

# Epigenetica ed epigenoma

Elena Battaglioli

CusMiBio

22 Settembre 2014



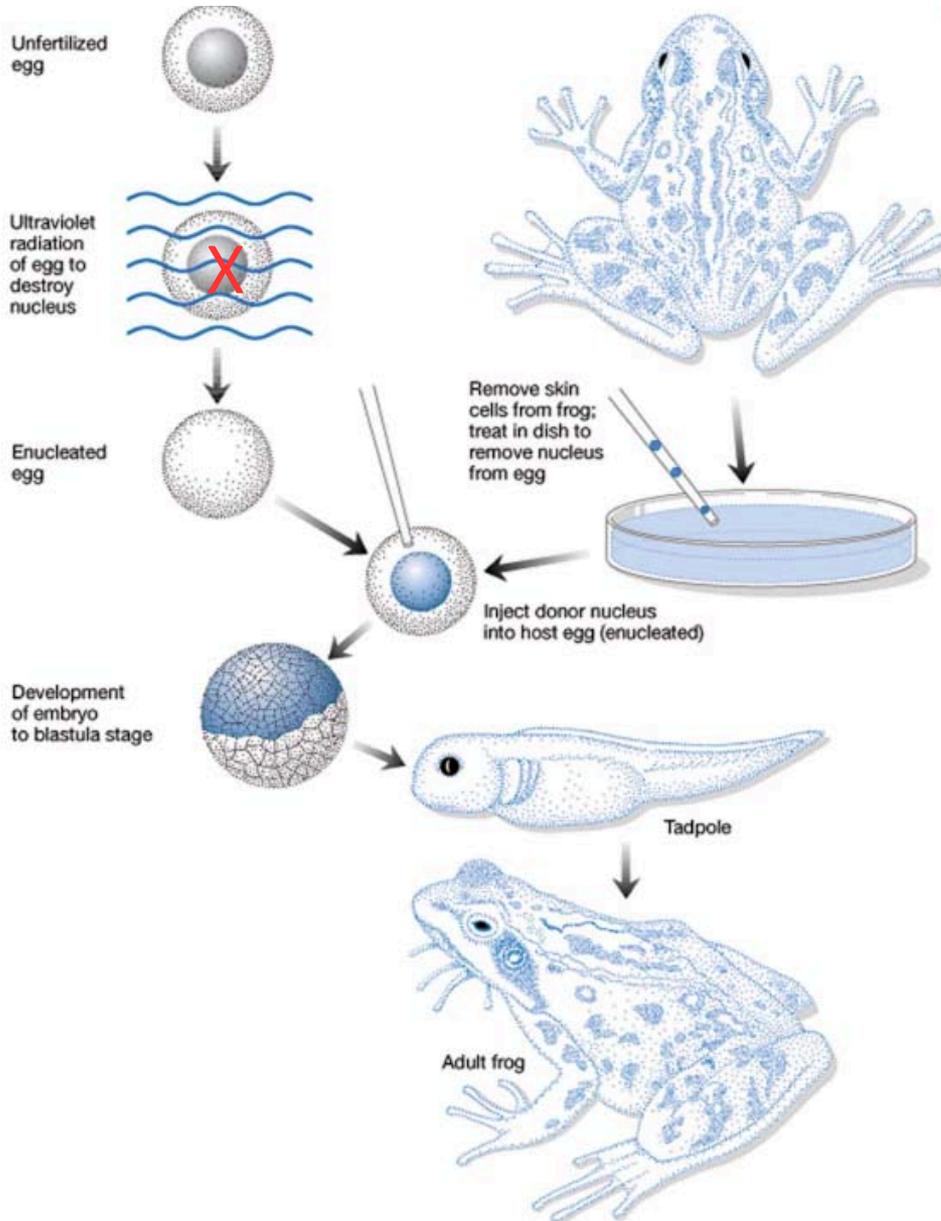
Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine  
School of Medicine  
University of Milan



uovo accettore

nucleo donatore

# Esperimento di John Gurdon, 1960



Una delle ipotesi sul meccanismo di sviluppo e differenziamento era che vi fosse perdita di materiale genetico ossia di DNA- John Gurdon dimostra nel 1960 che da cellule somatiche di anfibio, è possibile riottenere un embrione ed un individuo adulto identico.

Quindi il differenziamento non è dovuto a perdita di materiale genetico bensì a come viene letta e interpretata dell'informazione contenuta nel DNA:

Il controllo dell'espressione genica

# Epigenetica

Epi in greco επι = sopra



Conrad Waddington, 1942

*C. Waddington*

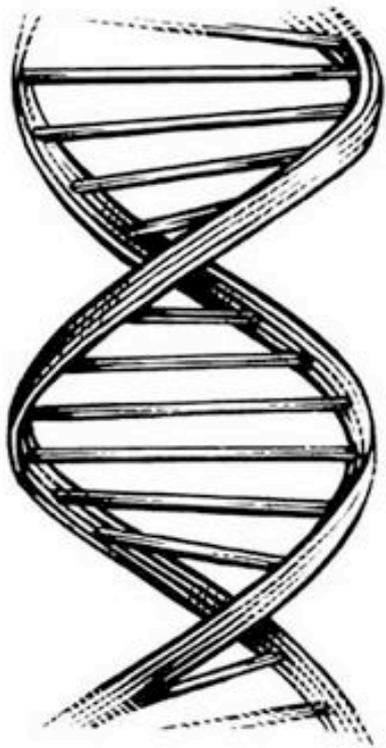
Nature Reviews | Genetics

L'epigenetica è quell'aspetto della biologia che vuole studiare la relazione causale tra i geni ed i loro prodotti cioè le proteine.

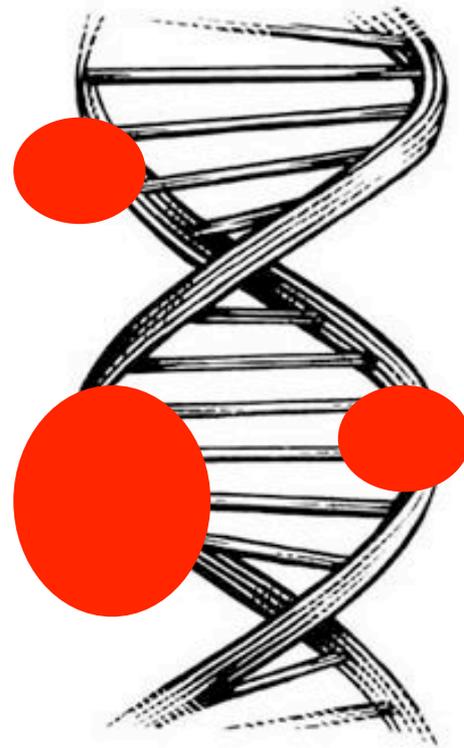
Una possibile definizione di epigenetica è “la serie di modificazioni al materiale genetico che cambia il modo in cui i geni vengono accesi o spenti ma non altera i geni in sé”.

# Epigenoma

GENOMA = DNA



EPIGENOME = sopra al DNA



Quale è l'effetto dell'epigenoma sul genoma?

