

Imprinting

L'osservazione che Gregorio Mendel fece alla metà del XIX secolo, nel corso dei suoi primi esperimenti sui piselli, sarebbe diventata in seguito un assioma per i genetisti. Mendel si era accorto che, incrociando piante di pisello "pure" con semi lisci e piante di pisello "pure" con semi grinzosi, si ottenevano piante "ibride" equivalenti, ma tutte con semi lisci. Il risultato era il medesimo sia che la pianta con piselli lisci rappresentasse la generazione parentale maschile sia, inversamente, che rappresentasse la generazione parentale femminile. Dunque, Mendel aveva scoperto il Principio dell'equivalenza negli incroci reciproci: il gene, indipendentemente dal genitore che lo trasmette alla prole, si comporta sempre allo stesso modo. Nella storia e nella pratica genetica l'importanza dell'osservazione di Mendel non può certo essere sottovalutata. Essa è, infatti, risultata valida per un gran numero di caratteri genetici, non soltanto i piselli, ma anche i moscerini della frutta, i topi, gli esseri umani e tutta una schiera di altri organismi. In retrospettiva, comunque, pare che Mendel selezionò con cura i gruppi dei caratteri dei piselli che segregavano chiaramente, mentre ci sono parecchi altri caratteri negli stessi piselli, come in molte altre specie, che non mostrano una ereditarietà mendeliana.

Una delle sfide più importanti della genetica contemporanea è quella di dimostrare quei caratteri e quelle condizioni che non seguono l'ereditarietà secondo Mendel. E' in questa prospettiva che il concetto di imprinting genomico ha assunto una crescente importanza in quanto potrebbe fornire una spiegazione per una serie notevolmente vasta di osservazioni sulle condizioni per cui la trasmissione e l'espressione genetica non si conformano alle previsioni dell'ereditarietà a gene singolo. Il termine "imprinting" è stato usato per la prima volta in biologia da Lorenz alla fine degli anni '30 per descrivere alcune osservazioni sul comportamento animale: ci sono momenti critici durante le prime fasi della vita in cui il comportamento può essere modificato da particolari esperienze ed esposizioni, come osservato quando degli anatroccoli subito dopo la schiusa venivano indotti a riconoscere come madre un cane, qualora questo rappresentasse la prima cosa che vedevano.

Il termine "imprinting" è stato adoperato in generale per indicare qualsiasi tipo di modificazione del comportamento conseguente ad esperienze particolari. Più recentemente, si adoperava il termine di "imprinting genomico" per riferirsi all'espressione differenziata di materiale genetico, a seconda che esso derivi dal genitore di sesso maschile oppure dal genitore di sesso femminile. L'imprinting genomico deve implicare modificazioni del DNA nucleare di cellule somatiche affinché possa produrre delle differenze fenotipiche; è un concetto questo, che contraddice l'assioma mendeliano secondo il quale l'origine dell'informazione genetica non influenza l'espressione dei geni. In questo contesto il termine imprinting è usato anche per indicare che un qualcosa accade durante il periodo "critico o sensibile" dello sviluppo. Nel caso dell'imprinting genomico lo stadio in cui si formano le cellule germinali, potrebbe rappresentare il periodo critico durante il quale le informazioni genetiche vengono "etichettate" o "marcate", vale a dire che esse vengono temporaneamente modificate per permettere una espressione differenziata.

L'imprinting genomico è un processo che, in maniera temporanea e reversibile, lascia un'impronta di diverso tipo nei geni trasmessi dal genitore di sesso maschile e in quelli trasmessi dal genitore di sesso femminile. Di conseguenza, la prole che riceve geni marcati dalla madre sarà geneticamente diversa da quella che riceve geni marcati dal padre. In poche parole, è in qualche caso importante il fatto che un gene venga trasmesso da un genitore piuttosto che dall'altro. In realtà, sono note da molti anni alcune eccezioni al principio della equivalenza degli ibridi reciproci, ma in generale esse sono sempre state fatte rientrare nell'una o nell'altra di due categorie.

Della prima categoria fanno parte i caratteri legati ai geni localizzati sui cromosomi sessuali, X e Y. Le femmine dei mammiferi hanno due cromosomi sessuali X in tutti i nuclei cellulari, mentre nei maschi questi cromosomi sono diversi e sono noti come X e Y. Tra i numerosi caratteri determinati da geni presenti sul cromosoma X possiamo ricordare il daltonismo e l'emofilia. La loro trasmissione ereditaria segue uno schema ben definito, che non deve essere necessariamente equivalente negli ibridi reciproci. Per esempio, se un uomo daltonico ha figli da una donna non portatrice di daltonismo, nessuno dei figli maschi sarà daltonico. Se la madre è daltonica e il padre no, i figli maschi saranno invece tutti daltonici. In entrambi i casi, le figlie saranno portatrici del gene per il daltonismo, ma non saranno daltoniche. La trasmissione ereditaria e la manifestazione del carattere legato al sesso dipende dal sesso della prole, ma non direttamente dal sesso del genitore che presenta quel carattere.

La seconda categoria di incroci reciproci non equivalenti contempla caratteri controllati da geni situati al di fuori del nucleo cellulare. Alcuni organelli subcellulari (i mitocondri nelle cellule animali, e i mitocondri e i cloroplasti nelle cellule vegetali) possiedono una propria informazione genetica; poiché vengono trasmessi di generazione in generazione col citoplasma della cellula uovo i loro geni vengono ereditati esclusivamente per via materna. L'encefalomiopia mitocondriale (una forma di malattia neuromuscolare) nell'uomo mostra questo tipo di

ereditarietà.

L' imprinting genomico, il terzo tipo di eccezione al principio dell' equivalenza degli incroci reciproci (e quello scoperto più di recente), differisce nettamente dagli esempi riportati in precedenza. I caratteri che esso influenza non sono necessariamente determinati da geni localizzati sui cromosomi sessuali (anche se possono esserlo) e neppure sono associati a organelli ereditati per via materna. Le eccezioni legate al sesso e agli Organelli materni si basano su un ineguale contributo genetico da parte di ciascun genitore. Per contro, a causa dell' imprinting genomico, anche se i genitori trasmettono alla prole geni assolutamente identici, gli effetti di questi geni non saranno uguali se sarà stato esercitato su di essi un imprinting diverso.

A suggerire l' esistenza di un imprinting genomico esistono cinque tipi di osservazioni dedotte da studi effettuati sui topi e anche sugli uomini:

- 1) osservazioni su risultati di esperimenti di tipo trasferimento pronucleare nei topi,
- 2) fenotipi dei triploidi umani;
- 3) espressione di certe disomie cromosomiche nel topo e nell'uomo;
- 4) espressione fenotipica delle deficienze cromosomiche nei topi e nell'uomo (in relazione a sindrome specifiche e a tumori maligni);
- 5) espressione di materiale genetico transgenico in topi transgenici.

1) osservazioni su risultati di esperimenti di trasferimento pronucleare nei topi.

In buona parte, l' interesse attuale attorno ai caratteri influenzati da un imprinting genomico deriva dagli esperimenti di D. Solter, M. Azim H. Surani et al.. Questi autori hanno messo a punto una elegante tecnica " chirurgica " estremamente fine, il trasferimento di nuclei, che permette di scambiare fisicamente l' informazione genetica di un embrione di topo con quello di un altro embrione. Questa tecnica è resa possibile dal fatto che, dopo la fecondazione dell' uovo da parte dello spermatozoo, ma prima che le cellule dell' embrione comincino a dividersi, il nucleo della cellula uovo e quello dello spermatozoo rimangono separati per breve tempo nel citoplasma dello zigote (il che suggerisce già ruoli diversi). Ciascuno dei due nuclei è visibile al microscopio ottico e ha una dimensione e una posizione caratteristiche.

Per mezzo di una sottilissima pipetta di vetro, sono riusciti ad asportare selettivamente dallo zigote o il nucleo appartenente all' uovo o quello appartenente allo spermatozoo (o entrambi). Sono poi riusciti a sostituire il nucleo rimosso con un nucleo proveniente da un altro zigote e hanno trovato che, sostituendo un nucleo derivato da uno spermatozoo con uno avente la stessa provenienza o facendo la stessa operazione con un nucleo ottenuto da una cellula uovo, gli embrioni risultanti si sviluppavano in modo completo ed erano indistinguibili dai topi normali dello stesso ceppo.

Mediante trasferimento di nuclei, è stato possibile dare origine ad embrioni con entrambi le serie di cromosomi di un unico genitore. Volendo sapere in che modo questi embrioni si sarebbero sviluppati, hanno prodotto alcuni "ginogenoti " (embrioni con due serie complete di cromosomi materni) e "androgenoti "(embrioni con due serie complete di cromosomi paterni) e ne hanno confrontato lo sviluppo con quello di embrioni normali. E' importante notare che, essendo stati incrociati fra loro da molte generazioni, i topi utilizzati in questi esperimenti avevano, sia nei maschi, sia nelle femmine, serie identiche di cromosomi (tranne, ovviamente, il cromosoma Y, mancante nelle femmine, e il cromosoma X, presente in unica copia nei maschi). Se lo sviluppo di un embrione di topo dipende esclusivamente dal corredo genico che l' animale possiede, non dovrebbe in teoria importare che un topo riceva tutti i geni da un solo genitore: ginogenoti, androgenoti e topi normali dovrebbero tutti svilupparsi in modo identico. In realtà, invece, questi embrioni non si sviluppano nello stesso modo.

Lo sviluppo sia degli individui con due serie di geni di origine materna, sia di quelli con due serie di geni di origine paterna non giunge a termine: generalmente si arresta dopo che la divisione ha prodotto qualche decina di cellule. Quando riesce a proseguire, come capita di tanto in tanto, i ginogenoti e gli androgenoti mostrano diverse e interessanti anomalie. Nei ginogenoti che hanno raggiunto lo stadio più avanzato, gli embrioni presentano aberrazioni relativamente poco importanti, ma la placenta e il sacco vitellino (strutture essenziali per il nutrimento dell' embrione) sono assai scarsamente sviluppati. Negli androgenoti che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo più avanzato accade esattamente il contrario: il sacco vitellino e la placenta sembrano più vicini alla normalità, mentre gli embrioni sono gracili e poco sviluppati. Entrambe le situazioni sono letali. Questo tipo di lavoro di trapianto pronucleare suggerisce che sia i cromosomi derivati dalla madre sia quelli derivati dal padre sono necessari per uno sviluppo embrionale normale: entrambi forniscono un indispensabile contributo all' embrione e alla placenta.

Poiché la sequenza del DNA nei cromosomi dei ginogenoti, degli androgenoti e degli embrioni normali sono

sempre uguali, e' stata formulata l' ipotesi che i geni fossero stati in qualche modo modificati o marcati in maniera diversa in conseguenza della loro origine materna o paterna. Tra i geni di origine paterna, alcuni, importanti per lo sviluppo embrionale, sembravano inattivi, mentre tra i geni di origine materna parevano inattivi quelli aventi una importanza critica per la formazione del sacco vitellino e della placenta.

Nell'uomo alcune patologie possono essere considerate omologhe ai risultati degli esperimenti di trasferimento pronucleare nei topi: la " mola idatiforme "(malformazione placentare) ed il "teratoma" (tumore di origine embrionale). La mola completa viene riscontrata nelle gravidanze prive di embrione in cui la placenta e' sviluppata in maniera abnorme e disorganizzata; essa ha due sets aploidi di cromosomi derivanti dal padre, e pertanto puo' essere definita androgenetica. Di solito si è riscontrato un raddoppiamento del corredo cromosomico di uno spermatozoo 23-X normale, ma a volte le moli sono il risultato di dispermia. Al contrario, i teratomi sono tumori embrionali dei tessuti provenienti da tutti e tre i foglietti germinali, ma privi di tessuto placentale. E' stato dimostrato che i teratomi ovarici hanno due sets aploidi di cromosomi derivati dalla madre, il che sta ad indicare che sono ginogenetici.

