



# Difetti dell'imprinting



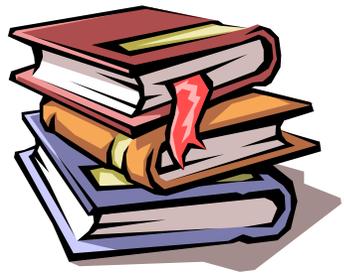
Lezione 6



# Definizione

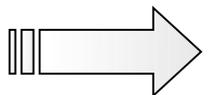


☺ Imprinting genomico: espressione differenziata di un gene perfettamente funzionale, legata all'origine parentale, indipendente dal sesso della progenie



**EPIGENOTIPO:** informazione ereditabile in grado di influire sul fenotipo senza che vi sia cambiamento di sequenza del DNA

☞ Il meccanismo epigenetico meglio conosciuto e' la metilazione del DNA. La metilazione di una regione genomica viene considerata un indicatore di inattivazione.

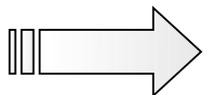


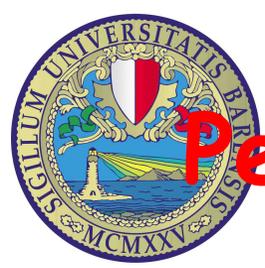


## Come e quando?

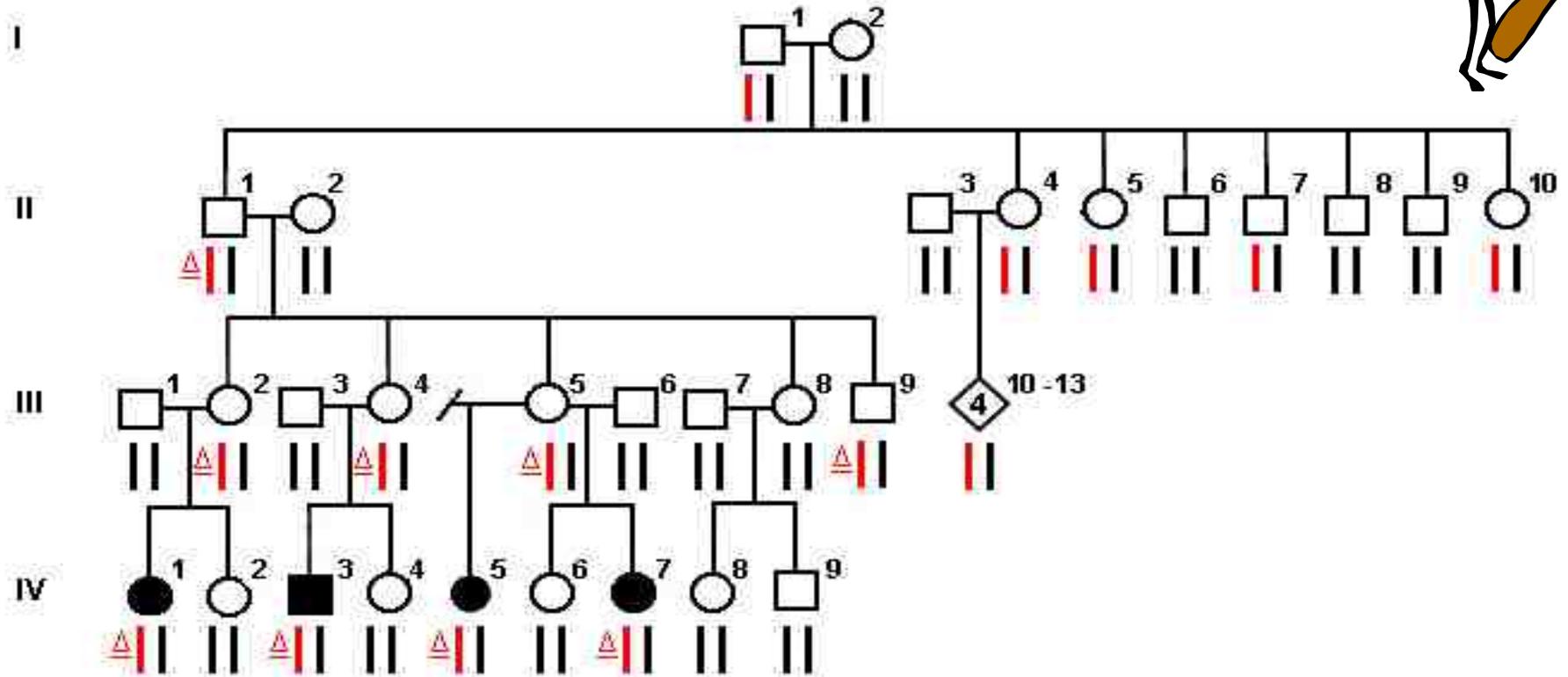


- ✦ Non e' un cambiamento *permanente* del DNA
- ✦ Deve essere abolito prima di trasmettere il genoma
- ✦ Deve essere ripristinato coerentemente al sesso dell'individuo che trasmette
- ✦ Su questa nuova "etichettatura" agiscono i meccanismi di regolazione genica secondo i pattern previsti per cellule, tessuti.....





# Perche' PWS/AS salta le generazioni

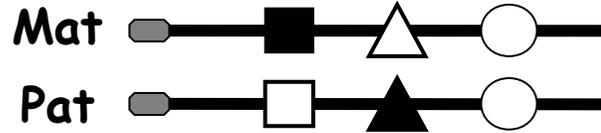




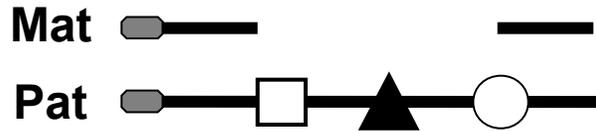
# Ipotesi di organizzazione della regione



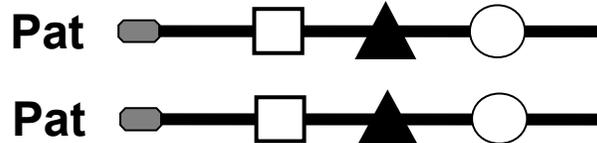
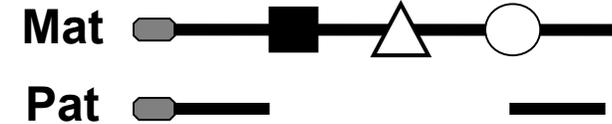
Angelman



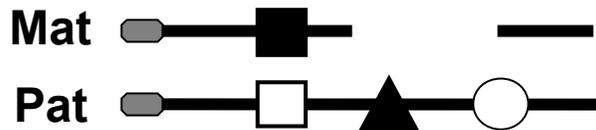
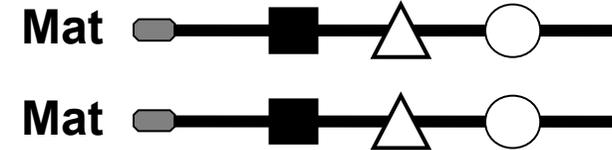
Prader-Willi