# Usare gli origami per spiegare l'epigenetica

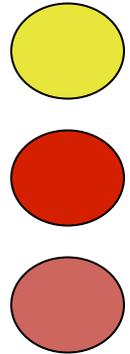
(N. Brockdorff, Oxford UK)



1 genoma

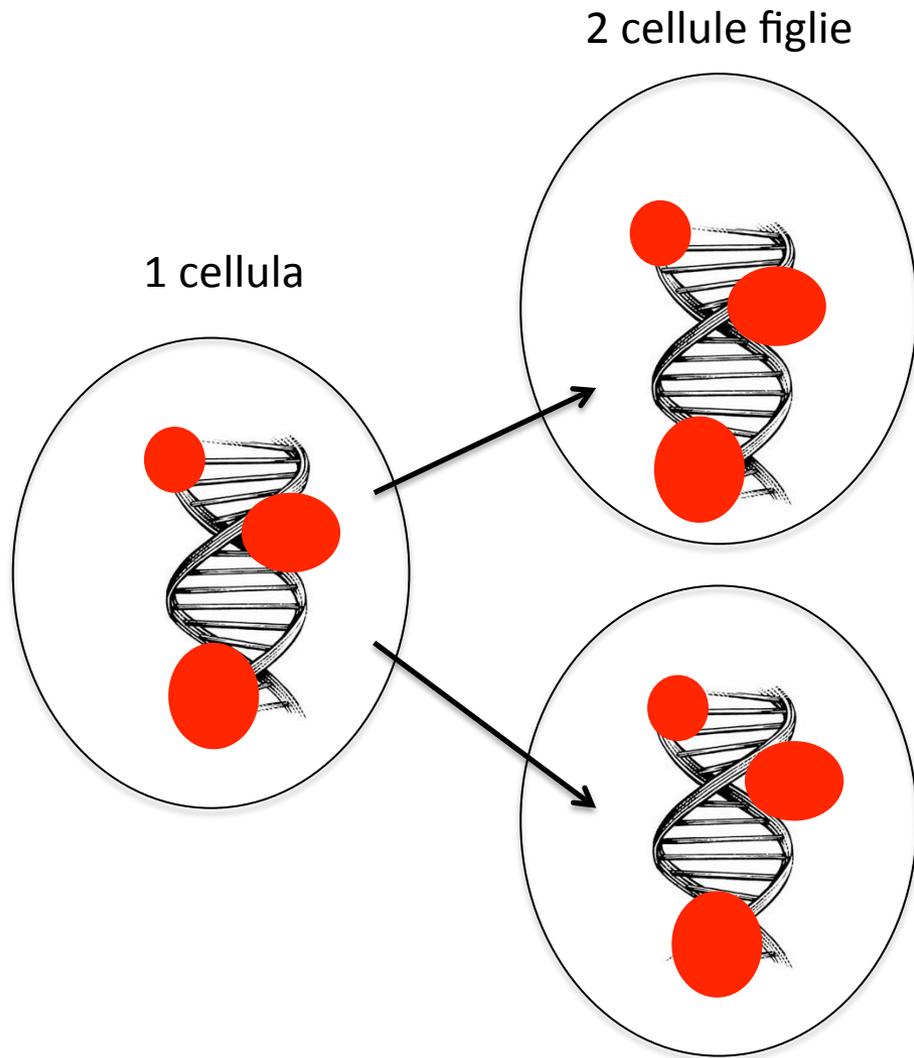


“n” epigenomi



Tutte le cellule di un organismo hanno lo stesso genoma  
Tuttavia, differiscono l'una dall'altra perché hanno un epigenoma diverso

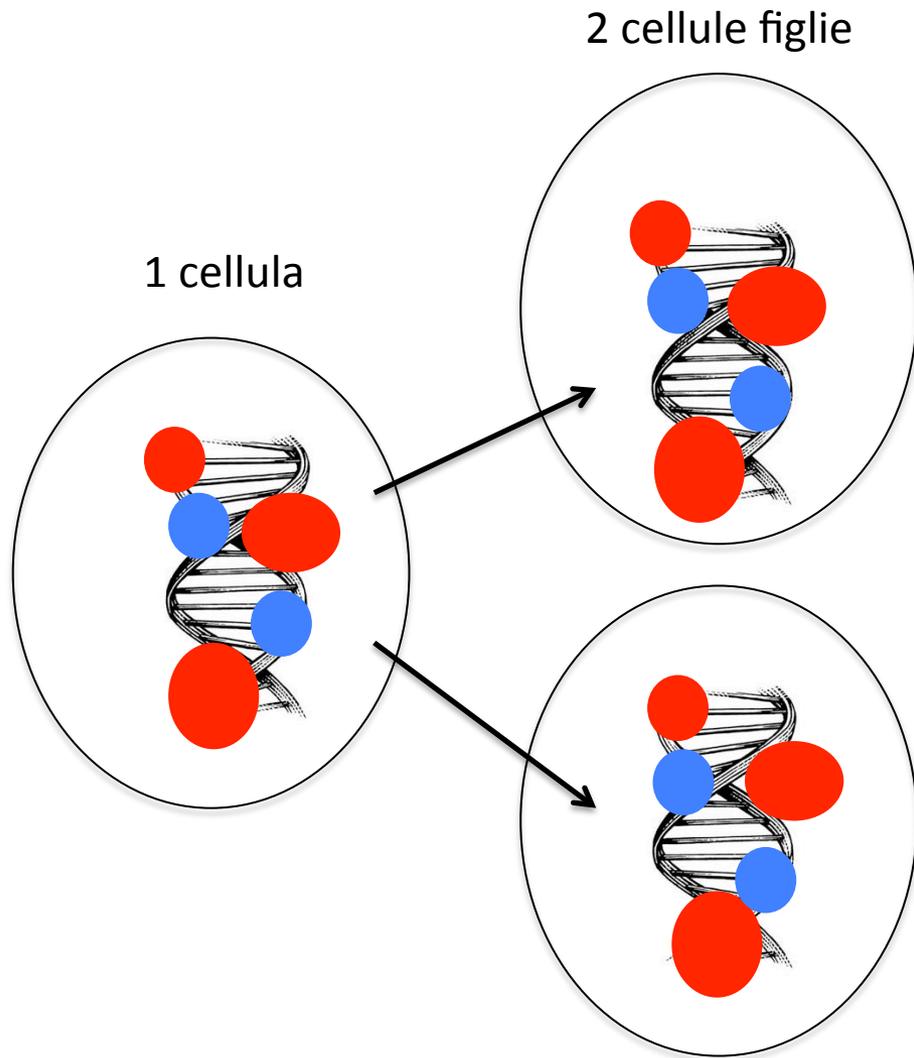
# Memoria epigenetica



Cellula epatica

# Memoria epigenetica dell'identità cellulare

# Memoria epigenetica



Cellula epatica



# Memoria epigenetica delle esperienze vissute

# Epigenetica e “ambiente”

Stress comportamentale

Metalli pesanti

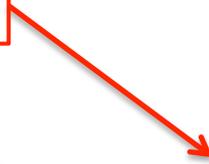
Inquinanti e pesticidi

Fattori nutrizionali

Alterazioni  
del pattern  
epigenetico

Alterazione  
dell'espressione  
genica

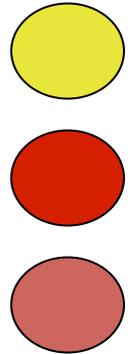
Patologia



1 genoma



“n” epigenomi



Tutte le cellule di un organismo hanno lo stesso genoma  
Tuttavia, differiscono l'una dall'altra perché hanno un epigenoma diverso

Ruolo dell'epigenetica in cellule che non si dividono.....