2) Fenotipi dei triploidi umani

I triploidi derivano dal raddoppio del normale contributo di un genitore e mostrano un funzionamento diverso del materiale genetico paterno e materno. Il triploide con due corredi paterni ed uno materno (diandria) viene tipicamente osservato sottoforma di una placenta cistica, con parziali cambiamenti molari. Se è presente il feto, di solito questo ha potuto sopravvivere grazie al mosaicismo ed ha un aspetto caratteristico: testa abbastanza grande, corpo piccolo e affusolato, forte ritardo della crescita intrauterina e sindattilia.

Il triploide con due corredi materni ed uno paterno (ginoide) ha una placenta poco sviluppata, priva di cambiamenti cistici, e' presente un marcato sottosviluppo correlato probabilmente al fallimento della placenta. Queste osservazioni supportano la tesi secondo la quale le informazioni genetiche paterne giocano un ruolo particolarmente critico circa lo sviluppo ed il mantenimento delle membrane e della placenta.

3) espressione di alcune disomie cromosomiche nel topo e nell'uomo.

Un'altra brillante dimostrazione dell' imprinting è stata data da B. M. Cattanach il quale da anni si interessava al fenomeno della non equivalenza di certi incroci reciproci. Per studiare questi caratteri, Cattanach si servì di ceppi di topi che presentavano una o più coppie di cromosomi fusi: topi, cioè, in cui alcuni cromosomi sono fisicamente saldati e, pertanto, non hanno la possibilità di separarsi nel corso della meiosi. Di conseguenza una cellula che si divide potrà ricevere occasionalmente due copie di uno stesso cromosoma, mentre un'altra cellula non ne riceverà alcuna.

Se un uovo con due copie di un cromosoma viene fecondato da uno spermatozoo che non possiede quel cromosoma, l'embrione che ne risulterà conterrà il numero normale di cromosomi, ma entrambe le copie di un cromosoma proverranno dalla madre. Analogamente entrambe le copie saranno di origine paterna se lo spermatozoo conterrà i due cromosomi e la cellula uovo non ne conterrà alcuno. Secondo il principio dell' equivalenza negli ibridi reciproci, tutti gli animali che derivano da tali incroci dovrebbero essere identici. Ma Cattanach ha inequivocabilmente dimostrato, con i suoi esperimenti, che tale principio non vale per diversi cromosomi di topo.

Per esempio, egli ha trovato che i topi che avevano ricevuto entrambe le copie del cromosoma 11 da un unico genitore erano radicalmente diversi da quelli normali, per la taglia e per il peso. Allevati nella medesima condizione, i figli con due cromosomi 11 di origine materna avevano dimensioni anormalmente piccole, mentre quelli che avevano ricevuto quei due cromosomi dal padre avevano dimensioni aumentate.

Una situazione che riguarda l' uomo, simile alle disomie uniparentali del topo, è rappresentata da due casi di fibrosi cistica. In entrambi questi casi, i bambini affetti hanno ricevuto tutte e due i cromosomi 7 dalla madre; i padri non sembrano portatori di fibrosi cistica e la loro paternità è stata dimostrata utilizzando markers del DNA. La disomia uniparentale ha un certo numero di implicazioni degne di nota; in questo contesto va sottolineato che entrambi i bambini (un maschio ed una femmina) presentavano un forte ritardo di crescita intrauterina e di crescita post-natale, il che ricorda le osservazioni fatte circa la disomia nel topo.

Gli esperimenti di Cattanach sono valsi a dimostrare un altro punto importante: gli effetti dell' imprinting genomico non persistono nella generazione successiva, il che significa che il fenomeno non provoca una modificazione permanente del cromosoma. Un topo di piccole dimensioni e di sesso maschile, con entrambe le copie del cromosoma 11 provenienti dalla madre, dà vita, di norma, a prole di dimensioni normali. In un modo o nell' altro, dunque, i geni ricevuti dalla madre devono essere privati dall' impronta femminile e devono venire nuovamente contrassegnati come geni maschili.

Non è chiaro se i maggiori effetti fenotipici delle disomie uniparentali sono causate dalla duplicazione (cioè dalla presenza di due cromosomi dello stesso genitore) o dalla deficienza (cioè dalla mancanza di un cromosoma di un genitore).

4) espressione fenotipica delle deficienze cromosomiche nell'uomo (in relazione a sindrome specifiche e a tumori maligni)

La Sindrome di Prader-Willi, caratterizzata da ipotonia nell'infanzia, obesità dovuta ad iperfagia, ipogonadismo, mani e piedi piccoli ed una facies peculiare, è dovuta ad una delezione del cromosoma 15q11-13. È stato determinato che il cromosoma 15 deleto è derivato dal padre in quasi tutti, se non tutti, i casi osservati. È stato dimostrato che in parecchi casi di Prader-Willi in cui non è possibile dimostrare una delezione, entrambi i cromosomi 15 sono stati ereditati dalla madre. Questi dati suggeriscono che è la mancanza del cromosoma 15 paterno (o almeno della parte critica della regione 15q11-13) a causare il fenotipo della Prader-Willi.

Una situazione analoga è stata riscontrata in pazienti affetti da Sindrome di Angelman. La Sindrome di Angelman è caratterizzata da movimenti ripetitivi, simmetrici, atassici e da una disposizione all'allegria, al riso frequente, con guance rosse e bocca larga (i bambini affetti vengono descritti come "bambini pupazzo"). La metà circa dei pazienti ha delezioni evidenziabili citogeneticamente del cromosoma 15q11-13, simili a quelle osservate nella sindrome di Prader-Willi. Tuttavia, nella sindrome di Angelman, le delezioni coinvolgono il cromosoma 15 ereditato dalla madre.

È sorprendente che due malattie con quadri clinici così diversi possano essere collegate ad un imprinting differenziale di regioni genomiche localizzate sullo stesso cromosoma. Ma, contrariamente ai topi anormalmente grossi o piccoli, che Cattanach ha ottenuto attraverso i suoi esperimenti, la sindrome di Prader-Willi e quella di Angelman non si possono spiegare facilmente come facce opposte di una stessa medaglia, causate da un eccesso o da una carenza degli stessi prodotti genici. Infatti le due sindromi non sono dovute a mutazioni dello stesso locus, ma a mutazioni di geni diversi fisicamente associati che subiscono un imprinting diverso. Lo studio di questi mutanti ha permesso di individuare una regione definita centro di imprinting sul cromosoma 15 (vedi oltre)

L'insorgenza di alcune forme di cancro infantile, tra cui il rhabdomyosarcoma dell'embrione (un tumore che colpisce i muscoli), il tumore di Wilms (una forma di carcinoma renale) e l'osteosarcoma (una forma di cancro delle ossa) è legata all'imprinting delle regioni genomiche in cui sono localizzati gli oncogeni corrispondenti.

Per spiegare come l'imprinting genomico possa trovarsi coinvolto in queste malattie, è opportuno illustrare brevemente come si pensa che compaiono le suddette forme di tumore. L'insorgenza del tumore è la conseguenza di un accumulo di successive mutazioni in geni specifici all'interno di una singola cellula. Per esempio, sul cromosoma 11 si trova un gene, *Rd*, che fa parte di una famiglia di geni conosciuti come oncogeni recessivi, o geni che sopprimono i tumori o anti-oncogeni. Senza il prodotto di *Rd* una cellula muscolare si trasforma in una cellula neoplastica che poi evolve in un rhabdomyosarcoma. Dato che ogni nucleo cellulare contiene due copie del cromosoma 11, prima che la cellula si trasformi devono essere disattivate entrambe le copie di *Rd*. La prima copia può essere disattivata in molteplici modi, il più semplice dei quali è una mutazione che altera la sequenza di DNA del gene stesso. Se questa mutazione ha luogo, allora qualunque altro evento genetico che inattivi la rimanente copia di *Rd* provoca l'insorgenza della trasformazione neoplastica.

Alcuni autori hanno proposto, per quanto riguarda alcuni tumori maligni che colpiscono l'infanzia, un meccanismo alternativo. Secondo la loro opinione, l'evento che inattiva la prima copia di un oncogene recessivo non sarebbe una vera e propria mutazione, ma al contrario potrebbe essere un imprinting genomico, in grado di disattivare i geni in maniera diversa nei maschi e nelle femmine. In base a tale ipotesi, dunque, le cellule del rhabdomyosarcoma dovrebbero possedere sul cromosoma 11 sopravvissuto una copia marcata, inattiva, del gene *Rd*. Inoltre nella maggior parte dei casi di rhabdomyosarcoma embrionale questo cromosoma proverrebbe sempre dallo stesso genitore.

Sono state in effetti trovate alcune prove che convalidano questa teoria. La prima inattivazione nel rhabdomyosarcoma embrionale, nel tumore di Wilms e nell'osteosarcoma ha luogo quasi sempre in un oncogene recessivo che si trova su un cromosoma paterno. I dati ottenuti depongono in favore di un ruolo esercitato dall'imprinting genomico nella genesi di questi tumori, ma prospettano anche un problema teorico importante.

Il problema nasce dal fatto che la maggior parte di coloro che hanno studiato l'imprinting genomico, l'ha considerato come una conseguenza della notevole differenza che esiste tra maschi e femmine, nella fisiologia e nella biochimica della formazione dei gameti (uova e spermatozoi). Nel corso della maggior parte della loro vita da adulti, i maschi continuano a produrre miliardi di spermatozoi a partire da una popolazione di cellule staminali che si dividono ininterrottamente. Per contro, le femmine possiedono già al momento della nascita tutte le cellule uovo che via via andranno maturando nel corso del periodo riproduttivo. Se l'imprinting differenziale riflettesse soltanto la dicotomia tra produzione maschile e produzione femminile dei gameti, tutti i maschi dovrebbero marcare i loro genomi in un certo modo e le femmine in un modo diverso. Non potendo provare il contrario, abbiamo dato per scontato che tutti gli appartenenti a uno dei due sessi marcassero i rispettivi geni in maniera identica.

Ma i dati che collegano i tumori maligni dell'infanzia a oncogeni recessivi inattivi di origine paterna hanno smentito questo assunto. Per esempio, se tutti i maschi marcassero e inattivassero il gene *Rd*, l'incidenza del rhabdomyosarcoma sarebbe molto elevata: una sola alterazione genetica nel gene *Rd* ereditato dalla madre farebbe

trasformare alcune cellule di un individuo qualsiasi in cellule tumorigene. Poiché i tumori di questo tipo sono rari, (colpiscono approssimativamente un bambino su 20.000), è improbabile che si erediti un oncogene recessivo inattivo dal padre. Nei soggetti affetti da questo genere di malattia sembra invece che accada esattamente questo.

Un' affascinante spiegazione di questa differenza è che non tutti i maschi marchino o inattivano gli stessi geni. Quale potrebbe essere la causa di tali differenze tra individui? Se uno è un genetista convinto, si rivolgerà sempre in primo luogo alla genetica per ricevere risposta a interrogativi del genere. Per una risposta di natura genetica devono esserci uno o più geni responsabili dell' imprinting (da non confondersi con quei geni che subiscono essi stessi l' imprinting). In altre parole, l' imprinting deve essere un processo che nasce dall' attività di svariati geni che operano in maniera diversa nei maschi e nelle femmine. I soggetti dello stesso sesso con geni diversi che controllano l' imprinting avranno anche costellazioni diverse di geni marcati. Per esempio, la maggior parte dei maschi non disattiverà il gene Rd, ma lo faranno alcuni individui con una copia aberrante di un gene che controlla l' imprinting.