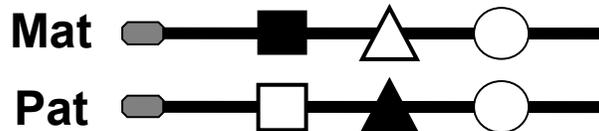
DELEZIONE



DISOMIA UNIPARENTALE



DELEZIONE SUBMICROSCOPICA

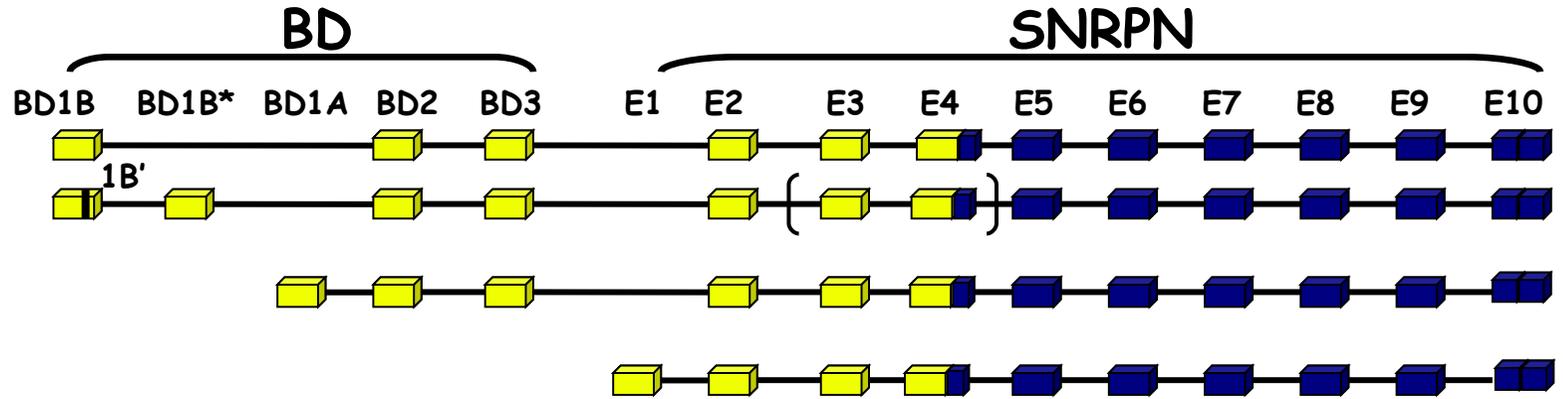


MUTAZIONE



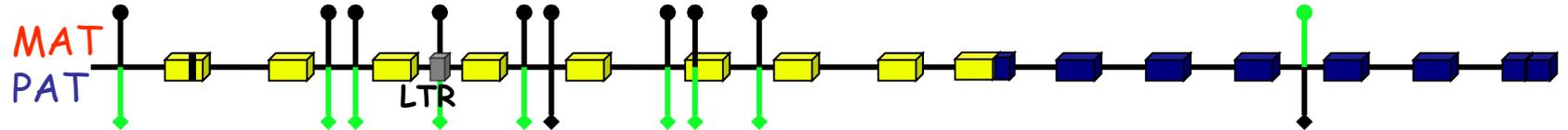
## Struttura della regione

struttura  
dei  
trascritti

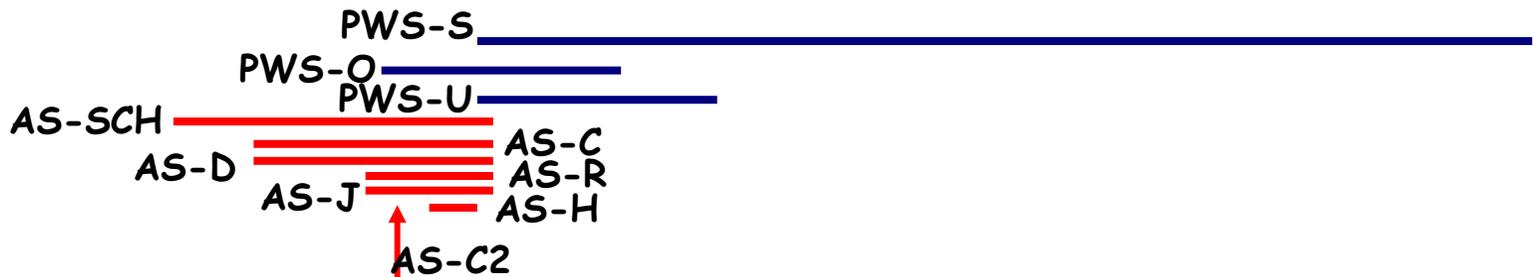


livello metilazione : Metilati Non metilati

struttura  
genomica

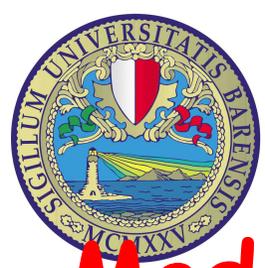


## Delezioni

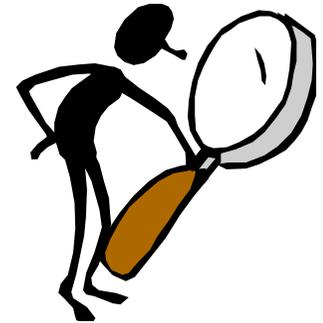
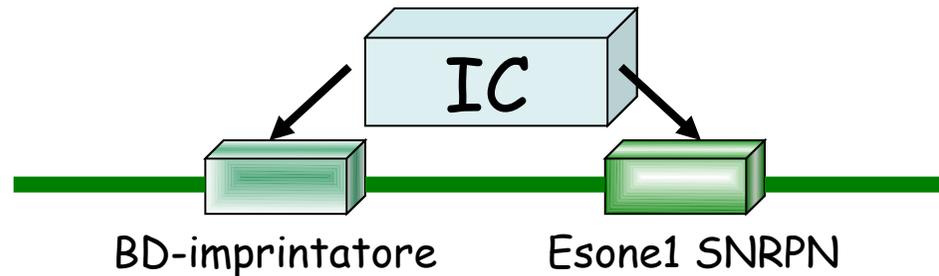


Mutazioni a livello dell'esone1 impedirebbero se ereditate attraverso il padre il passaggio da mat>pat

Mutazioni a livello di BD se ereditate attraverso madre impedirebbero il passaggio da pat>mat