## PLASTICITA' NEURONALE

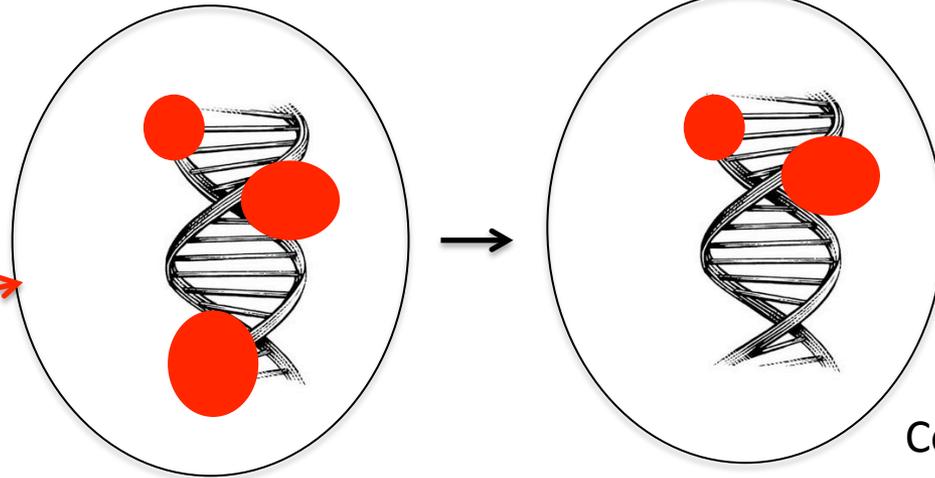
Neurotrasmettitori

Attività sinaptica

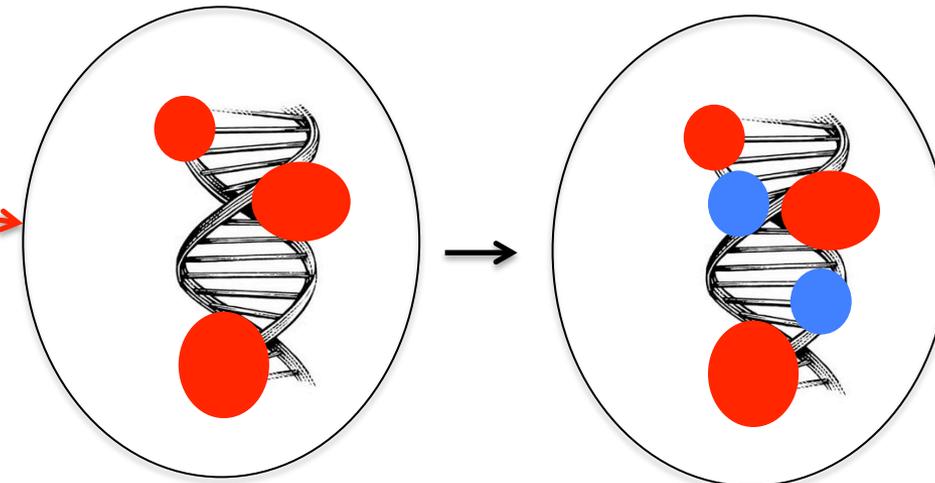
Metabolismo

Stimoli ambientali

Stress



Comportamento  
Linguaggio  
Memoria e apprendimento

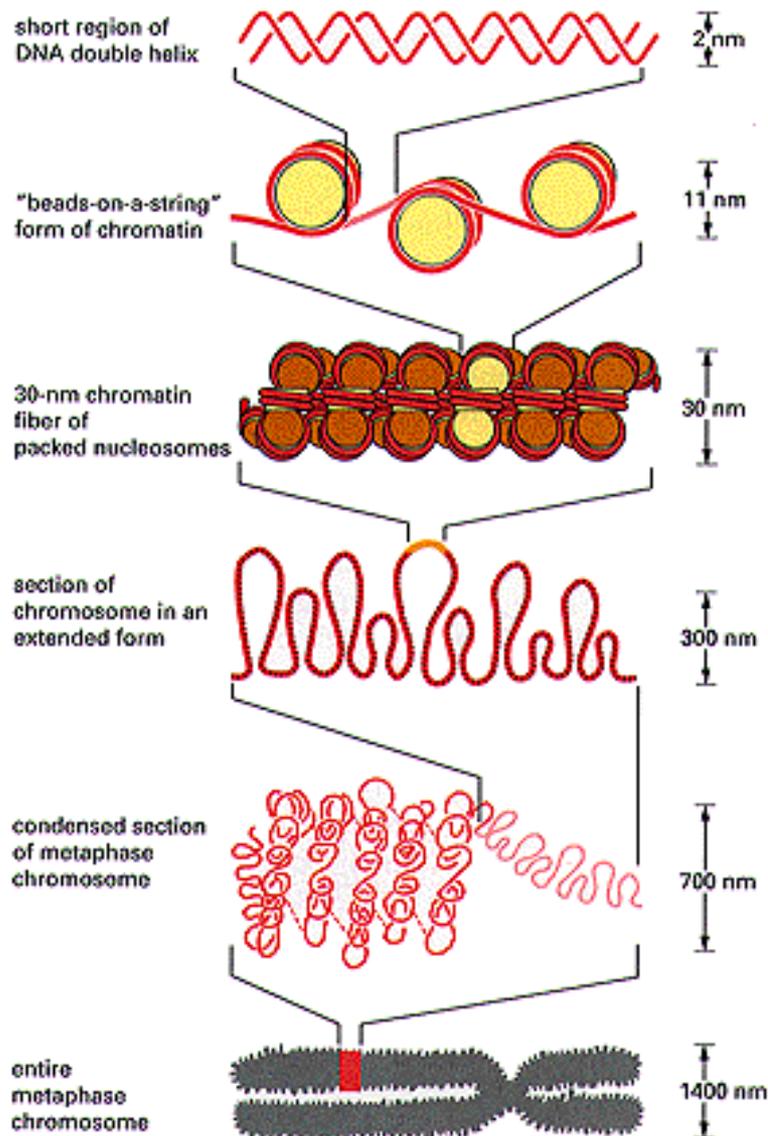


Patologie

# Memoria epigenetica delle esperienze vissute

# I MECCANISMI EPIGENETICI REGOLANO L'ESPRESSIONE GENICA

# La cromatina viene ulteriormente compattata nel cromosoma metafasico

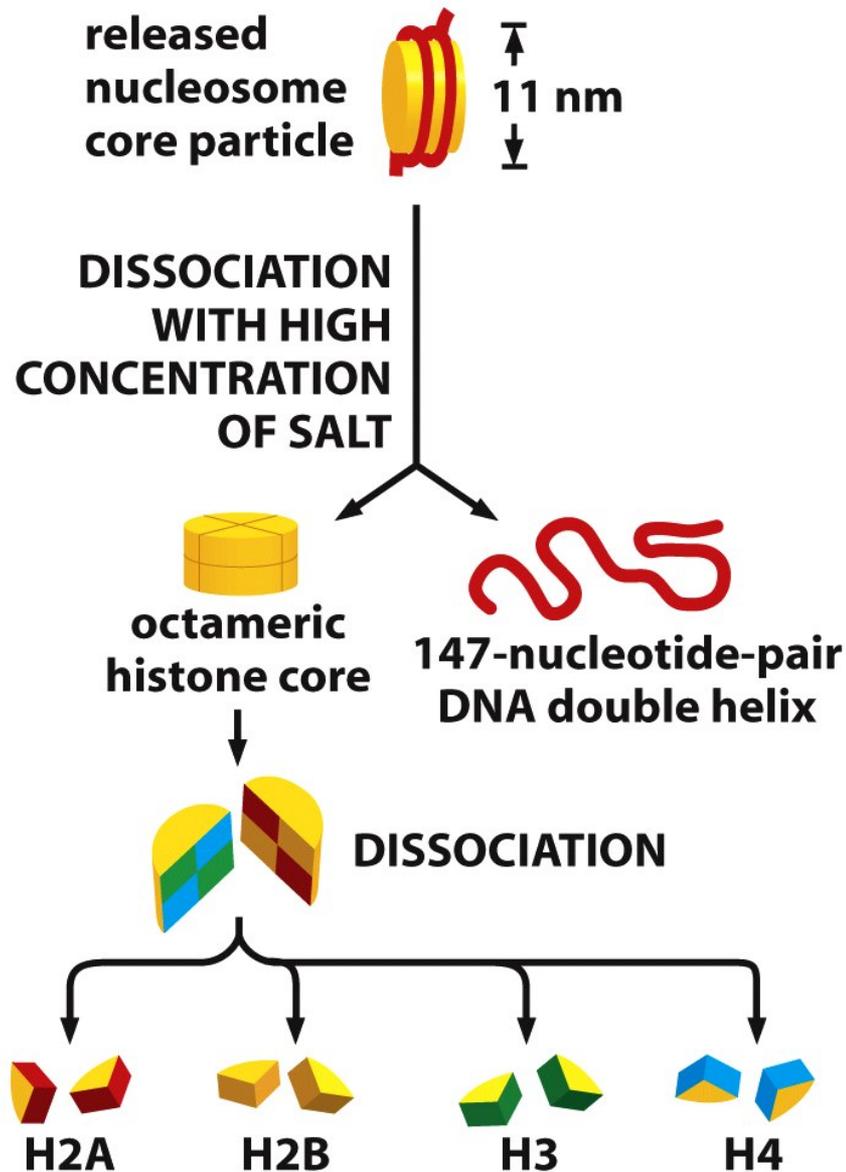