L' idea che l'espressione o la mancanza di espressione di un gene possa essere controllata da altri geni non è nuova: descrive un vecchio e ben noto fenomeno, definito "modificazione della dominanza". Molti caratteri sono sensibili all'attività di altri geni che si dice ne modifichino l'espressione. L'imprinting genomico può essere visto come un caso speciale di modificazione della dominanza. L'unica caratteristica insolita dei geni modificatori che si presuppone controllino l'imprinting genomico è quella di agire in maniera diversa nei maschi e nelle femmine.

5) Espressione di materiale genetico transgenico in topi transgenici

Una osservazione importante riguarda il fatto che per circa un quarto dei transgeni esaminati, l'espressione nelle generazioni successive dipende dal sesso del genitore che trasmette il gene. Ad esempio quando il gene è ereditato a partire da un topo transgenico maschio, esso viene espresso nei tessuti appropriati. Tuttavia, quando la figlia femmina del topo maschio transgenico trasmette il gene alla propria prole, questa non lo esprime. A seguire, i figli della prole maschile, esprimono il gene; invece, i figli della prole femminile non lo esprimono. Questo fenomeno non sembra collegato al sito di inserzione, alla grandezza del transgene, al numero di copie incorporate; la non espressione pare associata alla metilazione del transgene. Man mano che il gene passa da una generazione all' altra, la sua metilazione viene invertita a seconda dell' origine parentale. Per questo è stato suggerito che la metilazione possa giocare un ruolo nella regolazione dell' espressione dei geni coinvolti nell' imprinting.

Prese insieme, queste cinque osservazioni suggeriscono con forza che l' imprinting genomico (espressione differenziale del DNA derivato dalla madre o dal padre) si verifichi davvero in alcune parti del genoma dei mammiferi e ci si aspetta che svolga un ruolo essenziale nelle patologie umane. Sembrerebbe che l' imprinting del DNA avvenga normalmente durante la gametogenesi, in alcune regioni del genoma, e che sia reversibile; vale a dire che non si tratta di una mutazione o di un cambiamento permanente, ma piuttosto di una modificazione che può essere eliminata quando le cellule germinali vengano prodotte dalle generazioni successive.

Esaminare un ipotetico pedigree di imprinting aiuta a visualizzare cosa cercare negli studi familiari sull' imprinting genomico umano. Un allele imprintabile viene trasmesso in maniera mendeliana, ma la sua espressione sarà determinata dal sesso del genitore che lo ha trasmesso.

Nell'imprinting materno l'espressione fenotipica di un gene sia nella prole maschile sia nella prole femminile, è influenzata dalla madre. Lo "spegnimento" di tale gene si verifica se la prole eredita il gene della madre, ma non quando lo stesso gene è trasmesso dal padre di lei, dai fratelli, dai figli maschi. Quando il figlio maschio (che non manifesta) trasmette il gene, la sua prole lo esprimerà; invece, quando la figlia femmina (che non manifesta) trasmette il gene, la sua prole non lo esprimerà.

Esattamente il contrario avviene nell' imprinting paterno. Bisogna puntualizzare che:

1) vengono osservati numeri uguali di maschi e femmine affetti o che non manifestano ad ogni generazione, sia nell'imprinting materno che paterno;

2) gli individui che trasmettono, ma non manifestano, rappresentano la chiave per capire se un segmento cromosomico presenta imprinting materno o paterno. Nell' imprinting materno è il maschio il portatore che non esprime e trasmette ad una prole che manifesta; nell' imprinting paterno, sono le femmine le portatrici che non manifestano e trasmettono.

3) il pedigree di un gene imprintabile può sembrare autosomico dominante, autosomico recessivo o ad ereditarietà multifattoriale, a seconda della parte di famiglia che si osserva.

4) il pedigree è molto diverso da quello osservato nella ereditarietà mitocondriale o citoplasmatica, in cui nessuno dei figli o dei nipoti di un maschio può essere affetto, mentre sono a rischio tutti i figli di una femmina.

Sapendo del possibile effetto di imprinting sul fenotipo o sull' espressione, in un qualsiasi disordine che manchi di uno schema di ereditarietà chiaro, bisognerebbe esaminare il pedigree per scoprire prove di imprinting. Molti disordini finora descritti come multifattoriali, o come disordine che mostrano una grande variabilità di espressione o come disordini con scarsa penetranza, sono dei candidati particolarmente validi per questo tipo di effetto. Perciò i

pedigrees devono essere esaminati sistematicamente, in particolare in quei disordini con schemi di ereditarietà insoliti.

Quando avviene l' imprinting?

L' imprinting sembrerebbe un processo che possa modificare la sua forma da una generazione alla successiva; vale a dire che non è una mutazione permanente del DNA, ma piuttosto un' alterazione temporanea della funzione di una parte del DNA (sebbene duri per tutta la vita). La differenza funzionale fra il genoma di origine materna e quello di origine paterna, deve possedere una base molecolare ben stabilita. Il meccanismo di imprinting implica:

- abolizione di ogni imprinting precedente;
- nuove modificazioni del genoma parentale nelle cellule germinali di ciascun sesso;
- nuova etichettatura del cromosoma come paterno o come materno (ciò potrebbe avvenire nello stesso momento in cui avvengono delle nuove modificazioni del genoma);
- l'espressione fenotipica diversa tessuto-specifica del nuovo imprinting nella prole.

L' imprinting differenziale ereditato dai genitori deve essere cancellato o inattivato nella linea di cellule germinali di ciascun individuo affinché venga introdotto un nuovo imprinting genomico. In questo senso, l' imprinting autosomico ricorda il meccanismo di inattivazione del cromosoma X. Le prove di cui si dispone suggeriscono che almeno parte del processo che porta all'espressione differenziale delle informazioni genetiche materne e paterne nell' embrione e nel feto (e anche durante la vita) debba attuarsi durante la gametogenesi. Il che significa che le nuove modificazioni potrebbero avvenire durante la meiosi oppure durante gli stadi successivi della maturazione dei gameti o alla fecondazione della cellula uovo che diventerà zigote. D'altra parte è durante il pachitene che i cromosomi omologhi si appaiano per tutta la loro lunghezza e questo rappresenterebbe un momento logico perché avvenga un qualche tipo di modificazione. Potrebbe essere un processo correlato con lo stato fisico dei cromosomi (allungati o condensati, metilati o non metilati) durante gli stadi della gametogenesi, oppure potrebbe essere correlato a un processo attivo come il centro di inattivazione della X.

Come avviene l' imprinting?

Il lavoro compiuto sui topi transgenici suggerisce che l' espressione differenziale del transgene improntato sia associata alla metilazione. Le modifiche del DNA attraverso la metilazione potrebbero fornire una modalità per determinare se un particolare allele di un gene sia in un certo momento inattivo. In generale, la metilazione sembra essere un fenomeno secondario nella regolazione dei geni, e potrebbe essere secondario anche in questo caso.

Effetti dell' imprinting.

Gli effetti dell' imprinting appaiono in stadi precoci ed esplicano la loro azione sulla crescita e sul comportamento. Anche gli incroci tra specie diverse suggeriscono che l' imprinting possa avere effetti sulla crescita di diverse aree del corpo; basti pensare che nell' incrocio tra cavallo ed asino si osservano chiare differenze a seconda se il cavallo è il padre (mulo) o la madre (bardotto).

Conservazione dei segmenti improntati?

Esperimenti genetici effettuati con il topo hanno aiutato a stabilire una mappa delle regioni del cromosoma improntato. Potrebbe essere che solo un piccolo numero di geni all' interno di ciascun segmento sia in realtà soggetto ad imprinting. Si pone la questione, nei topi e negli uomini, se ci sia conservazione delle regioni improntate oppure no. I confronti sono basati sulle recenti relazioni a proposito della omologia o della sintenia fra cromosomi umani e murini. Tali attribuzioni sono fin troppo abbozzate, tuttavia rilevano una reale tendenza dei loci delle malattie improntate a sovrapporsi con i segmenti improntati di quattro o cinque cromosomi murini, che si sa essere improntati. Non possono essere dedotte conclusioni sulla base delle comparazioni, tuttavia queste suggeriscono che veramente possa esistere una certa conservazione dei segmenti improntati tra i mammiferi.

Pubblicazioni chiave

La trasmissione materna ma non paterna di una mutazione 15q11-13 non da delezione provoca l'espressione

fenotipica della sindrome di Angelmann

J. Wagstaff, J.H.M. Knoll, K. A. Glatt, Y. Y. Shugart, A. Sommer e M. Lalande, Nat.Genet 1 291-294 (1992)

La sindrome di Angelman può derivare da delezioni del cromosoma 15q11-13 ereditato dalla madre, da disomia uniparentale paterna del cromosoma 15, ma anche nel 40% dei pazienti, da una copia del cromosoma 15 apparentemente intatta. Al contrario, la sindrome di Prader-Willi può derivare da delezioni del cromosoma 15q11-13 ereditato dal padre o da disomia uniparentale materna del cromosoma 15. Il fatto che le diverse origini parentali delle delezioni del 15q provochino fenotipi diversi, ha portato a formulare l'ipotesi secondo la quale uno o più geni localizzati in questa regione mostrano espressione differenziale (imprinting genetico).

Alcuni autori hanno descritto una famiglia in cui i tre bambini affetti da AS non mostrano una delezione citogenetica sul cromosoma 15. L'analisi molecolare ha mostrato una delezione che coinvolge il locus D15S10 in tutti e tre i bambini, così come nella loro madre e nel loro nonno materno. Analisi successive hanno mostrato che questa delezione sub-microscopica coinvolge anche il locus che codifica la subunità B3 del recettore del GABA (GABRB3). Studi recenti hanno evidenziato una regione critica di sovrapposizione della delezione nel 15q11-13, che comprende i loci D15S10 e GABRB3. Entrambi questi loci sono stati esclusi dalla regione critica della delezione della PWS.

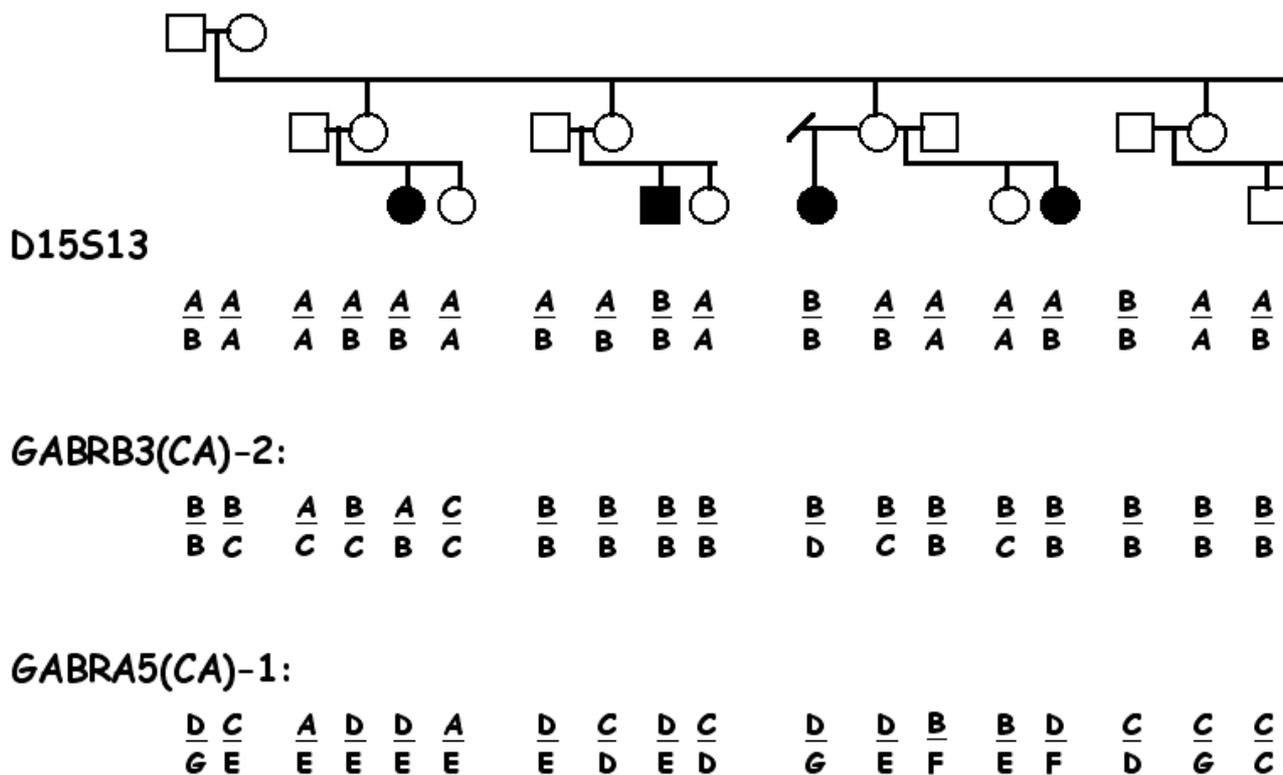
Il fatto che la madre dei tre bambini affetti da AS abbia ereditato la delezione che coinvolge i loci D15S10 e GABRB3 dal padre e sia fenotipicamente normale (non mostra segni di PWS), suggerisce con forza che i loci genetici per AS e PWS, sebbene strettamente associati, siano distinti. Il GABRB3 codifica per una subunità (B3) del recettore per il GABA, che è un neurotrasmettitore inibitorio. La presenza di questo gene nella regione critica della AS, il cui fenotipo include: paresi, riso incontrollato, movimenti anomali, è interessante, sebbene una correlazione diretta tra questo gene e il fenotipo della AS non sia stata ancora stabilita. Un secondo gene, che codifica per un'altra subunità del recettore del GABA, la subunità A5, è stato recentemente mappato al cromosoma 15q11-13, distalmente rispetto alla GABRB3, ed è stato indicato come GABRA5.