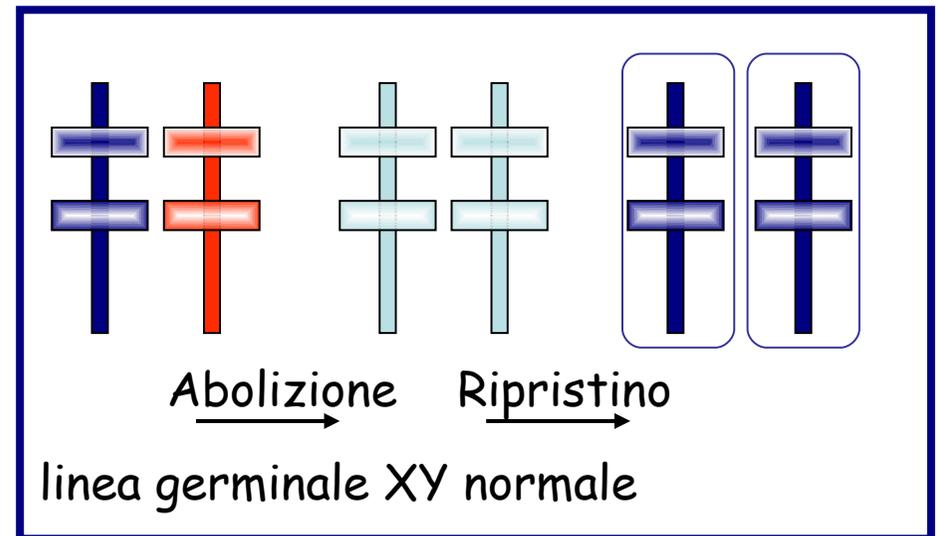
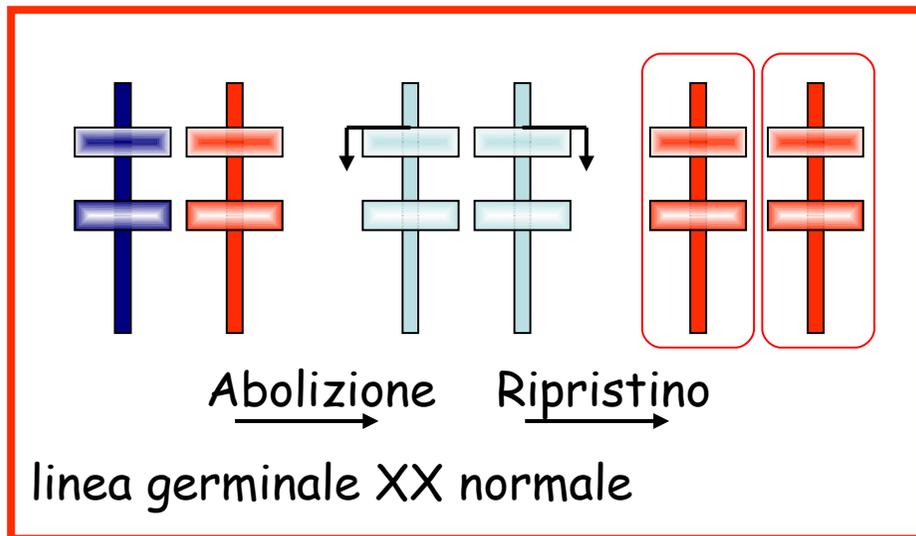


# Modello



Tre passaggi sono necessari:

- ➡ Abolizione : l'esone1 e' richiesto in entrambe le linee germinali
- ➡ Ripristino: BD attivo e' richiesto in cis per l'epigenotipo materno
- ➡ Ripristino: BD inattivo e' richiesto per l'epigenotipo paterno





# PRADER-WILLI





## PWS

La Sindrome di Prader-Willi e' una malattia che coinvolge principalmente il sistema nervoso provocando un certo grado di ritardo mentale, difficoltà' di linguaggio e disturbi comportamentali. Alla nascita e' presente ipotonia, difficoltà' a nutrirsi e letargia. Durante l'infanzia si sviluppa un iperfagia: impulso incontrollato a mangiare e atteggiamenti ossessivo compulsivi. L'aspettativa di vita di per se' non e' diminuita, i problemi vengono dall'impulso a mangiare che altera il metabolismo complessivo, portando all'obesità' con tutti i problemi collaterali. La prevalenza e' stimata essere compresa fra 1/10.000 e 1/25.000.



# Genetica di PWS

- ⇒ nel ~75% anomalie citogenetiche di cui ~70% delezioni fino a 4Mb anche visibili citogeneticamente
- ⇒ nel ~20% Disomia uniparentale
- ⇒ nel ~ 2% errori di imprinting

## Rischio di ricorrenza

Anomalie cromosomiche : Delezione *se de novo* <1% .

Se originata da una traslocazione bilanciata del padre il rischio di ricorrenza e' ~5-10% come tutte le traslocazioni bilanciate. Un riarrangiamento cromosomico bilanciato *de novo* potrebbe allontanare la regione dal centro di imprinting e impedirne l'azione appropriata (il centro di imprinting agisce in cis) <1%.



## Genetica di PWS

⇒ Disomia uniparentale < 1%, perché la disomia uniparentale è il risultato di un doppio errore di disgiunzione.

⇒ Fra gli errori di imprinting bisogna distinguere fra quelli in cui l'errore si è verificato a seguito di una microdelezione presente nel padre in questo caso il rischio è 50% (uguale alla probabilità di trasmettere un allele). Se non c'è la microdelezione e la metilazione del cromosoma paterno è errata (ipermetilato) viene ritenuta una *de novo* per cui il rischio è ~1%



## Genetica di PWS

**Quindi il rischio di ricorrenza tranne che nei rari casi di microdelezione familiare e' basso. Nonostante questo le coppie che abbiano avuto un figlio PWS richiedono la diagnosi prenatale. Per quello che riguarda i fratelli gia' nati di un affetto il loro rischio e' praticamente nullo: se non hanno la sindrome vuol dire che non hanno nessuna mutazione, se alla base c'e' un malsegregazione di una traslocazione il rischio e' che siano portatori bilanciati e quindi hanno un rischio di progenie sbilanciata come un qualunque portatore di traslocazione.**

**Diverso il discorso per i fratelli del padre portatore.**



## Genetica di PWS

Dunque: se e' nato un bambino PWS vuol dire che il cromosoma deletato e' quello paterno e lui e' ammalato perche' l'unico allele che doveva funzionare (quello materno e' inattivato per l'imprinting) non funziona, se la stessa mutazione e' presente nel padre, vuol dire che:

Il padre e' una nuova mutazione che e' avvenuta sul suo cromosoma materno, altrimenti se fosse avvenuta su quello paterno anche lui sarebbe malato e non sarebbe il padre di nessuno (i soggetti PWS raramente si riproducono per la presenza di ipogonadismo, sia nei maschi che nelle femmine). Se questo e' il caso e la mutazione non e' presente in sua madre (non puo' essere presente nel padre perche' altrimenti lui sarebbe malato), per i suoi fratelli non c'e' rischio.

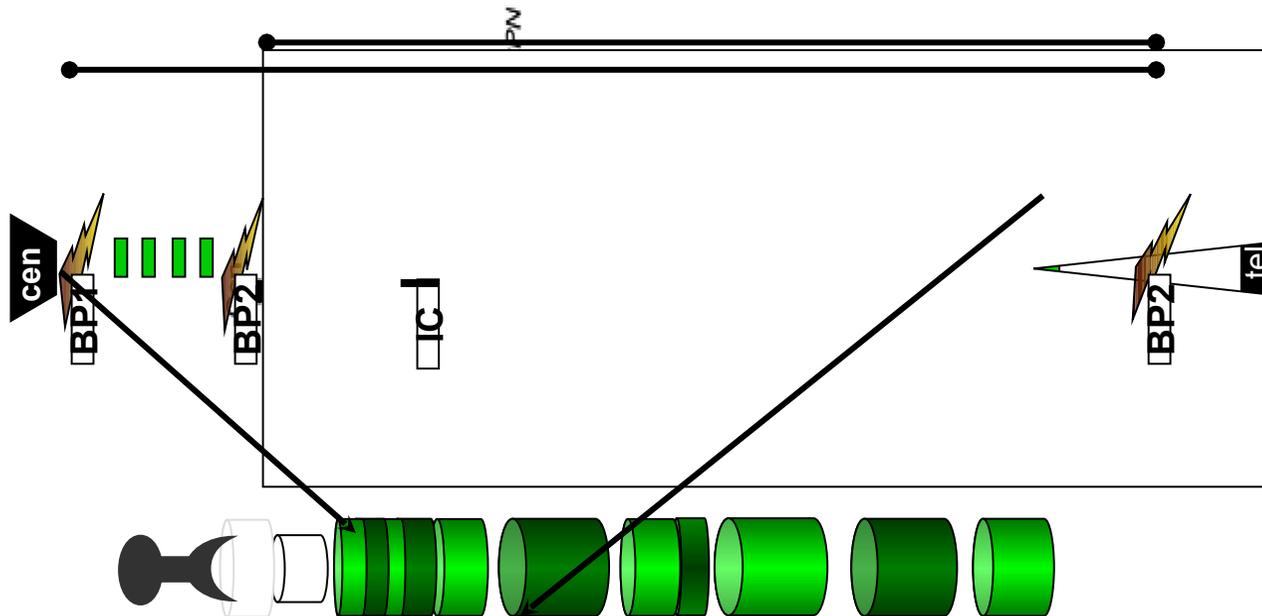
La mutazione e' presente nella nonna paterna allora il rischio per i suoi figli (zii del probando) di essere portatori e' 50%. Se sono maschi avranno il 50% di trasmettere sia l'allele che la malattia, se sono femmine 50% di trasmettere la mutazione e 0% di avere figli malati: infatti non saranno malati neanche i figli che ricevessero la mutazione perche' la madre passa il gene comunque inattivato e quindi mutato o wt non fa differenza.



