' la funzione del gene della distrofina?



Fa parte di un complesso che attraversando la membrana collega i filamenti di actina del citoscheletro con la matrice extracellulare (membrana basale)





LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014



Il materiale didattico e' presente in rete:
<http://www.dipartimentodibiologiabari.it/didattica>
NON sono dispense, ma un ausilio allo studio sul
libro