Circa un terzo dei pazienti affetti da AS non mostrano prove citogenetiche di delezioni sul cromosoma 15, ma hanno ricevuto entrambi gli alleli materni e paterni del cromosoma 15. Questo schema di non delezione è stato ritrovato in un certo numero di casi familiari in cui è presente più di un figlio con sindrome di AS; pertanto il rischio di ricorrenza nei casi di AS senza delezione sembrerebbe più alto rispetto ai casi deleti. Baraitser et al. hanno proposto in questi casi una trasmissione di tipo autosomico recessivo. Knoll et al. suggeriscono invece che questi pazienti potrebbero aver ereditato un allele materno mutato e l'allele paterno normale, di un locus nel 15q11-13 imprintato o alternativamente, che la mutazione in un locus non localizzato in 15q11-13 potrebbe essere la causa della comparsa del fenotipo AS. Infine, la disomia uniparentale paterna per il cromosoma 15, spiega meno del 15% dei casi di AS; invece, nella PWS, la disomia uniparentale materna, sembra spiegare tutti i casi che non presentano delezioni.

In questa pubblicazione viene descritta una famiglia in cui tre sorelle hanno avuto figli con AS senza delezione, una di loro con due partners diversi. Per dimostrare che tutta la prole con AS ha ereditato la stessa regione del nonno materno e che tutti gli altri individui non affetti hanno ereditato la regione dalla nonna materna, sono stati adoperati diversi polimorfismi del DNA all'interno della regione 15q11-13. Una quarta sorella che non ha avuto prole affetta da AS, ha ereditato gli altri alleli di questi loci polimorfici del padre. Si suppone che la AS in questa famiglia sia causata da una mutazione all'interno della regione 15q11-13, la quale provoca il fenotipo AS se trasmessa da madre a figlio, ma non lo provoca se trasmessa dal padre alle figlie.

Gli individui affetti da AS (fig.1) sono rappresentati da una coppia di sorellastre da parte di madre e da due primi cugini materni.

Fig. 1



L'analisi sia cromosomica che molecolare (tramite sonde polimorfiche della regione) per tutti e quattro gli individui affetti non ha evidenziato alcuna delezione del cromosoma 15. La sonda 189-1 (locus D15S13), localizzata all'interno del segmento 15q11-13, prossimale alla regione critica della AS, evidenzia polimorfismo Taq-1 a due alleli, che fornisce importanti informazioni su questa famiglia (fig1). Il nonno materno dei bambini affetti da AS è eterozigote a questo locus (AB), mentre la nonna materna e'AA. Il nonno ha trasmesso il suo allele B a ciascuna delle tre figlie che ha una prole affetta da AS; invece, alla figlie che ha avuto due figli non affetti, ha trasmesso l'allele A.. Tutti e quattro i bambini affetti da AS, hanno ereditato l' allele B delle madri; i bambini sani hanno ereditato l'allele A dalle madri (dalla nonna). Dunque, in questa famiglia l'allele B al locus D15S13 viene ereditato insieme ad un allele AS il quale, quando trasmesso dal padre ai figli non produce effetti fenotipici, invece quando trasmesso dalla madre ai figli produce il fenotipo AS. Inoltre, i genotipi al locus D15S13 mostrano che per almeno due degli individui AS (III-1 e III-7) è presente un allele materno, il che esclude la possibilità di una disomia monoparentale paterna.

Ulteriori prove, coerenti con l' ipotesi del nonno materno sia coinvolto con l' espressione della AS, sono state fornite dal polimorfismo GABRB3 (CA)-2 associato al locus GABRB3 anche se non completamente informativo. Gli individui II-2 e II-5, madri di bambini affetti da AS ereditano l'allele B dal padre e l' allele C dalla madre. I figli con AS, III-1, III-5 e III-7, hanno ereditato l' allele B dal nonno; quelli sani hanno ereditato l' allele C dalla nonna.

Un altro polimorfismo che si è rivelato molto informativo per questa famiglia è il GABRA5 (CA)-1 associato al locus GABRA5. Le tre madri dei bambini affetti da AS, hanno ereditato l' allele D dal padre mentre la quarta sorella eredita dal padre l' allele G.I quattro bambini con AS hanno anch' essi ereditato l'allele D del nonno, mentre i bambini sani hanno ereditato un allele della nonna.

La famiglia descritta rappresenta la prima prova diretta che la AS senza delezione e senza disomia monoparentale, chiama in causa una alterazione genetica della regione regione 15q11-13. La segregazione di numerosi markers indica che tale alterazione è stata trasmessa dal nonno materno (che è fenotipicamente normale) a tre figlie femmine e ad un figlio maschio, tutti fenotipicamente normali. Il fenotipo della AS si manifesta quando tale mutazione viene trasmessa dalle figlie femmine alla propria prole, in coerenza con l' ipotesi dell' imprinting. Inoltre il fatto che l'ipotetica mutazione AS sia stata trasmessa da un maschio a quattro nipoti senza manifestazione di PWS nella generazione intermedia fornisce un'ulteriore prova che i loci per PWS e AS siano distinti.

Il modello di ereditarietà di questa famiglia e' molto simile a quello descritto per un allele mutato del fattore di crescita-II insulino simile (IGF-II) nel topo. In questo caso solo la trasmissione dell'allele paterno porta al fenotipo mutato (ritardo nella crescita). La trasmissione materna non provoca nessun effetto fenotipico. E' stato possibile nel topo provare questo tipo di trasmissione grazie all'espressione limitata all'allele paterno in molti tessuti.

L' attuale conoscenza della regione 15q11-13, coinvolta nella AS e nella PWS, suggerisce che essa deve

contenere almeno tre tipi di loci (fig.2):

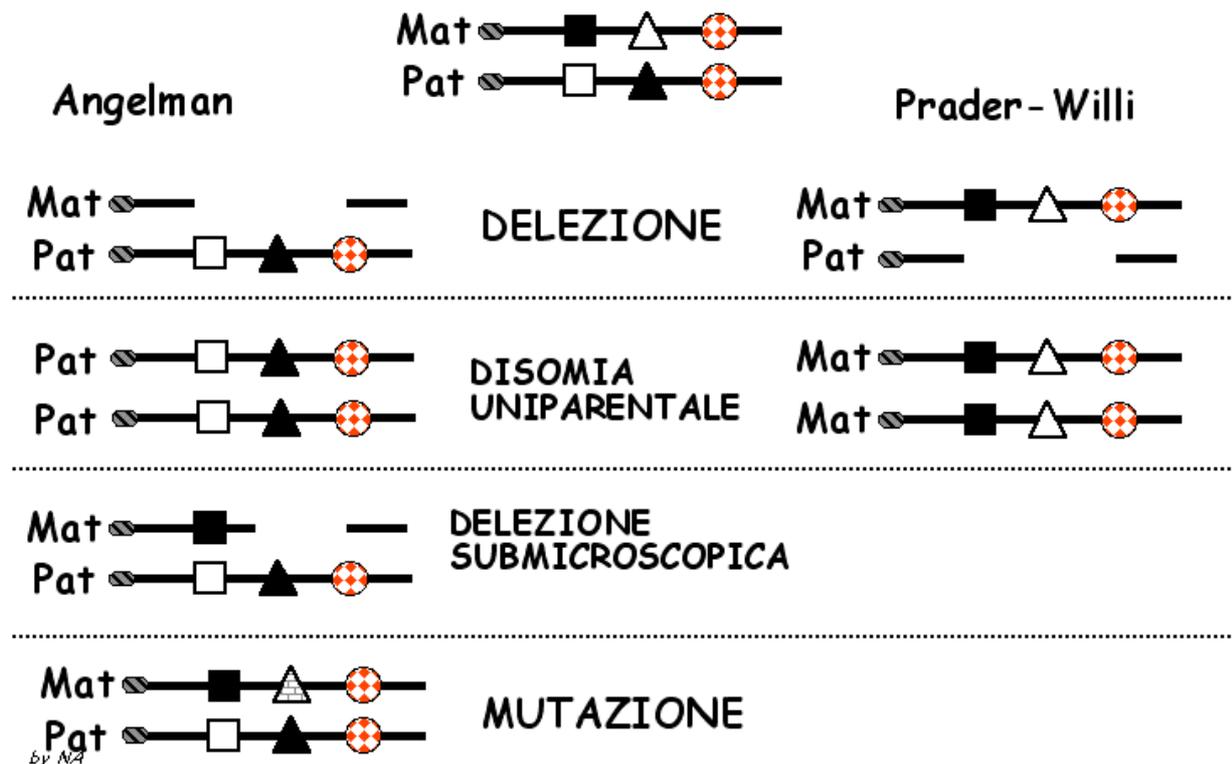


Fig. 2

1) geni di tipo I, preferenzialmente espressi sul cromosoma materno, la cui delezione provoca la AS; tale espressione preferenziale non deve necessariamente riguardare tutti i tessuti o tutti gli stadi dello sviluppo. (Lo studio dell'espressione di IGF-II nel topo indica che l'espressione del gene imprintato e' probabilmente modificata sia nel tempo che nei tessuti nel corso dello sviluppo.)

2) geni di tipo II: sono espressi preferenzialmente sul cromosoma paterno e la loro delezione causa la PWS.

3) geni di tipo III: sono probabilmente espressi in ugual modo sia sul cromosoma materno sia su quello paterno. La presenza di ipopigmentazione sia nei casi di AS che PWS dovuti a delezione, suggerisce la presenza di un locus di tipo III in questa regione. Studi di sintenia nel topo hanno evidenziato la presenza di un locus *p* (occhio rosa) nella regione omologa alla 15q11-13 umana.

Secondo il modello rappresentato nella fig.2, la AS risulta dalla mancanza di espressione normale degli alleli materni dei geni di tipo I. Questo potrebbe essere causato da una delezione materna, da una disomia monoparentale paterna o da mutazioni sub-microscopiche materne che distruggono questi geni.