# regione PWS

Delezione  
tipo 1

Delezione  
tipo 2



-  geni non improntati espressi: entrambi gli alleli
-  geni con imprinting materno: espresso solo l'allele paterno
-  geni con imprinting paterno: espresso solo l'allele materno
-  l'allele paterno e' espresso preferenzialmente
-  l'espressione non e' definita
-  Centro di imprinting IC



# Alterazioni della regione PWS

La delezione "classica" riguarda quella che viene definita Prader-Willi critical region (PWCR). Le delezioni sono di due tipi che hanno in comune il punto di rottura distale (BP3) mentre quelli prossimali sono due distanziati da ~500 Kb. All'interno di questi breackpoint ci sono 4 geni non sottoposti ad imprinting ed espressi nel sistema nervoso centrale.

Piccole delezioni del promotore e della regione a monte del gene SNRPN (regione in cui e' compreso il centro di imprinting). Questo tipo di delezione visibile solo con le tecniche molecolari si ritrovano in quei soggetti che non hanno ne la delezione canonica, ne' la disomia uniparentale, ma hanno un pattern di metilazione di tipo materno su entrambi i cromosomi. Questi affetti vengono considerati portatori di un difetto di imprinting.

Rari soggetti hanno pattern di metilazione di tipo materno, ma non hanno nessuna delle precedenti alterazioni ne' variazioni di sequenza della regione del centro di imprinting. Anche questi vengono considerati portatori di un difetto di imprinting dovuto ad ad epimutazione cioe' errore nell'apparato che porta al controllo epigenetico.



# Diagnosi

Dal momento che oltre il 70% degli affetti ha una delezione ampia, il primo livello di diagnosi e' citogenetico sia cariotipo a 650 bande (cromosomi allungati) che FISH. Tenendo conto che piccole delezioni non sono comunque evidenziabili con queste tecniche.

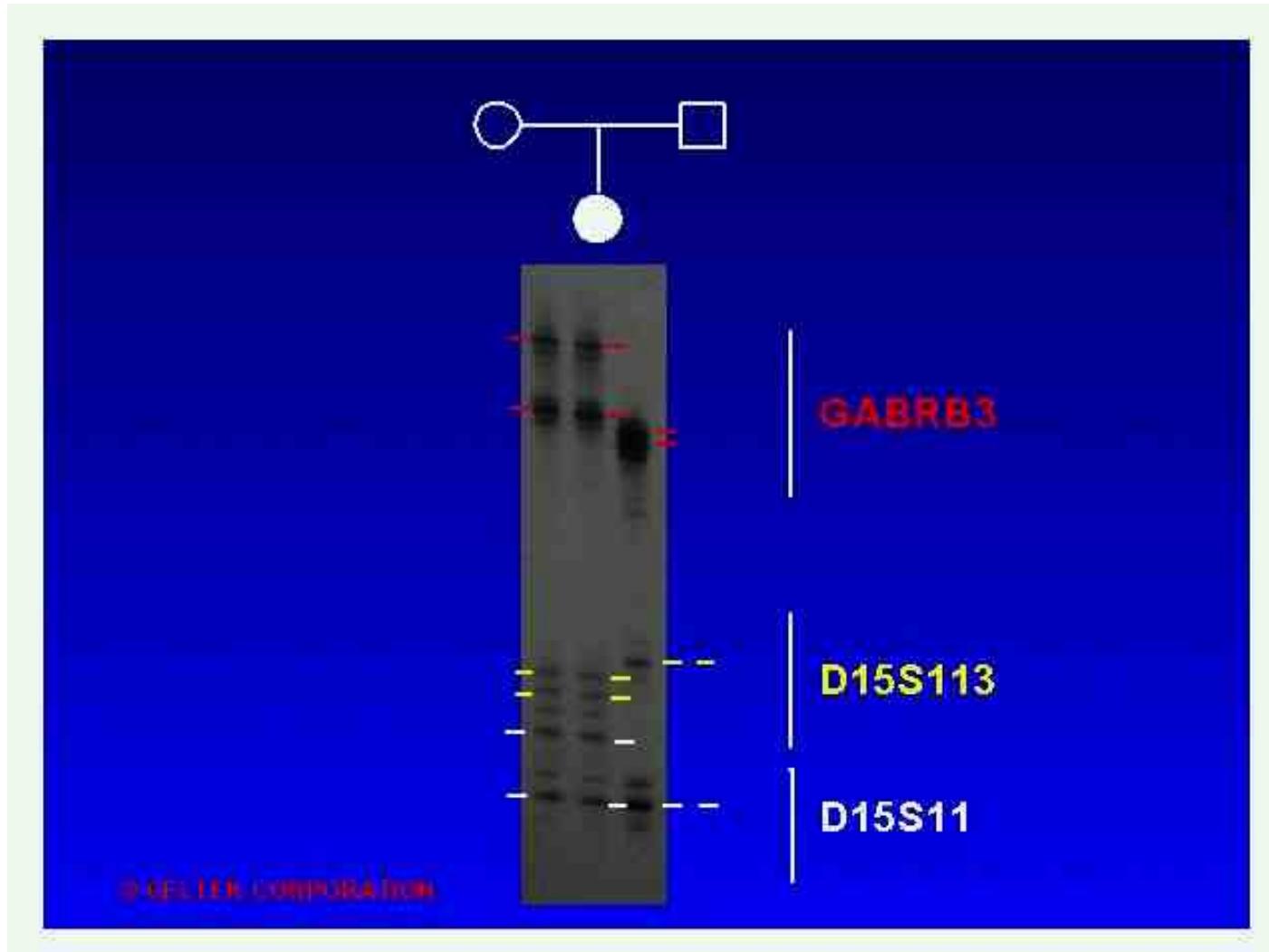
Qualora non si evidenziasse niente si ricerca l'alterato pattern di metilazione, utilizzando sia southern che PCR. questo e' diagnostico indipendentemente dal fatto che la metilazione sia materna su entrambi i cromosomi per disomia uniparentale o errore di imprinting.