2 metri di DNA

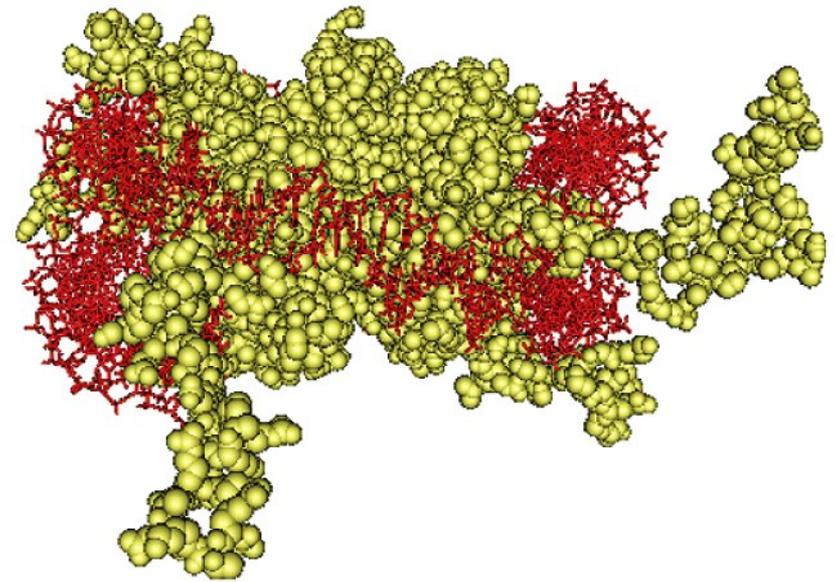
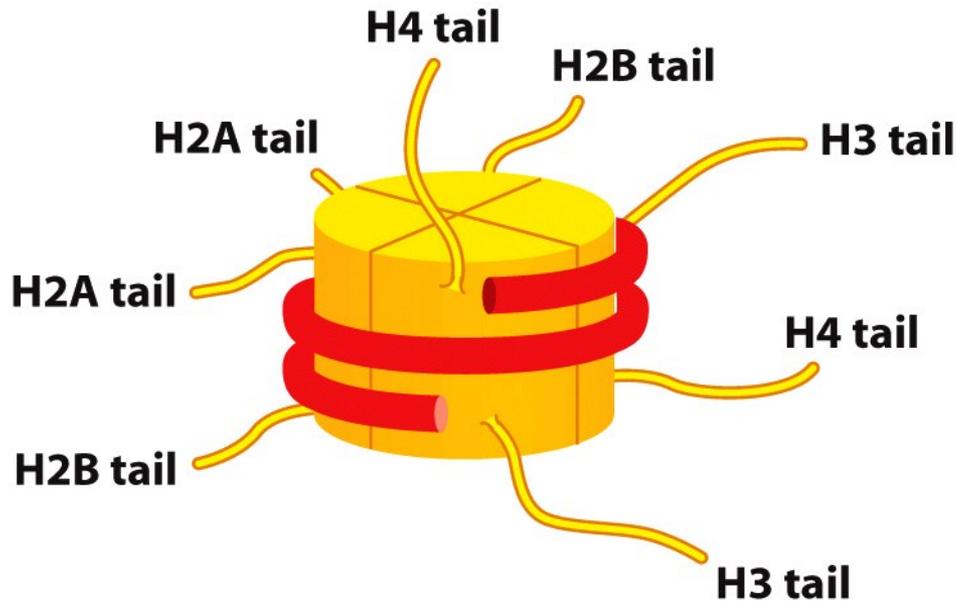
più compatto

10 micrometri

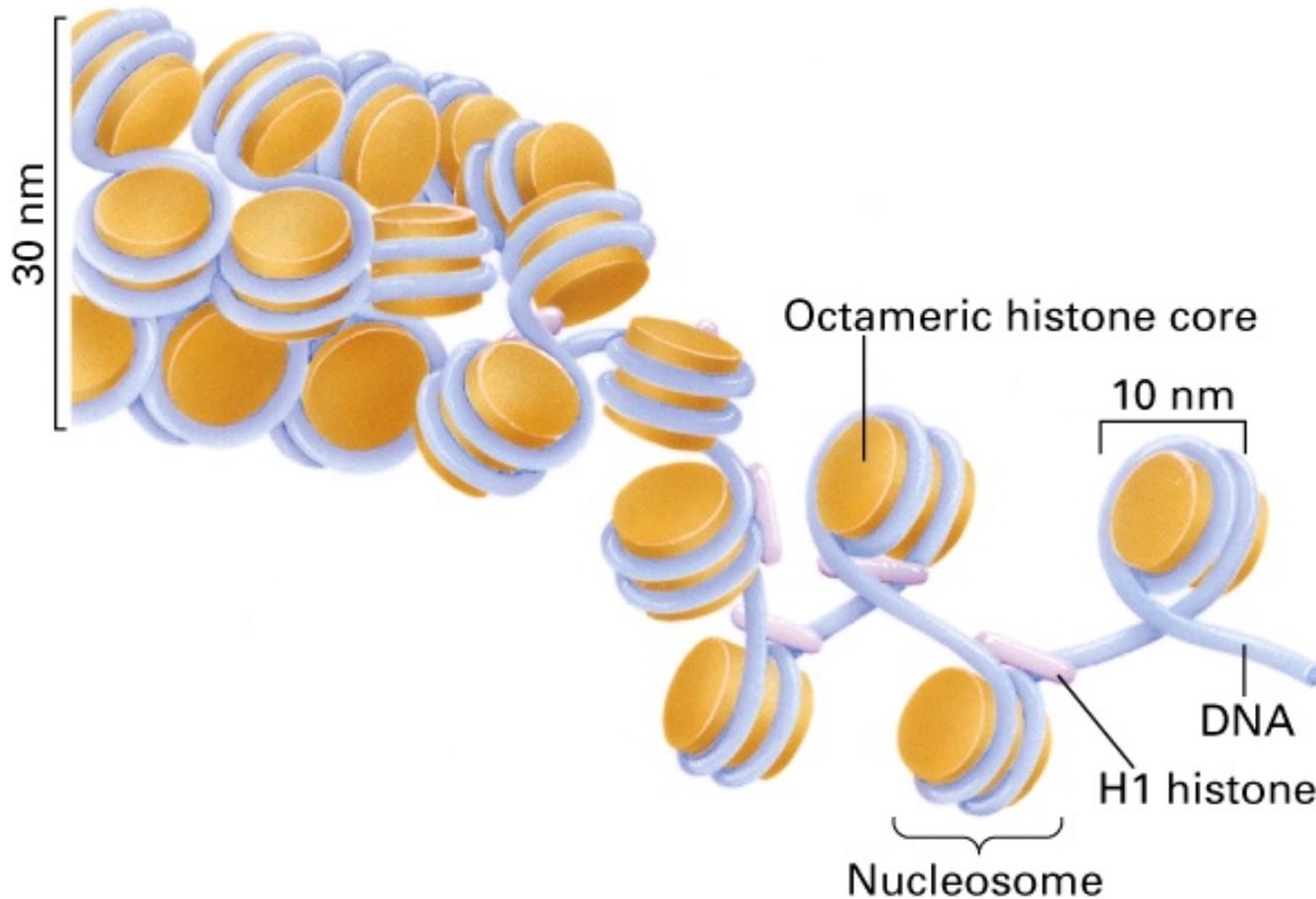
# II NUCLEOSOMA è l'unità strutturale dell'EPIGENOMA



# IL NUCLEOSOMA è l'unità strutturale dell'EPIGENOMA



# Il modello “a solenoide” della cromatina condensata (fibra da 30 nm)



La struttura della cromatina viene modulata da:

## **1- MODIFICAZIONI A CARICO DEGLI ISTONI:**

- **Modificazioni covalenti**

Acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione

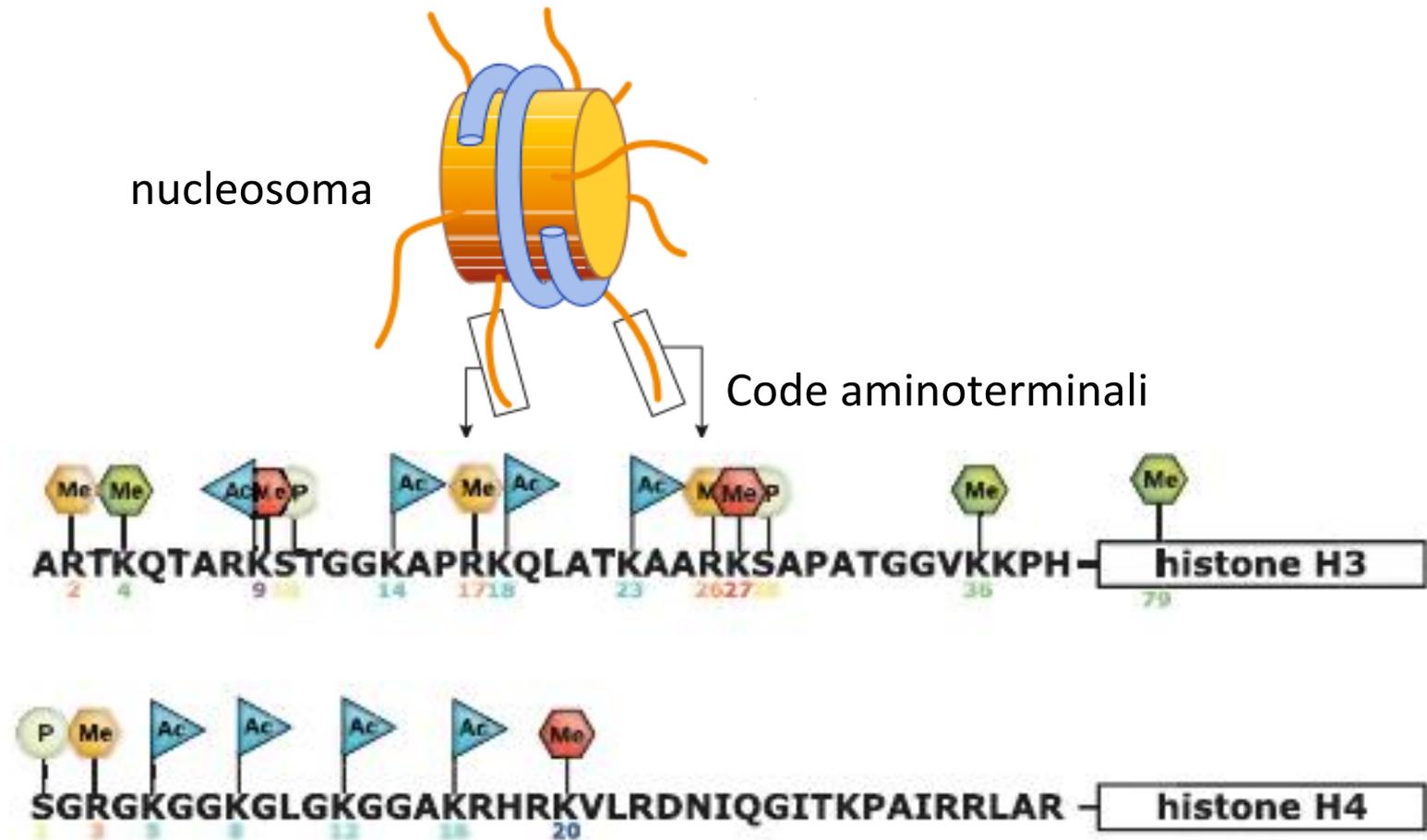
- **Modificazioni ATP dipendenti**

modificazioni che richiedono idrolisi di ATP e che non alterano la composizione chimica della cromatina

## **2-METILAZIONE del DNA**

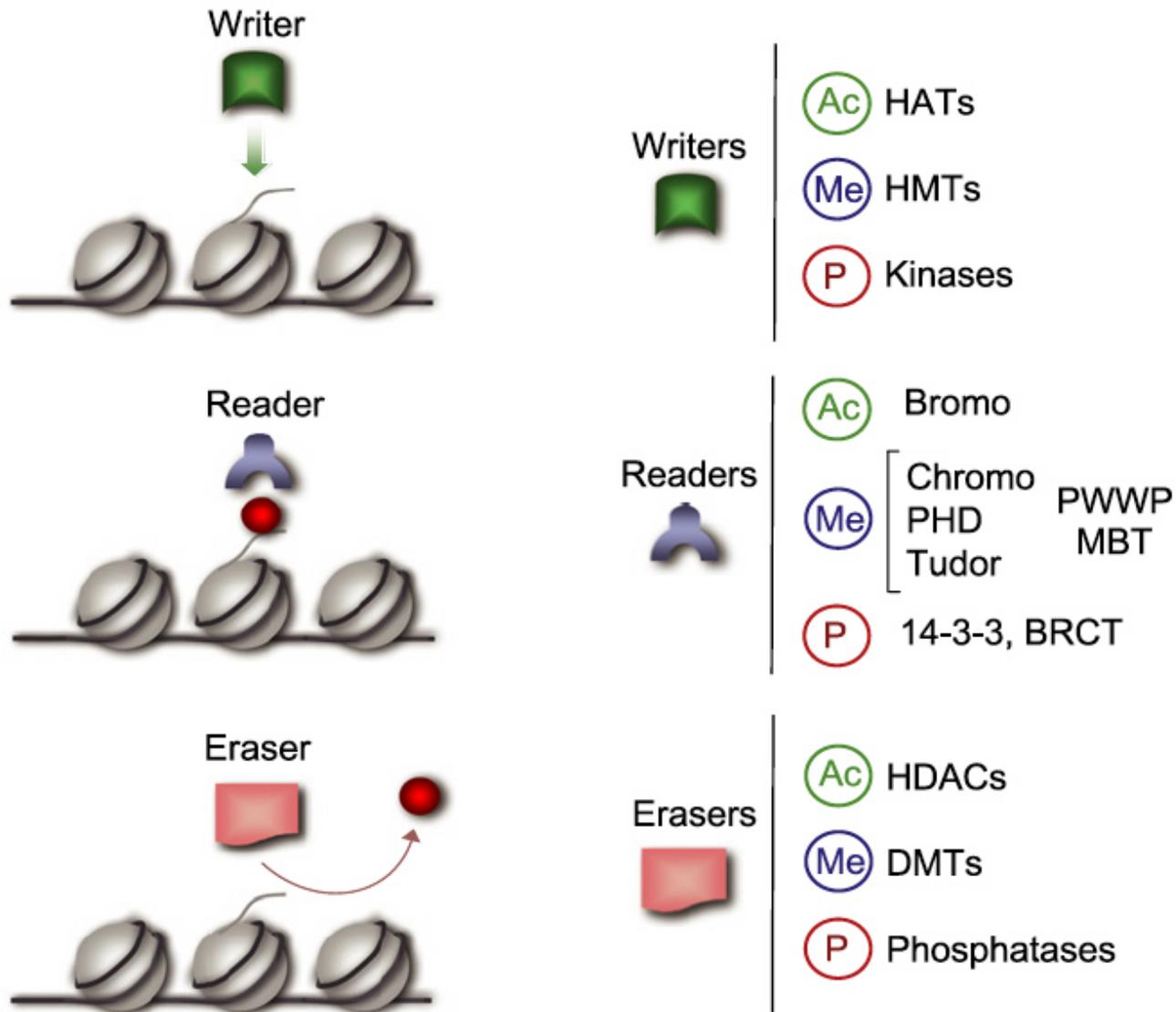
# Modificazioni covalenti degli istoni

- Le code N-terminali dei quattro istoni sono altamente conservate nella loro sequenza e svolgono funzioni cruciali nella regolazione della struttura della cromatina.
- Le modificazioni avvengono principalmente sulle code N-terminali degli istoni H3 e H4

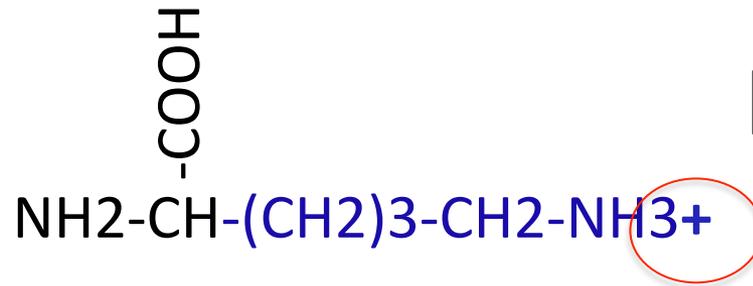


Acetilazione, metilazione, fosforilazione, sumoilazione.