La PWS risulta dalla mancata espressione degli alleli paterni dei geni di tipo II. Una recente analisi dei pazienti con PWS ha rilevato che tutti gli individui clinicamente tipici hanno o una delezione oppure una disomia monoparentale.

La ragione della differenza con la AS, della quale sono riportati un numero sostanziale di pazienti senza delezione, senza disomia monoparentale, non è chiara. Forse nella PWS il bersaglio della mutazione è molto più grande e probabilmente coinvolge due geni non contigui, entrambi espressi preferenzialmente sul cromosoma paterno.

Conversione dell'imprinting sul cromosoma 15 umano puo' coinvolgere trascrittiali alternativi del gene SNRPN
 Dittrich B. et al Nature Genetics 14 n.2 163-170 1996

Il gene SNRPN (Small Nuclear RibonucleoProtein N) è espresso solo dal cromosoma 15 paterno ed è localizzato in 15q11-13, ricopre 25 kb di DNA genomico ed è costituito da dieci esoni. La regione cromosomica

15q11-13 dell' uomo contiene almeno altre quattro sequenze imprintate, che vengono espresse solo dal cromosoma paterno; sono: i geni ZNF 127 e IPW, e due sequenze scarsamente caratterizzate, la PAR5 e la PAR1.

Il gene ZNF 127 mappa circa 1 Mb ed è centromerico rispetto al gene SNRPN; i geni PAR5, IPW e PAR1, mappano, rispettivamente 50, 150 e 170 kb e sono telomerici rispetto alla isola CpG di SNRPN. I meccanismi che sottostanno all' imprinting genomico sono sconosciuti, la metilazione specifica del DNA del genitore di origine sembra giocare un ruolo importante nel regolare l' espressione del gene imprintato. Infatti, è stata evidenziata una metilazione diversa del DNA nel gene ZNF 127, nel gene D15S63, nell' isola CpG e nell' esone 7 dell' SNRPN. La localizzazione cromosomica e lo status dell' imprinting di questi geni, suggeriscono la possibilità che siano coinvolti nell' eziologia della PWS. La causa della PWS è la parziale mancanza del cromosoma 15; infatti, può derivare da una delezione del cromosoma 15q11-13 paterno, da una disomia monoparentale materna oppure da un difetto dell' imprinting.

Esistono prove indirette della presenza di almeno un gene, localizzato sempre nel segmento 15q11-13, che però è espresso dal cromosoma materno. Questo è il gene che viene considerato essere coinvolto nella AS, la causa della AS è la parziale mancanza del cromosoma 15 materno: può derivare da una delezione del cromosoma 15q11-13 materno, da una disomia monoparentale paterna, da una mutazione del gene AS o da un difetto dell' imprinting. Si suppone che il gene AS mappi telomericamente rispetto al gene SNRPN, ma non e' stato ancora indentificato.

L' identificazione dei difetti dell' imprinting che portano alla PWS e alla AS, offre l' opportunità unica di dissezionare il meccanismo di imprinting nel segmento 15q11-13. Nel 50 % di questi pazienti sono stati identificate delle microdelezioni, che vengono ereditate, e che interessano una regione di poco meno di 100 kb intorno e a monte dell' esone 1 del gene SNRPN. Queste delezioni non esercitano sui geni PWS e AS soltanto un semplice effetto di posizione, ma sembrano bloccare in cis la conversione dell' imprinting paterno-materno durante la gametogenesi femminile, o analogamente, materno-paterno durante la gametogenesi maschile.

Partendo da questi risultati, gli Autori propongono che la struttura della cromatina, la metilazione del DNA e l'espressione di un gene in un dominio imprintato di 2 Mb all' interno della regione 15q11-13, siano regolati in cis da un centro di imprinting (IC), localizzato tra i geni D15S63 e SNRPN.

In questo lavoro viene dimostrato che questa regione codifica trascritti alternativi di SNRPN e che vi sono presenti mutazioni intrageniche in pazienti AS e PWS originati da fallimento della conversione dell'imprinting; e propongono un meccanismo di conversione dell'imprinting durante la gametogenesi.

Per isolare le sequenze espresse dal centro di imprinting e per selezionare cloni di cDNA fetale umano dal cervello, dal fegato e dal muscolo umano adulto, è stato usato un contiguo fagico di 160 kb compreso fra D15S63 (PW71) e SNRPN. Un clone cDNA del cervello, il bd48 (392bp), si è ibridato a parecchi frammenti EcoRI del contiguo fagico. Confrontando la sequenza del bd48 con la sequenza di questi frammenti EcoRI, è stato osservato che l' inserto contiene tre esoni nuovi (denominati: BD1B, BD2, BD3) a 27 bp dall' estremità 5' dell' esone 2 del gene SNRPN (fig.3). La distanza genomica ricoperta dal bd48 è di circa 150 kb e la direzione della trascrizione è dal centromero verso il telomero.

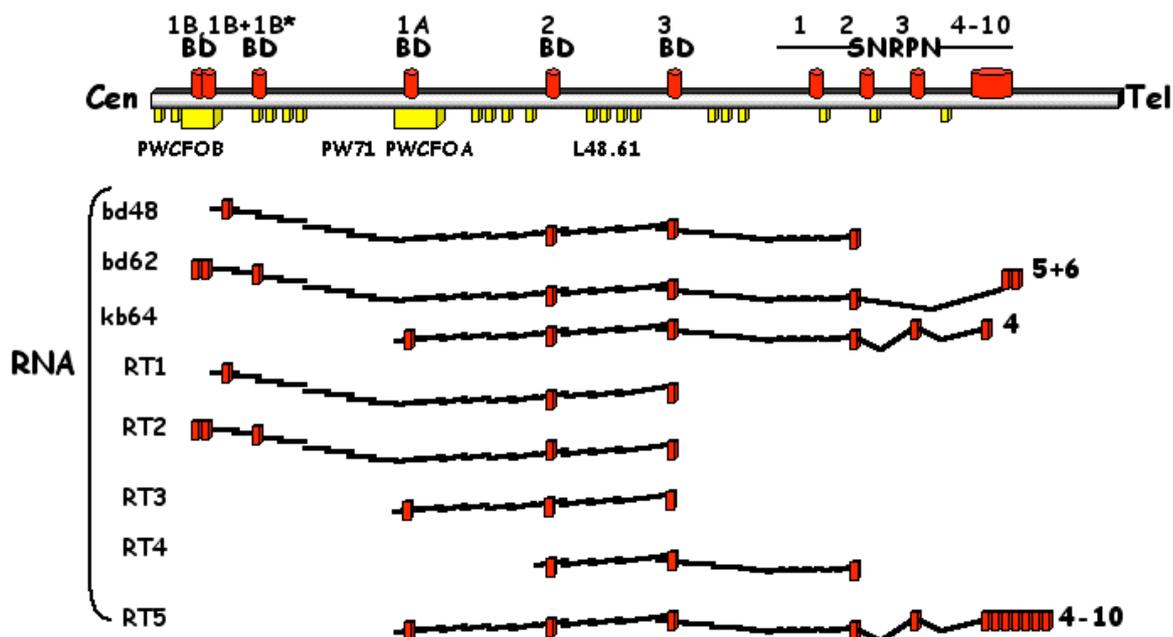


Fig.3 Mappa fisica della regione e struttura dei cDNA

Si è visto che il clone bd48 si sovrappone ad altri due cloni selezionati dall'RNA del cervello (bd62 e kb74, fig.3). Il clone bd62 contiene l'esone BD1B più 27 bp addizionali (esone BD1B'), l'esone BD1B*, l'esone BD2 e l'esone BD3, così come l'esone 2, 5 e parte del 6 dell' SNRPN. Il clone Kb74 contiene gli esoni BD1A, BD2 e BD3, come pure gli esoni 2, 3 e 4 dell' SNRPN. In tutti i trascritti BD manca l'esone 1 del gene SNRPN, ma è presente l'esone 2. Tutte le giunzioni esone/introne corrispondono alla sequenza consensus del sito di splicing, e gli esoni BD non contengono una lunga ORF (open reading frame).

La scoperta di esoni alternativi nei tre cloni di cDNA, ha fornito prove che fanno sospettare uno splicing alternativo o siti alternativi di inizio della trascrizione. Per analizzare ciò con maggiore dettaglio, è stata effettuata una (RT)-PCR su RNA di cervello fetale umano.

Usando primers specifici per BD1B e BD3, sono state ottenute due bande di 335 bp e 225 bp (RT2, RT1; fig.3): queste bande sono state purificate, riamplicate e sequenziate. Il frammento da 335 bp contiene gli esoni BD1B, BD1B*, BD2 e BD3; invece, nel frammento da 225 bp manca l' esone BD1B*. Si assume, quindi che l' esone BD1B* sia alternativo. Successivamente, adoperando un primer per l'esone BD2 (che non era presente in RT1 e RT2), si ottiene un prodotto PCR di 230 bp (RT3). Il sequenziamento ha rivelato la presenza in RT3 degli esoni BD1A, BD2 e BD3. Questi dati indicano che l'esone BD1A non è alternativo nei trascritti che iniziano con l'esone BD1B, ma è un esone 5' alternativo.

Per verificare che i trascritti BD abbiano esoni SNRPN all'estremità 3', è stata effettuata una (RT)PCR con l'RNA di cervello fetale umano con un primer che si lega all'esone BD2 e con altri primer che si legano all'esone 2 e 10 del SNRPN. Nel primo caso è stato osservato un prodotto di 245 bp (RT4, fig.3); il sequenziamento di tale prodotto, riamplicato e purificato, ha confermato che l' esone 2 dell' SNRPN si trova a valle dell' esone BD3. Nel secondo caso (RT5, fig3) non è stato ottenuto un prodotto visibile, ma ibridazioni successive con una sonda specifica per BD ed una sonda specifica per SNRPN, hanno evidenziato due bande di 1,3 kb e di 0,6 kb. Mentre risulta sconosciuta la natura del prodotto di 0,6 kb, 1,3 kb e' la misura che ci si attendeva da un prodotto (RT)- PCR che contenga l'esone BD3 legato agli esoni 2-10 di SNRPN.

Per definire le estremità 5' e 3' dei nuovi trascritti è stata effettuata la RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends (amplificazione rapida delle estremità del cDNA). Usando RNA di cervello fetale umano e primers che si legano all'esone BD2, è stato ottenuto un prodotto RACE dell'estremità 3', di 170 bp. L'analisi di sequenza ha evidenziato che tale prodotto contiene parte di BD2 e la porzione 3' dell'esone 10 di SNRPN, seguita da una coda di poli (A).

Facendo la 5' RACE con primers che si legano all' esone BD2, si può estendere la sequenza dell' esone BD1A di

78 bp; non è stato ottenuto nessun prodotto RACE che si estendesse oltre l' esone BD1B.

L'esone BD1A mappa vicino al sito *CfoI* sensibile alla metilazione, evidenziato da PW71 (D15S63). La sequenza di DNA che comprende questo sito e il BD1A (PWCFOA) condivide l' 82 % di omologia con la sequenza di DNA che comprende il BD1B (PWCFOB). L'analisi del pattern di metilazione del sito *CfoI* in PWCFOB eseguita su pazienti PWS, AS e controlli normali ha messo in evidenza la presenza di differenze (due bande di intensità analoga nei normali, una delle due bande più debole nei PWS, assenza dell'altra banda nei pazienti AS). Da questi dati si può dedurre che il sito *CfoI* materno è metilato nella maggior parte delle cellule, mentre il paterno è sottometilato tanto in PWCFOA che in PWCFOB. In sintesi si può dire che questi due trascritti vengono iniziati a livello di due siti omologhi (PWCFOA e PWCFOB) metilati in modo differenziale, che sono soggetti a splicing alternativo e che hanno gli esoni di SNRPN al loro 3'.