Per distinguere fra i due si ricorre allo studio dei marker polimorfici: se l'alterata metilazione deriva da una disomia uniparentale manca l'aplotipo paterno.

La diagnosi si fa per capire quale e' l'origine della sindrome e escludere la pur scarsa probabilita' di rischio di ricorrenza (cfr. Genetica di PWS), oltre che tranquillizzare le famiglie che dopo la nascita di un figlio PWS richiedono la diagnosi prenatale

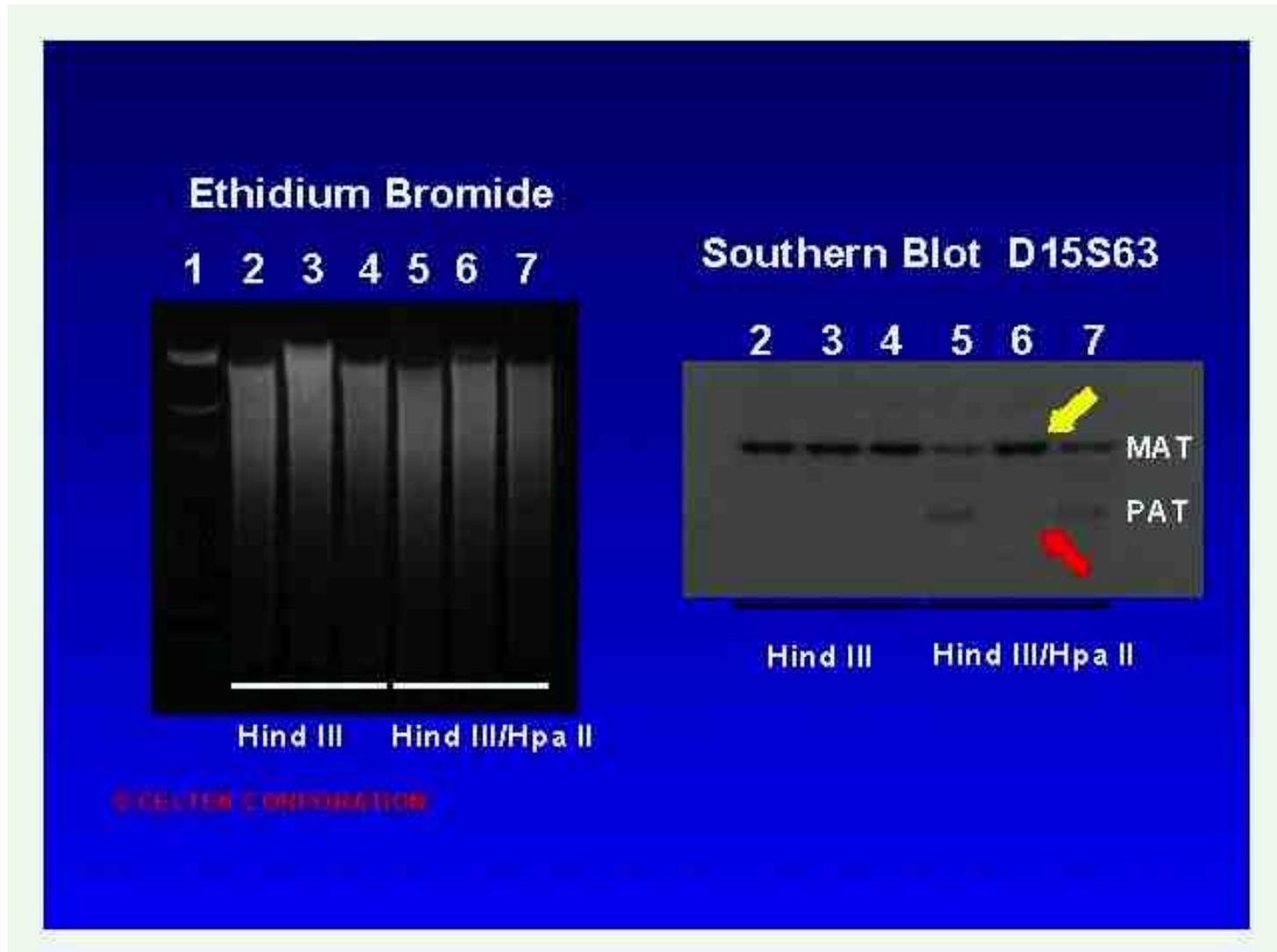


# Diagnosi UPD



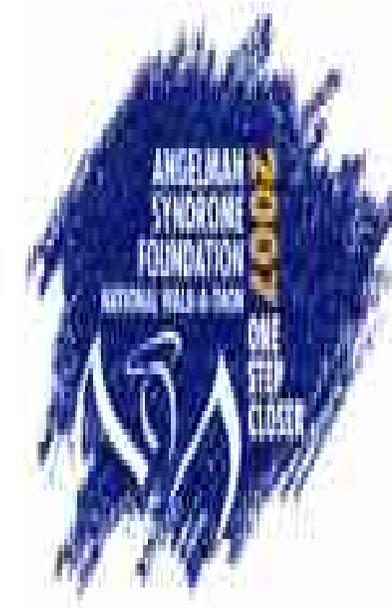


# Diagnosi alterata metilazione





# Angelman





# Angelman

Le caratteristiche principali della sindrome di Angelman sono un grave ritardo psicomotorio, l'assenza di linguaggio o l'utilizzo di poche parole, problemi di equilibrio e movimenti scoordinati (atassia) con tremore agli arti. Altre caratteristiche comuni a tutte le persone affette sono: la tendenza a ridere in modo eccessivo e senza motivo, ipereccitabilità, iperattività, scarsa attenzione. Altri tratti frequenti (presenti in più dell' 80% dei pazienti) sono la microcefalia (testa piccola rispetto al resto del corpo, che si rende evidente dopo i 2 anni di vita, e la presenza di crisi convulsive che insorgono entro i 3 anni. Frequenti sono anche i disturbi del sonno. I bambini tendono a nascere più piccoli del normale, hanno frequentemente problemi di alimentazione, con difficoltà di suzione o rigurgito, la scoliosi può essere un problema negli adulti.

La prevalenza e' compresa fra 1/12.000 e 1/20.000.



## Genetica di AS

- ☛ **Base genetica complessa: 5 tipi di meccanismi. SNRPN ipometilato l'allele paterno ipermetilato il materno**
  - ☛ **Ia - 4Mb del 15q11-13mat: 70% -ereditabilita' bassa-**
  - ☛ **Ib - delezioni interstiziali familiari: <1% - ereditabilita' elevata**
  - ☛ **IIa- UPDpat e cromosomi normali: 4%-ereditabilita' bassa**
  - ☛ **IIb- UPDpat da traslocazione:<1% - ereditabilita' elevata**
  - ☛ **IIIa- mutazione dell'IC con delezione:4%- ereditabilita' elevata**
  - ☛ **IIIb- mutazione dell'IC :4%- ereditabilita' bassa- evidenziabili solo in base al pattern di metilazione: SNRPNpat. Meccanismo sconosciuto**
  - ☛ **IV- mutazioni puntiformi di UBE3A:5%-10% -ereditabilita' elevata- presenti entrambi i pattern di metilazione di SNRPN**
  - ☛ **V- fenotipo AS nessuna mutazione identificata 10%- ereditabilita'? presenti entrambi i pattern di metilazione di SNRPN**



## Ia-Ib

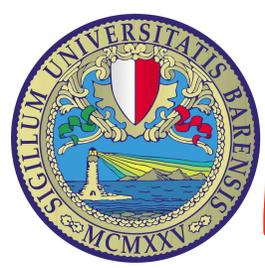
● SNRPN: ipometilato l'allele paterno, ipermetilato il materno

☞ Ia - 4Mb del 15q11-13mat: 70% -ereditabilita' bassa- Perche'?