# The players



# Modificazioni covalenti degli istoni: acetilazione ed enzimi coinvolti



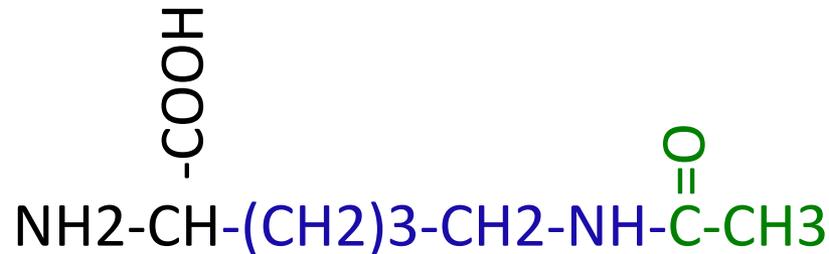
lisina

**HAT**

**HDAC**

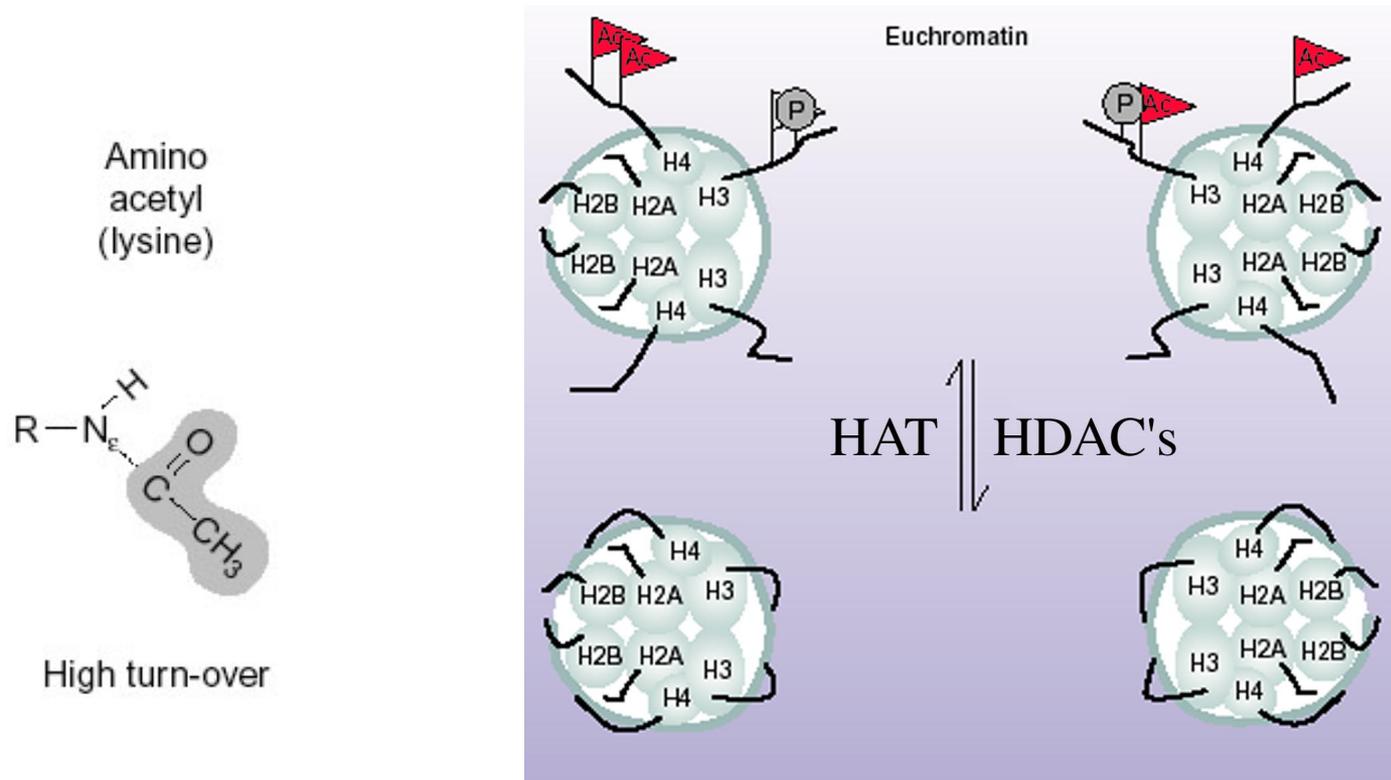
Histone **D**eacetylase

Histone **A**cetyl **T**ransferase



acetil lisina

# Modificazioni covalenti degli istoni possono influenzare profondamente la cromatina.



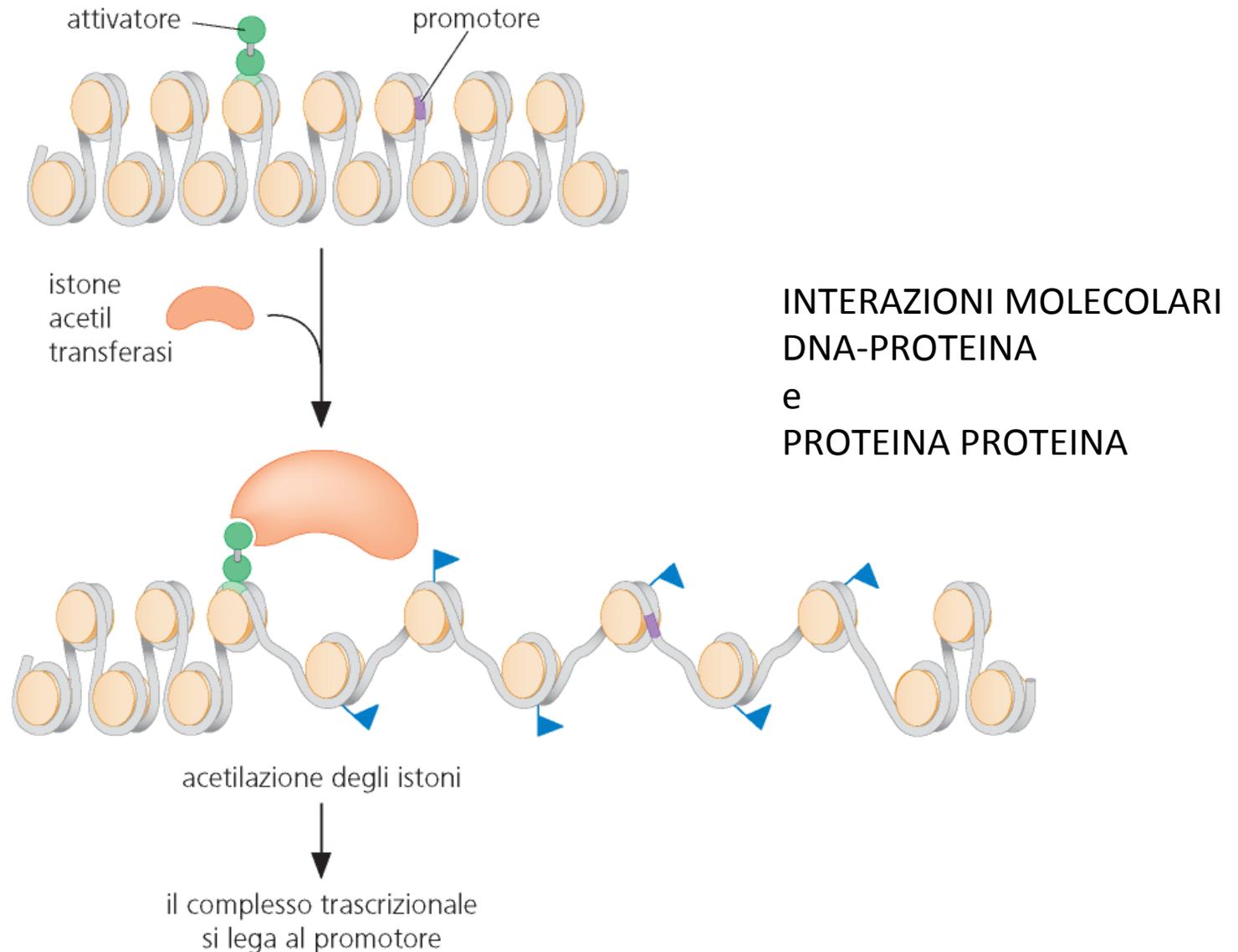
# Acetilazione

avviene su alcune lisine (Lys o **K**) delle code amino (N) terminali di isote H3 ed H4