L'espressione del trascritto BD è stata determinata utilizzando delle sonde, prive di sequenze SNRPN, che vengono ibridate in un Northern blot con diversi tessuti umani. Nel cervello fetale umano è stato evidenziato un segnale di circa 1,7 kb, lo stesso in polmoni, fegato e reni fetali; nel cuore, nel cervello, nella prostata, nei testicoli e nelle ovaie, nell' intestino, nel colon, dell' individuo adulto. D' altra parte, non è stato ottenuto nessun segnale nell' adulto, a livello di placenta, polmoni, fegato, muscolo scheletrico, rene, pancreas, milza, timo, sangue periferico. L'espressione più forte è stata osservata nel cervello e nel cuore. La grandezza del trascritto corrisponde alla misura attesa dallo splicing degli esoni BD (365- 489 bp) con gli esoni 2-10 dell' SNRPN (1251 bp).

Per determinare se nei pazienti con PWS e AS i geni BD vengano trascritti sia dall'allele materno che paterno oppure da uno soltanto, è stato analizzato RNA da una library di cervello di individui normali (i trascritti BD non vengono espressi nei linfoblasti e quindi non si poteva esaminare direttamente il DNA dei pazienti [n.d.t.]) e utilizzato un polimorfismo BamHI per l'esone BD1B*. Con il Southern blot sono stati osservati due alleli di 10,3 kb e 7,9 kb. Nella sequenza PWCFOB, che non è metilata sul cromosoma paterno e metilata su quello materno, il sito BamHI mappa telomericamente rispetto al sito *CfoI*. Un individuo, indicato come S367/95, dei sei analizzati, è risultato eterozigote per questo polimorfismo BamHI, nell' esone BD1B*. La banda di 10,3 kb che rappresenta l'allele paterno viene completamente tagliata da *CfoI*; invece la banda di 7,9 kb è parzialmente resistente al taglio del *CfoI* e quindi rappresenta l' allele materno. Questi risultati dimostrano che il cromosoma paterno manca del sito variabile BamHI nell' esone BD1B*, che è al contrario presente sul cromosoma materno. Quando l' RNA del cervello di tale individuo è stato inversamente trascritto e amplificato con primers specifici per gli esoni BD1B e BD3, sono state ottenute due bande di 335 bp e di 225 bp (RT2, RT1; fig.3). Il frammento di 335 bp, che contiene l' esone BD1B*, è stato purificato e riamplicato: tutte le molecole mancano del sito BamHI. Ciò significa che l'esone BD1B* è trascritto solo dal cromosoma paterno.

Identificazione delle mutazioni intrageniche

Sono state studiate tre famiglie con PWS in cui era stata osservata una microdelezione dell'esone 1 dell' SNRPN che blocca la conversione dell' imprinting materno-paterno, in contrasto con altre famiglie AS in cui la microdelezione blocca la conversione paterno-materno. In cinque delle sei famiglie con AS di questo tipo è presente una delezione dell' esone BD3 (frammento L48.6I [fig.4.]), mentre la sesta indicata con AS-H, non mostra alcuna delezione dell'esone BD3, tuttavia presenta una delezione di 6 kb solo a valle del BD3. È possibile che questa delezione interferisca con lo splicing o la trascrizione del trascritto BD, ma non è possibile testare l'ipotesi per la mancata espressione di BD in tessuti disponibili dai pazienti AS.

Utilizzando SSCP e l'analisi di sequenza sono stati analizzati gli esoni BD2 e BD3 in 6 pazienti AS di famiglie in cui non era presente microdelezione. In una (AS-C2,fig.4) è stata trovata una mutazione puntiforme che altera il donor site di splicing, tale mutazione non è stata ritrovata in nessuno dei 44 controlli testati né nel padre, la madre non era reperibile per l'analisi.

Nelle famiglie con PWS il paziente aveva la delezione sul cromosoma paterno, mentre il padre e la nonna paterna l'avevano sul cromosoma di origine materna. Nelle famiglie con AS, il paziente aveva la delezione sul cromosoma materno, mentre la madre l'aveva sul cromosoma paterno.

DISCUSSIONE

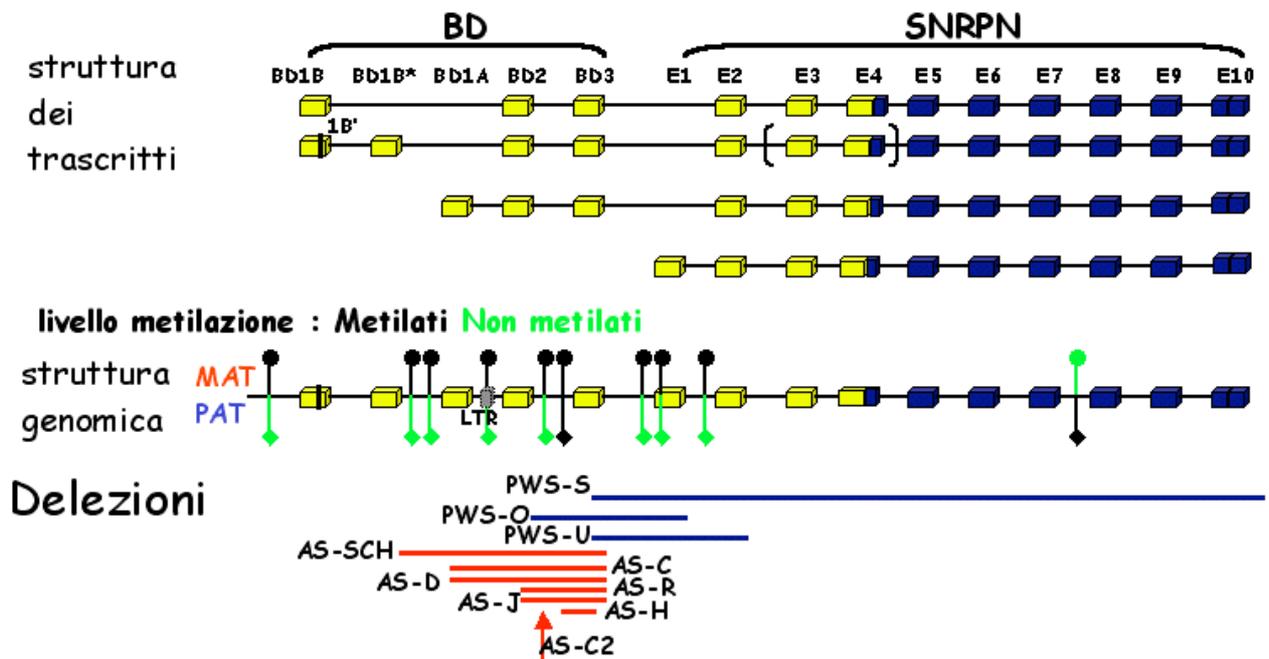
Identificazione del trascritto dal centro di imprinting

Il cromosoma 15 umano contiene un centro di imprinting (IC) che regola in *cis* attraverso un dominio cromosomico di 2Mb all' interno del cromosoma 15q11-13, la struttura cromatinica, la metilazione del DNA e l'

espressione dei geni. La presenza dell' IC era stata dedotta dall'analisi genetica di famiglie con PWS e con AS che presentano un difetto nel processo di imprinting, e hanno mutazioni in questa unita' trascrizionale.

Dallo studio condotto si puo' dedurre che la regione IC codifica dei trascritti alternativi del gene SNRPN.

Cinque delle famiglie AS con mutazione dell' imprinting studiate presentano delezioni che interessano almeno un esone BD; in particolare (fig.4):



B

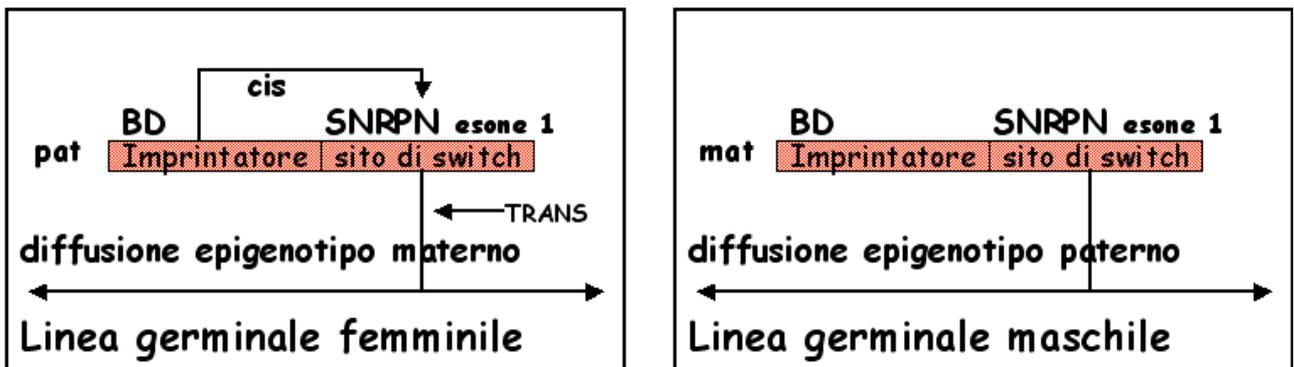


Fig.4. Struttura e funzione del centro di imprinting. **A)** Struttura dei trascritti e organizzazione genomica dell'unita' di trascrizione di *SNRPN*. I quadrati indicano gli esoni, l'open reading frame di *SNRPN* e' colorata di nero; il piccolo quadrato grigio indica un'isola LRT; gli esoni 3 e 4 del secondo trascritto sono in parentesi perche' risultano assenti nel clone bd62 (cfr.fig3). La localizzazione e l'estensione delle delezioni che bloccano la conversione dell'imprinting sono indicate come linee sotto la mappa, la fraccia indica la mutazione puntiforme trovata nella famiglia AS-C2. I cerchietti neri indicano i siti *HpaII*, *CfpI* o *NotI* metilati, i cerchietti bianchi quelli non metilati, quelli a meta' isiti metilati nel 50% delle cellule. **B).** modello per la conversione dell'imprinting.

Due famiglie (AS-R, AS-J) hanno delezioni solo nell'esone BD3, altre due famiglie (AS-C e AS-D) mostrano delezioni per BD2 e BD3, una famiglia (AS-SCH) mostra delezione per BD1A, BD2 e BD3. Un paziente ha una mutazione puntiforme (AS-C2) nel donor site, mentre in un'altro (AS-H) la delezione distale a BD3 puo' interferire con l'espressione del trascritto. In tutte le famiglie con PWS (3) l'esone 1 di *SNRPN* e' deletto.

Sebbene questi dati suggeriscano un ruolo dei trascritti alternativi dell' *SNRPN* nel processo di conversione dell' imprinting, non si è ancora in grado di calcolare la possibilità che le mutazioni colpiscano degli elementi

regolatori o dei trascritti compenetrati, ma non correlati, con il complesso di trascrizione SNRPN.

Natura dei trascritti

I trascritti BD hanno due siti di inizio alternativi e sono soggetti a splicing alternativi. I due esoni alternativi al 5' (BD1A e BD1B) sono parte di due sequenze di DNA omologhe (PWCFOA e PWCFOB), che sono metilate sul cromosoma materno e sottometilate nel paterno. Questo è vero per la maggior parte delle isole GpC con metilazione alternativa presenti nella regione IC (fig.4). È probabile che la metilazione sia coinvolta nella regolazione dell'espressione dei trascritti della regione. Inaspettatamente i due esoni BD sono esoni 5' alternativi del gene SNRPN; essi contengono delle ORF brevi che non corrispondono alla sequenza Kozak di consenso per i siti di inizio. La reading frame dell' SNRPN comincia all' esone 4 e non è influenzata dallo splicing degli esoni BD all'esone 2. Comunque il clone bd62 è privo degli esoni 3 e 4 del gene SNRPN e quindi del sito di inizio per la proteina SNRPN. Questi dati suggeriscono che i trascritti BD siano privi di un potenziale codificante. In confronto a SNRPN i trascritti BD sono espressi in meno tessuti e ad un livello inferiore. I trascritti BD sono stati principalmente trovati nel cervello, cuore, testicoli e ovaio ed è stato dimostrato (usando il polimorfismo BamH1 e lo stato di metilazione delle regioni di inizio PWCFOA e PWCFOAbB [n.d.t.] che derivano dal solo cromosoma paterno.