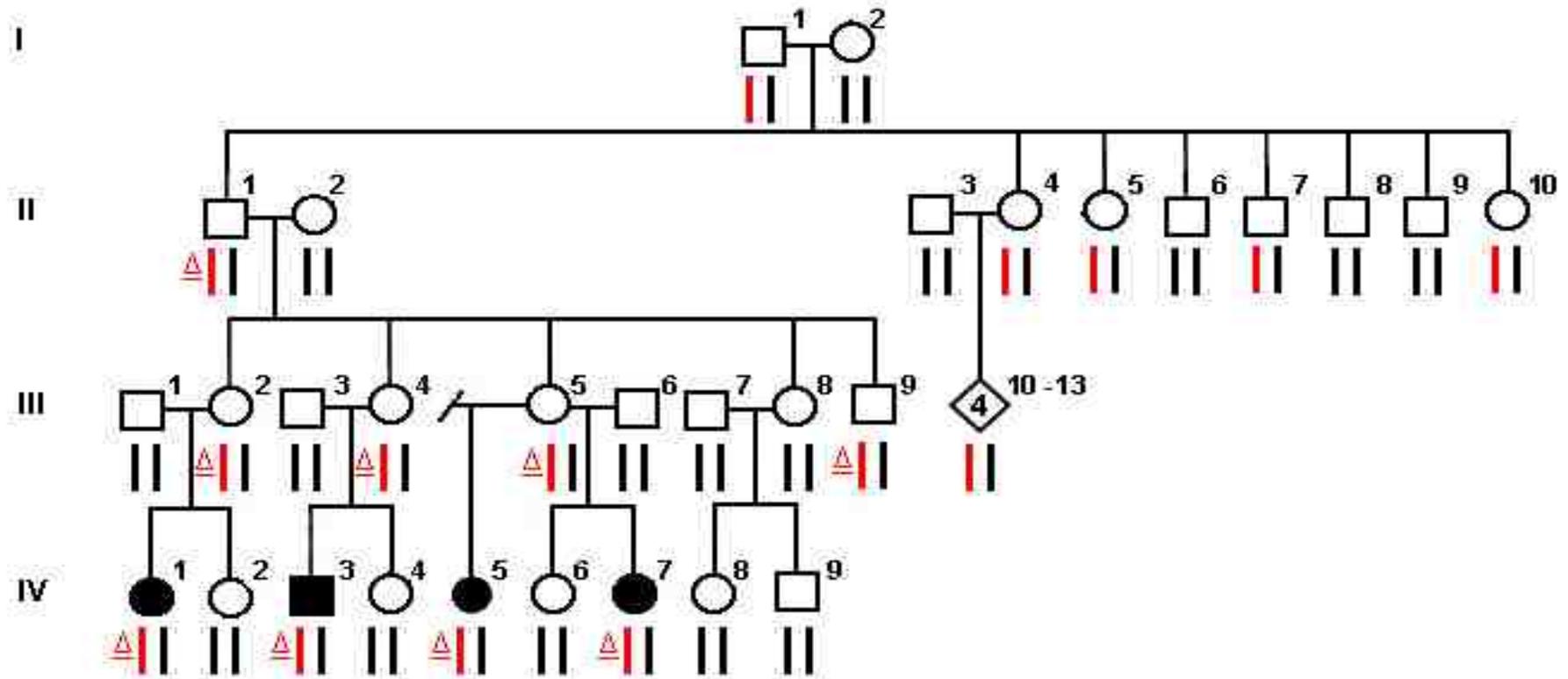
😊 E' un dato statistico la ricorrenza familiare non c'e': i rari casi descritti si fanno risalire al mosaicismo germinale che comunque resta un evento raro. Potrebbe esistere anche una forma di selezione a sfavore dei gameti deleti legata alle dimensioni della delezione. Inoltre le stesse dimensioni potrebbero non consentire la sua presenza in persone non affette come si verifica per la forma Ib

☞ Ib - delezioni interstiziali familiari: <1% - ereditabilita' elevata- Perche'?

😊 La presenza di piccole delezioni che coinvolgono solo il locus AS che e' soggetto ad imprinting, proprio per la presenza dell'imprinting possono passare silenti da una generazione all'altra purché vengano trasmesse dal genitore "giusto":



# Perche' un locus imprintato mutato salta le generazioni





## IIa-IIb

● SNRPN: ipometilato l'allele paterno, ipermetilato il materno

☞ IIa- UPDpat e cromosomi normali: 4%-ereditabilita' bassa-Perche'?

😊 La probabilita' che si origini UPD e' legata ad un evento di non disgiunzione, che di per se' e' un evento raro, e al verificarsi della perdita

di uno dei tre cromosomi 15 in uno stadio molto precoce, prima che il concepito trisomico interrompa il proprio sviluppo (n.b. la trisomia 15 e' letale), inoltre perche' si origini UDP si deve perdere il cromosoma "spaiato". E' il prodotto di probabilita' rare per cui e' rarissimo, che si ripeta.

☞ IIb- UPDpat da traslocazione: <1% - ereditabilita' elevata-Perche'?

😊 La probabilita' di ricorrenza corrisponde alla probabilita' di segregazione sbilanciata dei cromosomi derivativi: dipende dal tipo di traslocazione e la comparsa del fenotipo AS e' uno degli aspetti del fenotipo derivato dalla segregazione dei cromosomi traslocati. Quindi il rischio di ricorrenza e' lo stesso di tutte le traslocazioni bilanciate, come l'ereditabilita' dello stato di portatore.

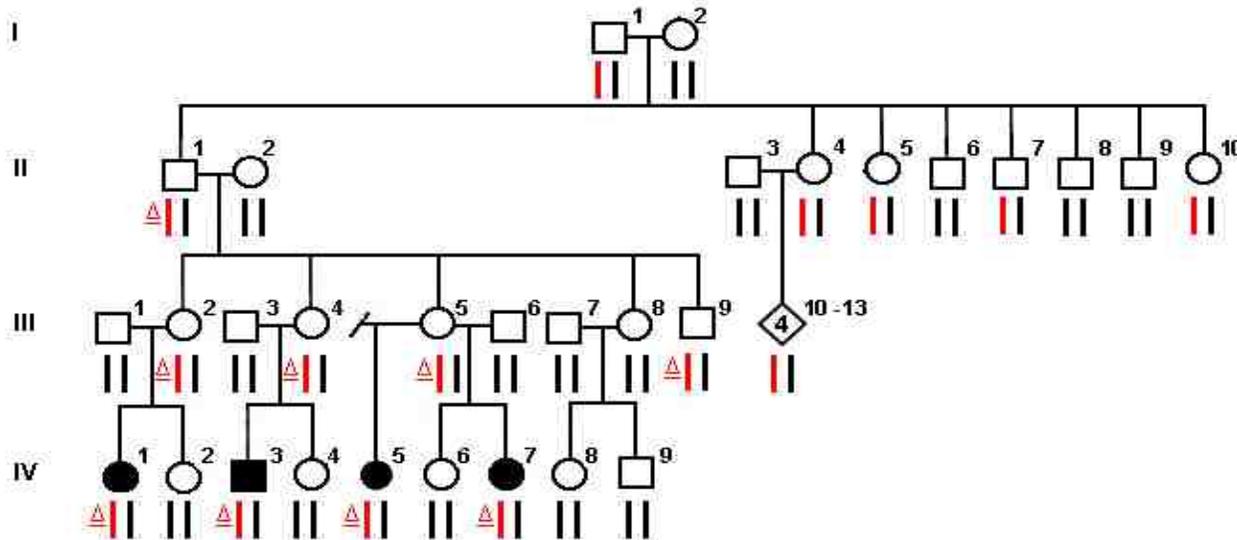


## IIIa

● SNRPN: ipometilato l'allele paterno, ipermetilato il materno

☞ IIIa- mutazione dell'IC con delezione:4%- ereditabilità elevata - Perché?