Come vengono indicate: H3K9Ac, H9K5Ac  
(nome dell'istone, numero del residuo, modificazione)

# Modificazioni covalenti degli istoni: effetto dell'acetilazione



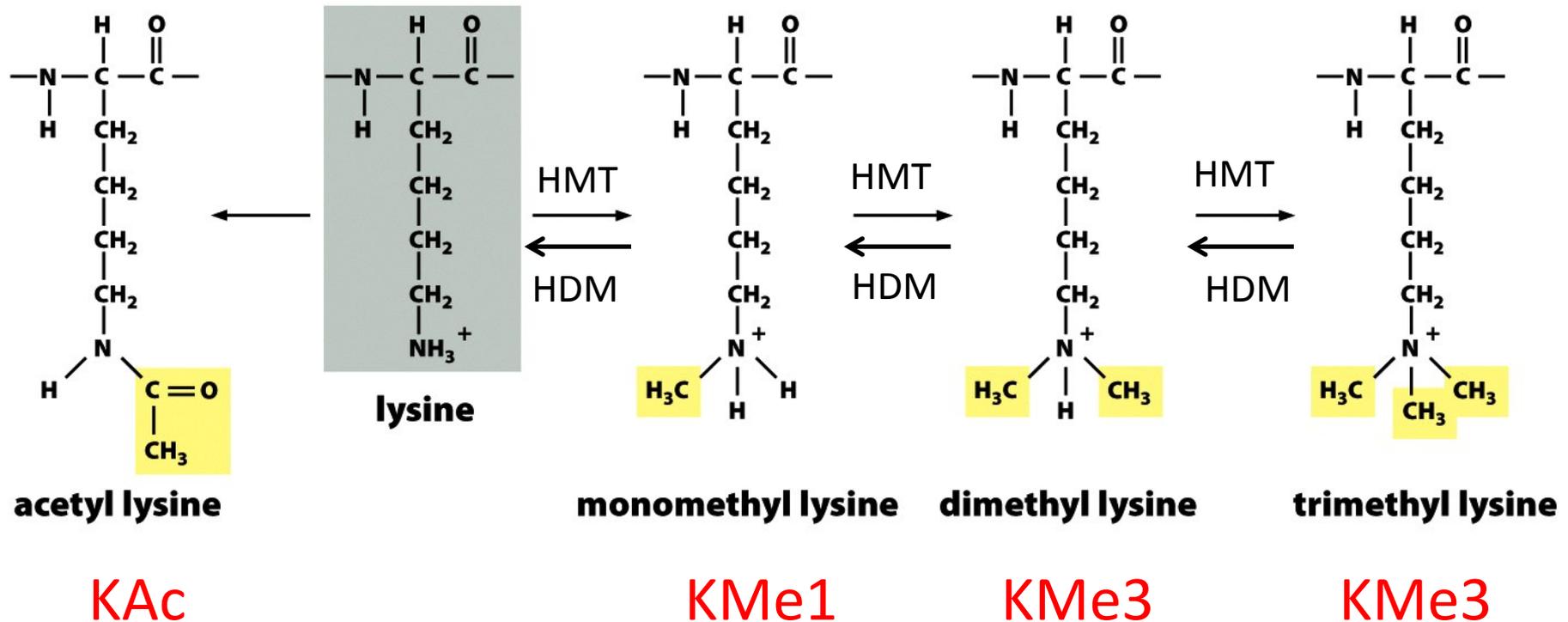
# Modificazioni covalenti degli istoni: metilazione ed enzimi coinvolti

avviene su alcune lisine (Lys o **K**) e su alcune arginine (Arg o **R**) delle code amino  
(N) terminali degli istoni H3 ed H4



Come vengono indicate: H3K4Me(1, 2 o 3), H4K20Me (1,2 o 3)  
(nome dell'istone, numero del residuo, modificazione)

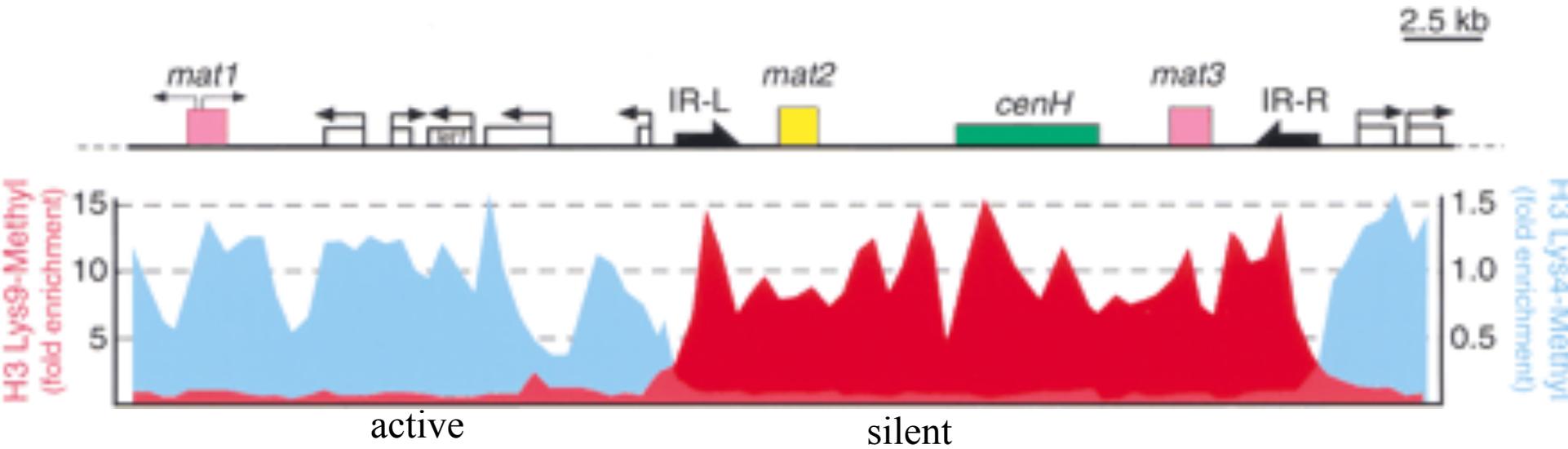
Una lisina (Lys, K) può essere mono-, di- or tri-methylated