Un modello per la conversione dell'imprinting.

È stato mostrato che in parecchie famiglie AS delezioni e mutazioni puntiformi degli esoni BD sono associate ad un blocco della conversione dell' imprinting paterno-materno; mentre le delezioni dell' esone 1 di SNRPN sono associate ad un blocco della conversione dell' imprinting materno-paterno, in parecchie famiglie PWS. Le osservazioni compiute suggeriscono che il centro di imprinting abbia una struttura bipartita. Un qualsiasi modello che provi a spiegare la funzione del centro di imprinting deve considerare questa struttura, l'espressione paterna dei trascritti che si estendono in questa regione (assumendo che siano espressi nelle cellule della linea germinale) e l' effetto delle mutazioni dell' IC nell' ambito del cromosoma 15q11-13. Il seguente modello è compatibile con i dati ottenuti, ma bisogna sottolineare che non intende spiegare come un singolo gene sia regolato dall'epigenotipo materno o paterno del dominio cromosomico improntato, ma come possa avvenire la conversione degli epigenotipi paterno e materno durante la gametogenesi.

In questo modello, il centro dell' imprinting consiste di un imprintatore e di un sito di inizio della conversione dell'imprinting (fig.4B). L' imprintatore codifica il trascritto BD; è espresso soltanto dal cromosoma paterno e agisce in cis sul sito di inizio della conversione (esone 1 dell' SNRPN o un sito vicino), forse inducendo un cambiamento locale nella struttura della cromatina. Questo cambiamento potrebbe essere provocato dalla trascrizione oppure dall'interazione dei trascritti BD con il DNA. La mutazione di splicing trovata nella famiglia AS-C2 suggerisce che per il funzionamento sia importante il trascritto in se piuttosto che il processo di trascrizione.

Nella linea germinale XX un fattore che agisce in trans, specifico per le cellule della linea germinale femminile, è coinvolto nel completare la conversione e/o nell' iniziare la diffusione bidirezionale dell' imprinting materno sul cromosoma derivato dal padre e rende silente l' attività dell' imprintatore. Nella linea germinale XY, in assenza del fattore che agisce in trans, l' imprinting materno sul cromosoma derivato dalla madre, viene cancellato a partire dal sito di inizio della conversione ed inizia la diffusione dell' imprinting paterno. La conversione materno-paterno potrebbe avvenire per " default " oppure implicare altri fattori.

Sebbene ci siano delle valide indicazioni che il trascritto BD sia quello dell' imprintatore che avvia l' imprinting paterno-materno durante la gametogenesi femminile, il ruolo della regione deleta dell' esone 1 del gene SNRPN nelle famiglie PWS con mutazione dell'imprinting è meno chiaro. Poiché il gene SNRPN è inattivo sul cromosoma materno, la trascrizione dello stesso con scarsa probabilità avvia la conversione dell' imprinting materno-paterno durante la gametogenesi maschile. Una possibilità è che l' esone 1 dell' SNRPN rappresenti il sito di inizio della conversione dell' imprinting.

Sulla base di dati che riguardano la metilazione e la replicazione del DNA, è stato proposto che la copia paterna improntata del dominio all' interno del 15q11-13, potrebbe avere una struttura cromatinica simile all' eucromatina, dalla quale i geni PWS vengono trascritti, mentre la copia materna potrebbe avere una struttura cromatinica simile all' eterocromatina, dalla quale il/i gene/i della AS è/sono trascritto/i. È possibile che il sito di inizio della conversione rappresenti un centro di nucleazione per la condensazione e la decondensazione dell' eterocromatina, reso accessibile dal trascritto dell'IC. Questo meccanismo è stato proposto per l'azione di *Xist* nell'inattivazione del cromosoma X. Nei mammiferi non sono stati ancora identificati i siti di induzione dell' eterocromatina, ma questi sono ben conosciuti in *Drosophila*. In questa specie, il mantenimento degli schemi di espressione dei geni attivi e inattivi durante lo sviluppo, implica strutture cromatiniche più complesse.

Il modello spiega perché le microdelezioni osservate nelle famiglie con PWS e AS con mutazione dell'imprinting bloccano la conversione dell'imprinting. Nelle famiglie PWS la conversione dell'imprinting materno-paterno è bloccata a causa di una mutazione nel sito di inizio della conversione. Nelle famiglie AS la conversione dell'imprinting paterno-materno è bloccata a causa di una mutazione dell'imprintatore.

Il modello implica che una mutazione dell'imprintatore blocchi la conversione paterno-materno, ma non quella materno-paterno. Ciò è esattamente quello che è stato riscontrato nella famiglia AS-C con sindrome di Angelman. Questi risultati vengono interpretati nel modo seguente: il nonno, portatore della delezione sul cromosoma di origine materna, è in grado di effettuare la conversione materno-paterno perché quest'ultima non coinvolge i geni BD. Sua figlia (madre del paziente AS), che ha ereditato la delezione dal padre, non è in grado di effettuare la conversione paterno-materno, poiché è necessaria l'attività BD (fig.5). A prima vista può sembrare sorprendente che l'imprinting materno dipenda dall'attività del gene paterno (espressione BD). Comunque, per spiegare questo si possono immaginare diverse ipotesi.

Innanzitutto, per iniziare il processo di conversione paterno-materno dell'imprinting, è necessaria l'espressione del gene. Come accade durante l'inattivazione del cromosoma X, il cromosoma che esprime il trascritto del centro di inattivazione viene spostato da uno stato simile all'eucromatina ad uno stato simile all'eterocromatina. In secondo luogo, il meccanismo di conversione proposto si regola da sé: l'espandersi dell'imprinting materno rende silente l'attività dell'imprintatore. Al contrario, l'espandersi dell'imprinting paterno riattiva l'imprintatore. Questo è importante perché diversamente dall'inattivazione del cromosoma X, nei tessuti embrionali femminili la conversione non è casuale. Infine, il meccanismo di autoregolazione fornisce una spiegazione circa l'evoluzione dell'imprinting nel cromosoma 15q11-13. L'epigenotipo paterno sembra simile all'epigenotipo di altre regioni cromosomiche non imprintate. L'epigenotipo materno potrebbe essersi sviluppato da questo epigenotipo acquisendo gli esoni BD e i fattori trans agenti.

Questo modello è basato su dati genetici ottenuti dal mappaggio dei geni e dall'analisi delle mutazioni in famiglie AS e PWS che presentano un errore di conversione dell'imprinting. Di conseguenza tale modello non è in grado di fare previsioni a proposito del destino dell'epigenotipo paterno sul cromosoma paterno nella linea germinale maschile e dell'epigenotipo materno sul cromosoma materno nella linea germinale femminile. Per esempio, non è dato sapere se l'imprinting su questi cromosomi sia mantenuto o sia rimosso e poi ristabilito. Questo problema potrebbe essere investigato in pazienti che hanno AS o PWS dovuta ad un errore di mantenimento dell'imprinting; pazienti di questo tipo non sono stati ancora riportati.

Commento di Anne C. Fergusson- Smith

Nature Genetics 14 n.2 119-123 1996

Il lavoro di Dittrich e dei suoi collaboratori fornisce una visione più ampia del meccanismo di imprinting. Ricapitolando brevemente, l'imprinting implica l'acquisizione di segnali specifici della linea germinale, conferiti sul DNA o sulla cromatina, al momento della fecondazione, o immediatamente dopo, inducendo un'attività differenziale dei due alleli parentali. È importante che l'imprinting venga cancellato nella linea germinale affinché possano essere acquisiti nuovi imprinting specifici dei genitori. Errori nella linea germinale, che bloccano il cancellamento dell'imprinting, impedirebbero agli omologhi di acquisire l'epigenotipo materno o paterno e di influenzare l'attività dei geni imprintati.

Il lavoro di ricerca di Dittrich e altri, sull'analisi delle mutazioni PWS / AS che colpiscono il processo di imprinting della linea germinale, ha reso possibile l'identificazione di una regione, che è stata definita centro di imprinting (IC), e che regola in cis l'imprinting appropriato di un dominio di 2 Mb, associato ad entrambi le sindromi, che contiene parecchi geni imprintati, compreso il gene SNRPN espresso paternalmente. Le mutazioni dell'IC ereditate dal padre impediscono alla linea germinale XY di compiere la conversione materno-paterno e provocano una ritenzione dell'epigenotipo materno (fig.6 generazione II e III).

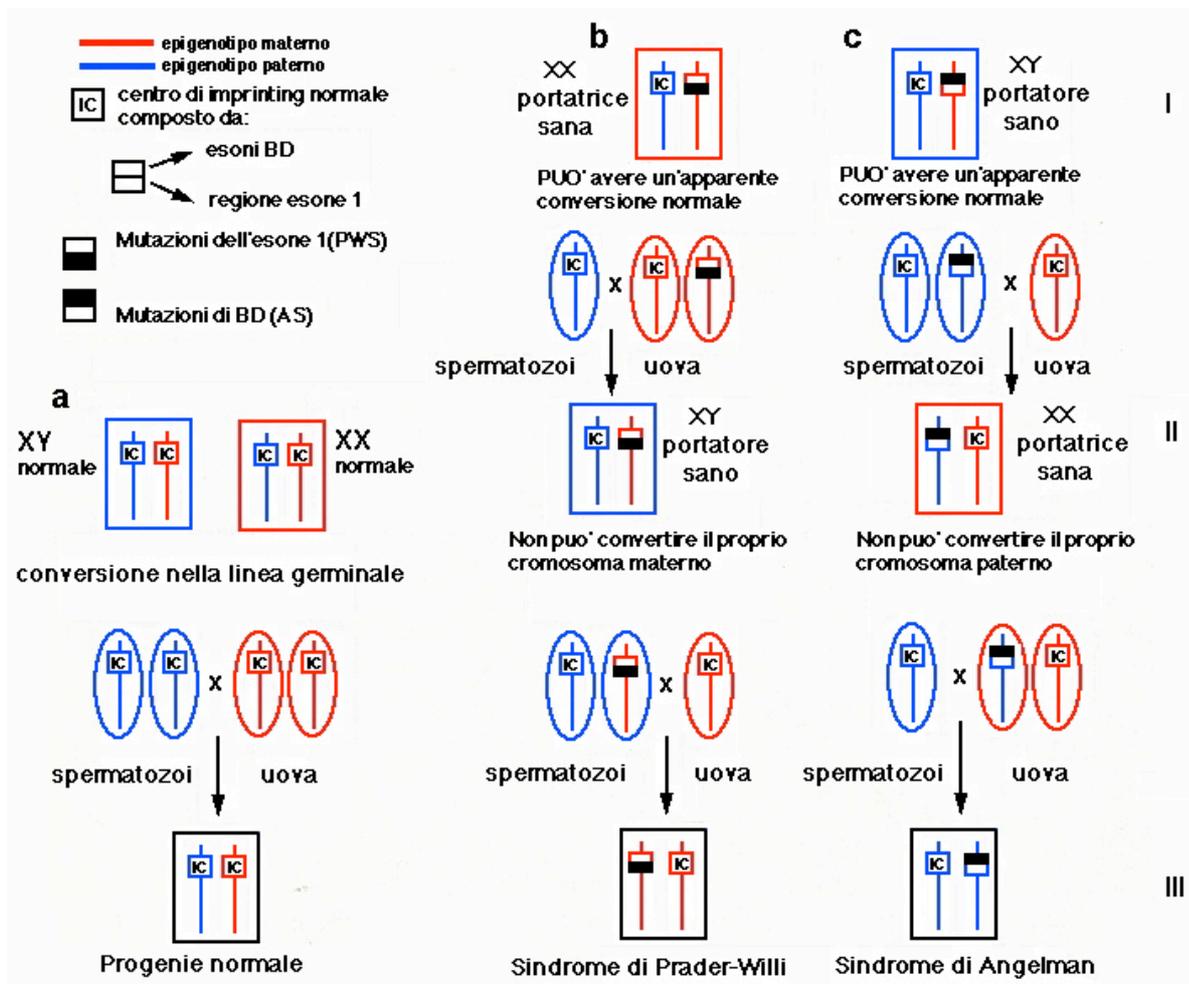


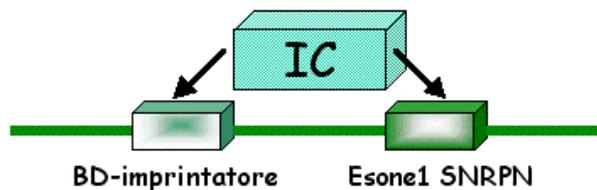
Fig.6. Rappresentazione schematica dell'azione del centro di imprinting IC nelle linee germinali normali (a), nel caso di mutazioni PWS (b), nel caso di mutazioni AS (c). Le generazioni sono indicate sulla destra.