😊 La ragione è la stessa di Ib: la delezione del centro di imprinting ha lo stesso effetto della delezione interstiziale: si eredita un locus che è improntato male, quando viene ereditato per via materna si ha un locus spento che è come non averlo. L'ereditabilità è elevata perché rimane silente se viene ereditata attraverso il genitore "aiusto".





## IIIb

💣 SNRPN: ipometilato l'allele paterno, ipermetilato il materno

👉 IIIb- mutazione dell'IC :4%- evidenziabili solo in base al pattern di metilazione: SNRPNpat. Meccanismo sconosciuto ereditabilita' bassa-. **Perche'?**

😊 E' un dato statistico la ricorrenza familiare non c'e': i rari casi descritti si fanno risalire al mosaicismo germinale che comunque resta un evento raro.



## IV - V

💣 SNRPN: ipometilato l'allele paterno, ipermetilato il materno

👉 IV-mutazioni puntiformi di UBE3A:5% - presenti entrambi i pattern di metilazione di SNRPN - ereditabilità elevata. Perché?

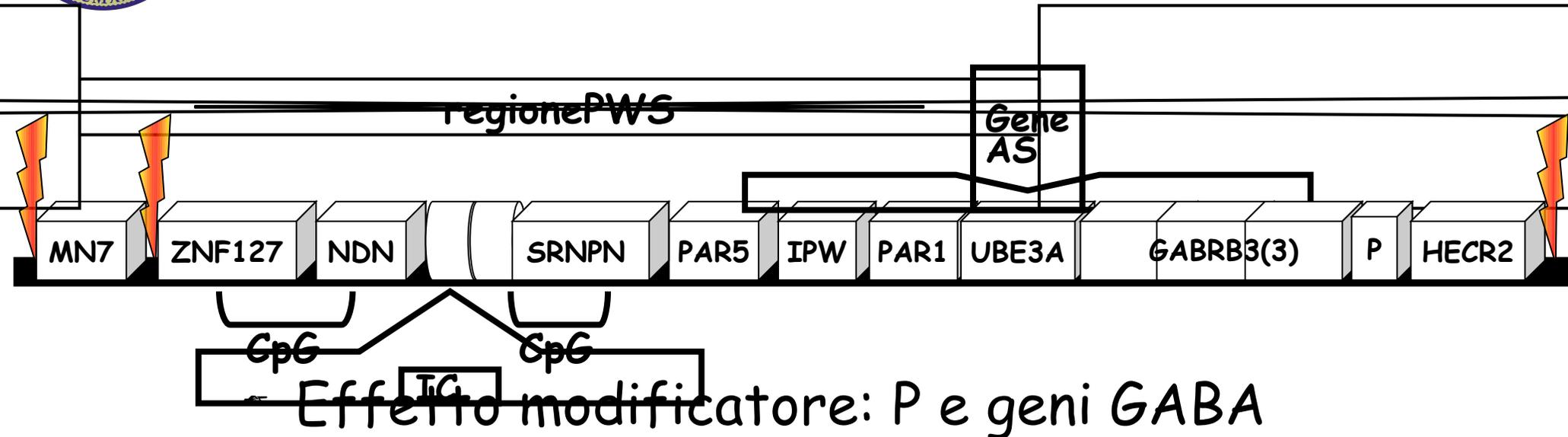
😊 AS di tipo IV e' un fenotipo mendeliano, quindi il rischio di ricorrenza corrisponde al 25%

➤ V- fenotipo AS nessuna mutazione identificata 10%- ereditabilità? presenti entrambi i pattern di metilazione di SNRPN

meccanismi diversi non immediatamente riconducibili alla regione 15q11-13 o al gene UBE3A in presenza di storia familiare 50%



## Struttura della regione



- Gene P : la sua delezione nel tipo Ia provoca ipopigmentazione. Più evidente nel topo. Non influenza il fenotipo degli altri tipi
- geni GABRB3: concorrerebbero alle manifestazioni epilettiche. L'epilessia è presente nel topo knockout per *Gabrb3*.
- AS di tipo IV è un fenotipo mendeliano, mentre il tipo Ia è una sindrome da geni contigui a cui concorrono UBE3A, P e GABRB3



## UBE3A

Mutazioni puntiformi di UBE3A di origine materna provocano la sindrome di Angelman e pertanto puo' essere considerato il principale gene coinvolto nella genesi della sindrome. La sua struttura genomica e' complessa infatti oltre agli esoni (11) che codificano per la proteina (875aaa, 100,6 kDa) che e' un'ubiquitina: E6-AP ubiquitin-protein ligasi (anche denominata ubiquitin ligasi 3A) ha almeno altri 6 esoni a monte del sito di inizio della ORF della proteina. La regione genomica e' nel suo insieme 120 kb. Ha circa 9 trascritti nell'adulto e due nel feto che si traducono in 3 isoforme di diversa lunghezza.



## Il prodotto di UBE3A

- La proteina E6-AP che e' coinvolta nei processi di ubiquitinizzazione e degradazione di p53
- L'ubiquitinizzazione e' un processo che coinvolge 4 classi di proteine che concorrono all'attivazione di substrati per consentirne la degradazione
- La proteina E6-AP fa parte della classe E3: e' la proteina accettrice dell'ubiquitina da parte degli enzimi E2 e probabilmente i suoi target sono numerosi. Il dominio coinvolto e' il C-terminale. L'N-terminale sembrerebbe avere attivita' regolatoria della trascrizione dei recettori degli ormoni steroidei



## Cosa fa il prodotto di UBE3A?

 Topi con UPDpat del cromosoma 7 e con delezioni che coinvolgono *p* e *Ube3a* sono considerati un modello per AS. Il topo con mutazione silente ha una serie di alterazioni del sistema nervoso centrale con particolare coinvolgimento della LPT

 LPT fenomeno elettrofisiologico attraverso il quale la stimolazione degli assoni presinaptici aumenta le connessioni con i neuroni postsinaptici. viene considerato il principale artefice dell'apprendimento e della memoria a lungo termine.



## Ubiquitinizzazione

☹ Come c'entra l'ubiquitinizzazione? Non e' ben chiaro, ma di sicuro il topo AS non ha alterazioni anatomiche ne' riduzioni nella trasmissione sinaptica di base, mentre e' presente un eccesso di p53.

☺ E6-AP potrebbe regolare il livello di p53 attraverso l'ubiquitinizzazione



## Perche' l'ubiquitinizzazione



E l'uomo?

Non e' chiaro

➡ Degenerazione delle cellule del Purkinje e aumento di p53 in un paziente adulto, ma assenza di lesioni in un bambino, quindi il danno potrebbe essere a lungo termine ed essere una conseguenza dell'accumulo di p53.

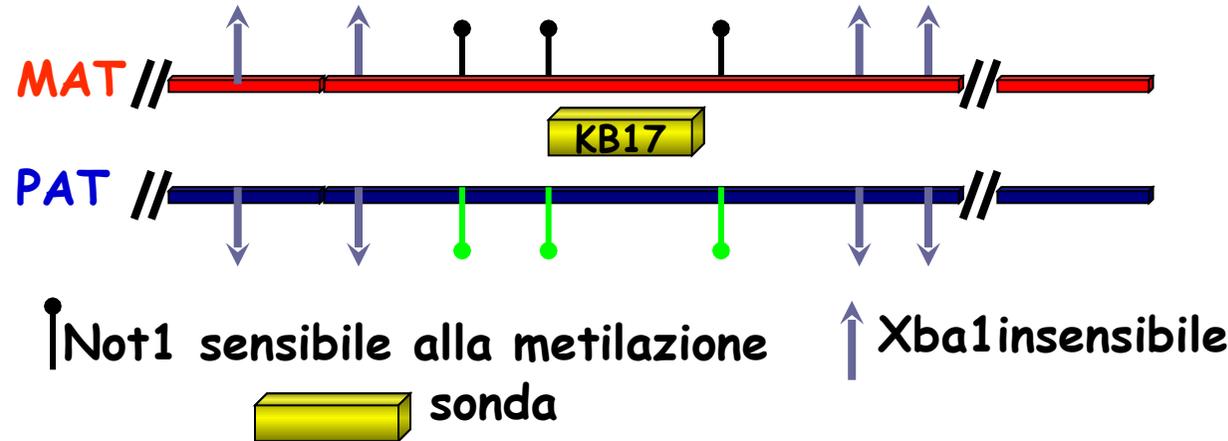
➡ Forse bisogna ancora trovare il target di E6-AP nell'ippocampo



# PWS/AS Southern dopo doppia digestione con enzimi sensibili alla metilazione

Promotore e esone 1 di SNRPN

livello metilazione : Metilati Non metilati

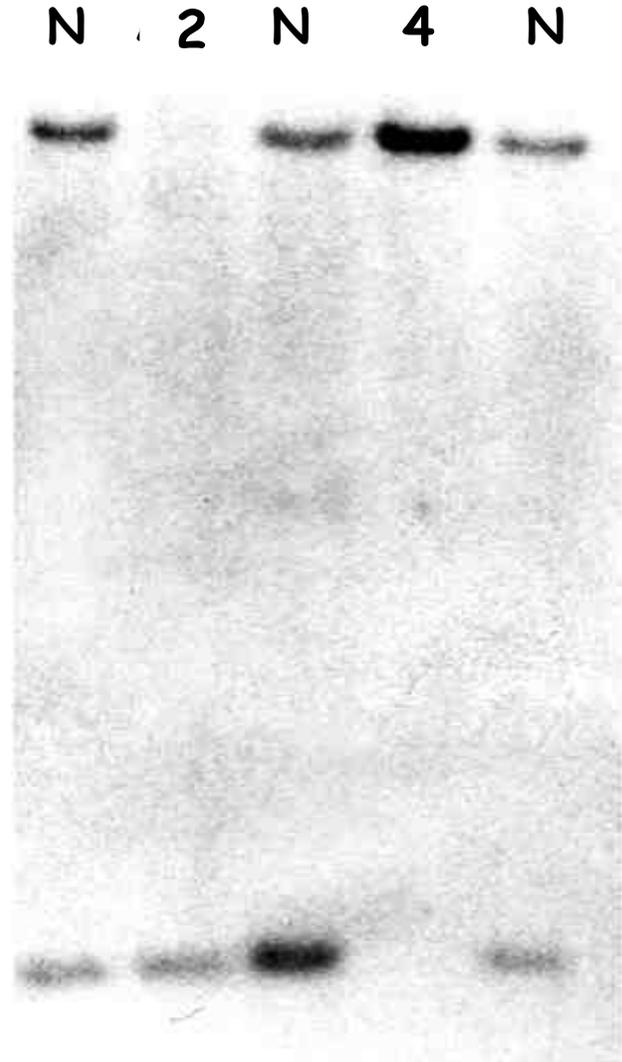


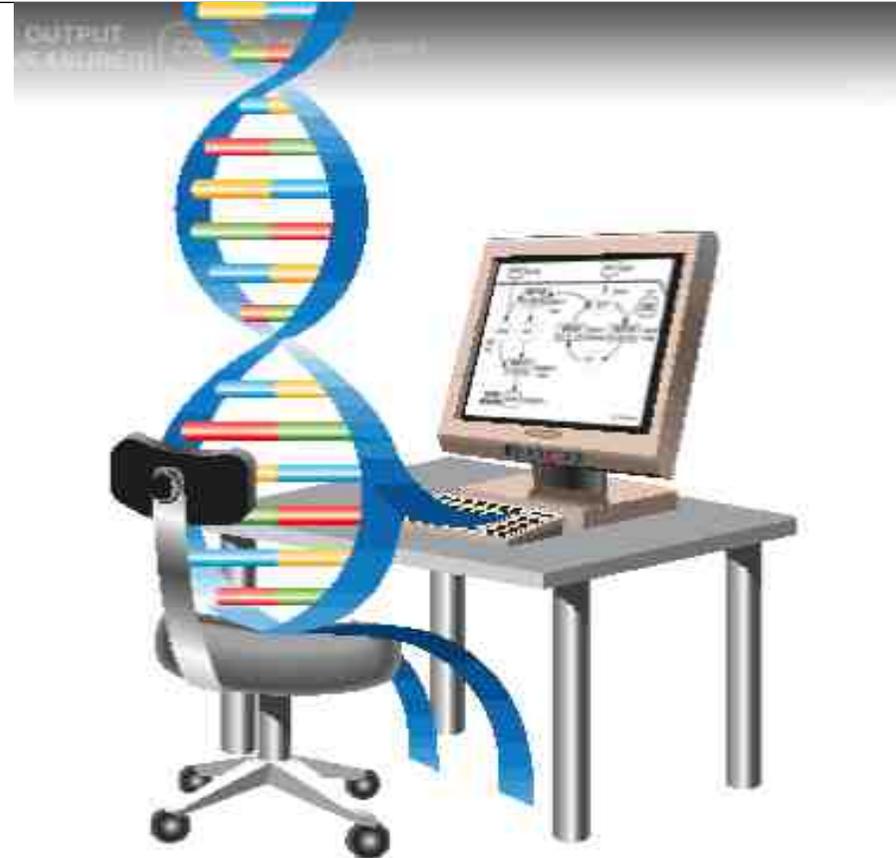
? Il num2 e' affetto da..? Perche'?

? Il num4 e' affetto da..? Perche'?

? Che tipo di mutazione e'?

💣 Non si puo' decidere se UPD, delezione, o difetto di imprinting, ma e' diagnostico





**NON sono dispense, ma un ausilio allo studio sul libro**