La prole che eredita questo cromosoma non "convertito" dal padre, avrà due epigenotipi materni e di conseguenza la PWS. Nella linea germinale XX le mutazioni dell'IC impediscono al cromosoma paterno di acquisire un epigenotipo materno e quindi la prole ha due epigenotipi paterni e di conseguenza la AS (fig.6 generazioni II e III). I dati ottenuti da Dittrich e altri mostrano con chiarezza che gli esoni BD sono richiesti per una conversione paterno-materno (linea XX) e l'esone 1 di SNRPN è richiesto per lo conversione materno-paterno (linea XY), a suggerire una struttura bipartita dell'IC.

Con questo scenario in mente, piuttosto complesso, questi autori propongono un modello per spiegare come due diverse regioni permettano la acquisizione di un epigenotipo materno o paterno a seconda della linea germinale attraverso cui passano. Secondo questo modello, che assume l'espressione solo paterna di SNRPN, nella linea germinale XX per attivare il cromosoma paterno è richiesta l'attività di un imprintatore (codificato dai geni BD) che interagisce con l'esone 1 di SNRPN; ciò rende il cromosoma accessibile ad un fattore sesso-specifico che agisce in trans responsabile dell'acquisizione dell'epigenotipo materno. In questo modello il cromosoma ereditato dalla madre mantiene l'epigenotipo materno. Nei soggetti con AS, poiché gli esoni BD sono mutanti, l'imprintatore non opera sul cromosoma paterno e di conseguenza il fattore che agisce in trans non ha accesso su tale cromosoma e la conversione paterno-materno è bloccata.

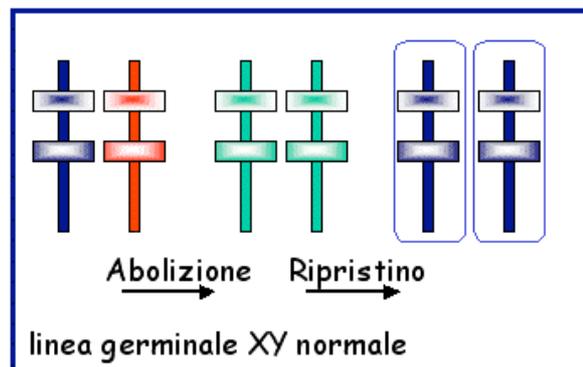
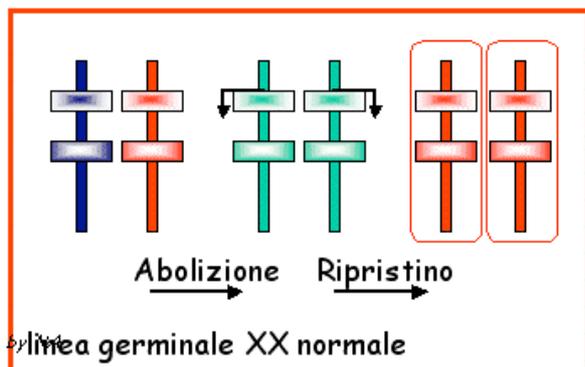
Nella linea germinale XY in assenza del fattore che agisce in trans l'epigenotipo paterno è mantenuto e che anche in assenza di attività di BD, il cromosoma materno acquisisce l'epigenotipo paterno per "default". Nei soggetti con PWS la mutazione dell'esone 1 di SNRPN non permetterebbe al cromosoma materno l'acquisizione dell'epigenotipo paterno, suggerendo un coinvolgimento dell'esone 1 nel mantenimento di default".

Un'altra possibilità è che in PWS non vi sia il cancellamento dell'imprinting e l'esone 1 dell'SNRPN sia coinvolto anche nella cancellazione. Infatti nel topo esistono prove di un meccanismo che implica sia la cancellazione sia il ristabilirsi di nuovi imprinting nella linea germinale: il gene *Snrpn* murino è espresso biallelicamente nelle cellule germinali. Sarebbe possibile ipotizzare un modello a due steps (fig.7)

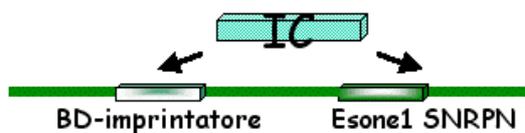


Tre passaggi sono necessari:

- 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

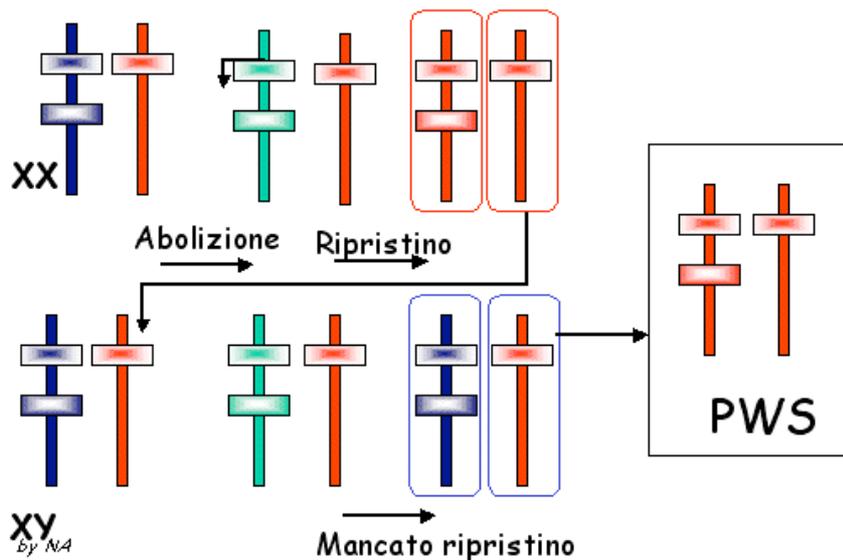


Famiglia Prader-Willi



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



Le mutazioni dell' esone1 non cancellano l'imprinting sia in XX che in XY

In XX e' irrilevante dal momento che comunque hanno epigenotipo mat

In XY saranno incapaci di convertire

Famiglia Angelman

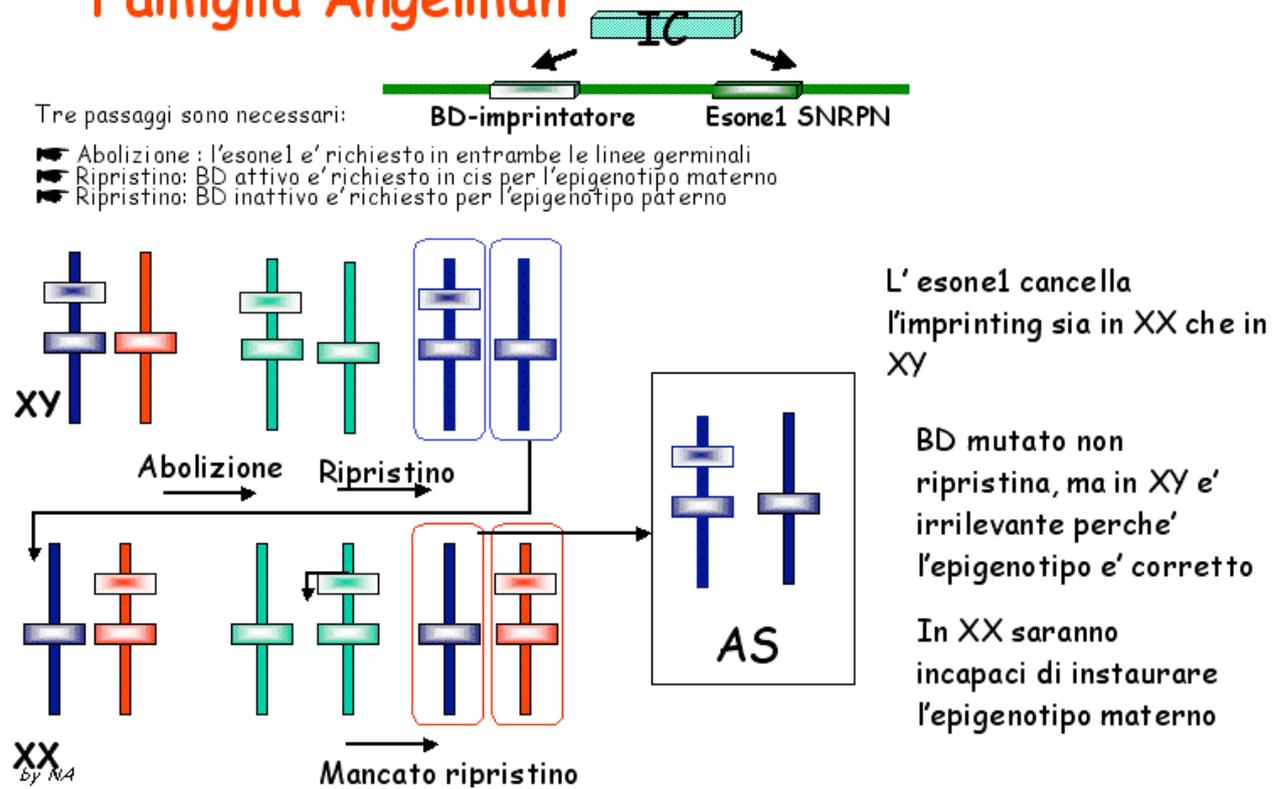


Fig.7. Ipotetico modello a due fasi: 1) Abolizione e 2) ripristino : l'esone1 viene coinvolto nell'abolizione dell'imprinting piuttosto che nella diffusione dell'imprinting.

secondo il quale l' esone 1 di SNRPN deve cancellare il precedente imprinting ed in un secondo momento deve intervenire l' imprintatore, il quale nella linea germinale XX interagisce con l' esone 1 per l' acquisizione dell' epigenotipo materno. Nella linea germinale XY, per l' acquisizione dell'epigenotipo paterno è necessaria l'assenza dei BD. Nella PWS l' esone 1 è mutato per cui non può cancellare l'imprinting esistente, sia nella linea germinale femminile che maschile. Tuttavia, nella linea germinale XX le mutazioni ereditate dalla madre non hanno importanza perché avranno un epigenotipo materno. Nella linea germinale XY ciò comporta l' impossibilità di conversione. Il centro di imprinting sul cromosoma 15 si supponeva unico ma di recente la scoperta di variazioni dell' imprinting nella Sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS), suggerisce che possa esistere un centro di imprinting anche sul cromosoma 11.