**HMT**= HISTONE METHYL-TRANSFERASE

**HDM**= HISTONE DEMETHYLASE

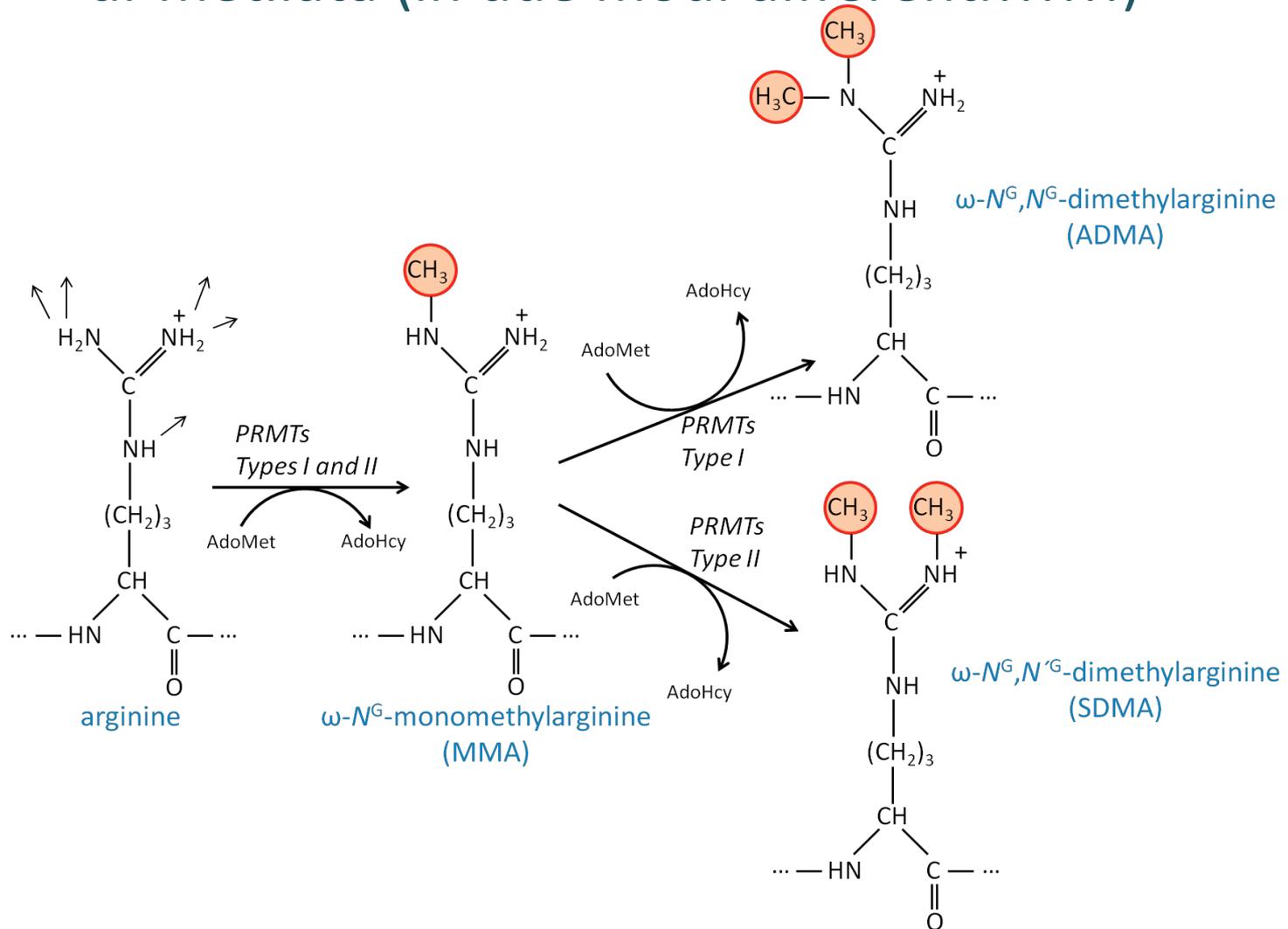
Metilazione della Lys4 e della Lys9 hanno significato funzionale opposto:  
H3K4metilata è associata a geni attivi  
H3K9metilata è associata a geni silenti



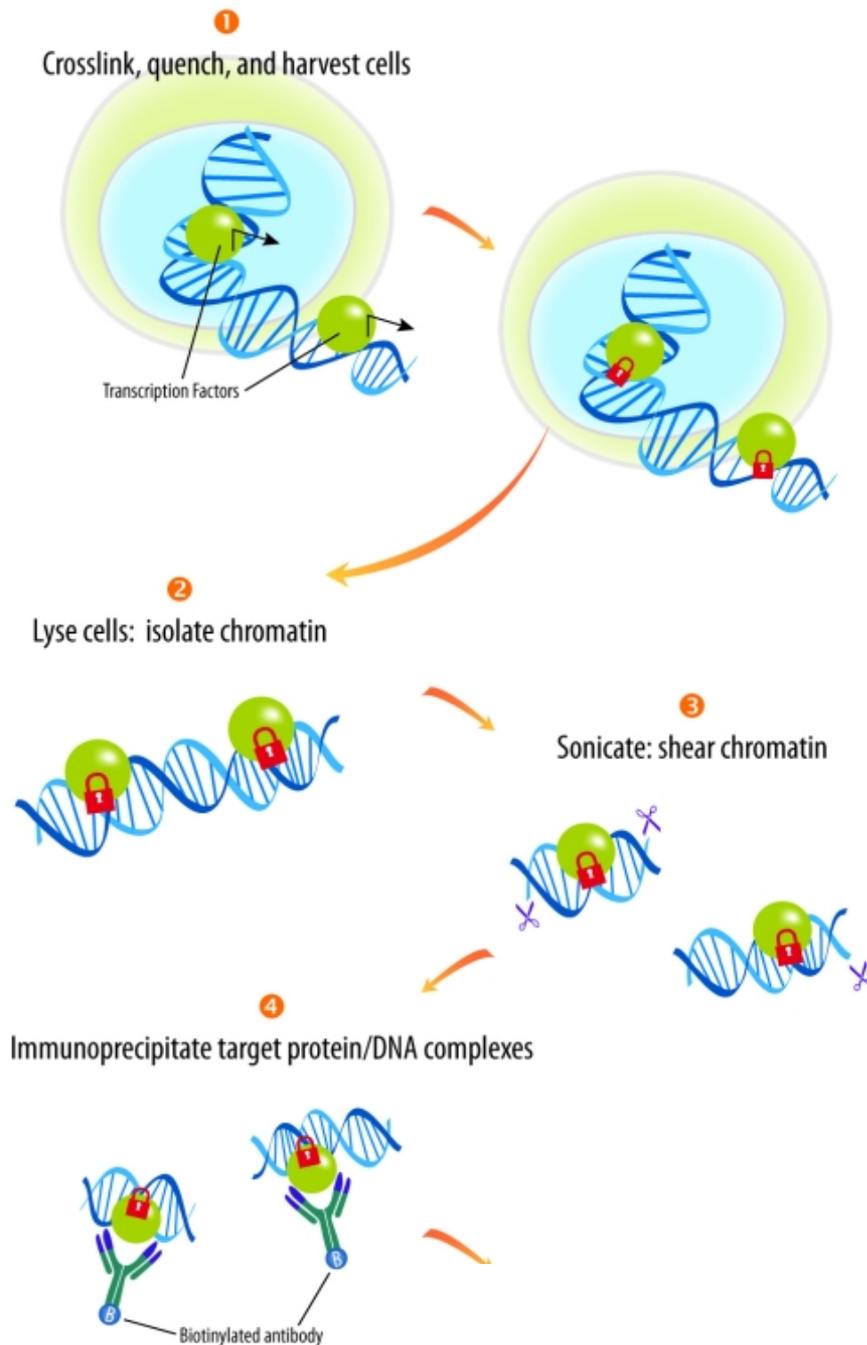
H3 K9 methylation and K4 methylation are non-overlapping

Mating loci in *S. pombe*

# Una arginina (Arg, R) può essere mono- o di-metilata (in due modi differenti!!!!!!)



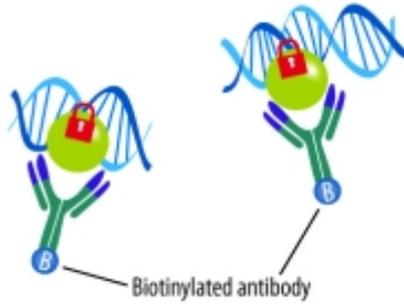
Protein arginin methyltransferase tipo I e tipo II



COME SI STUDIANO  
LE MODIFICAZIONI  
COVALENTI  
DELLA CROMATINA

ChIP  
IMMUNOPRECIPITAZIONE  
DELLA CROMATINA

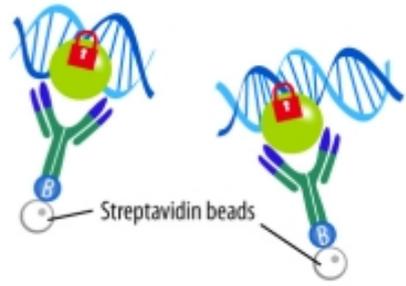
Immunoprecipitate target protein/DNA complexes



5

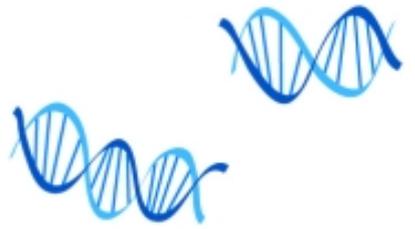
Capture immunocomplexes with streptavidin-conjugated magnetic or agarose beads

# ChIP IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA



6

Purify DNA using chelating resin



# Modificazioni covalenti degli istoni

nucleosoma



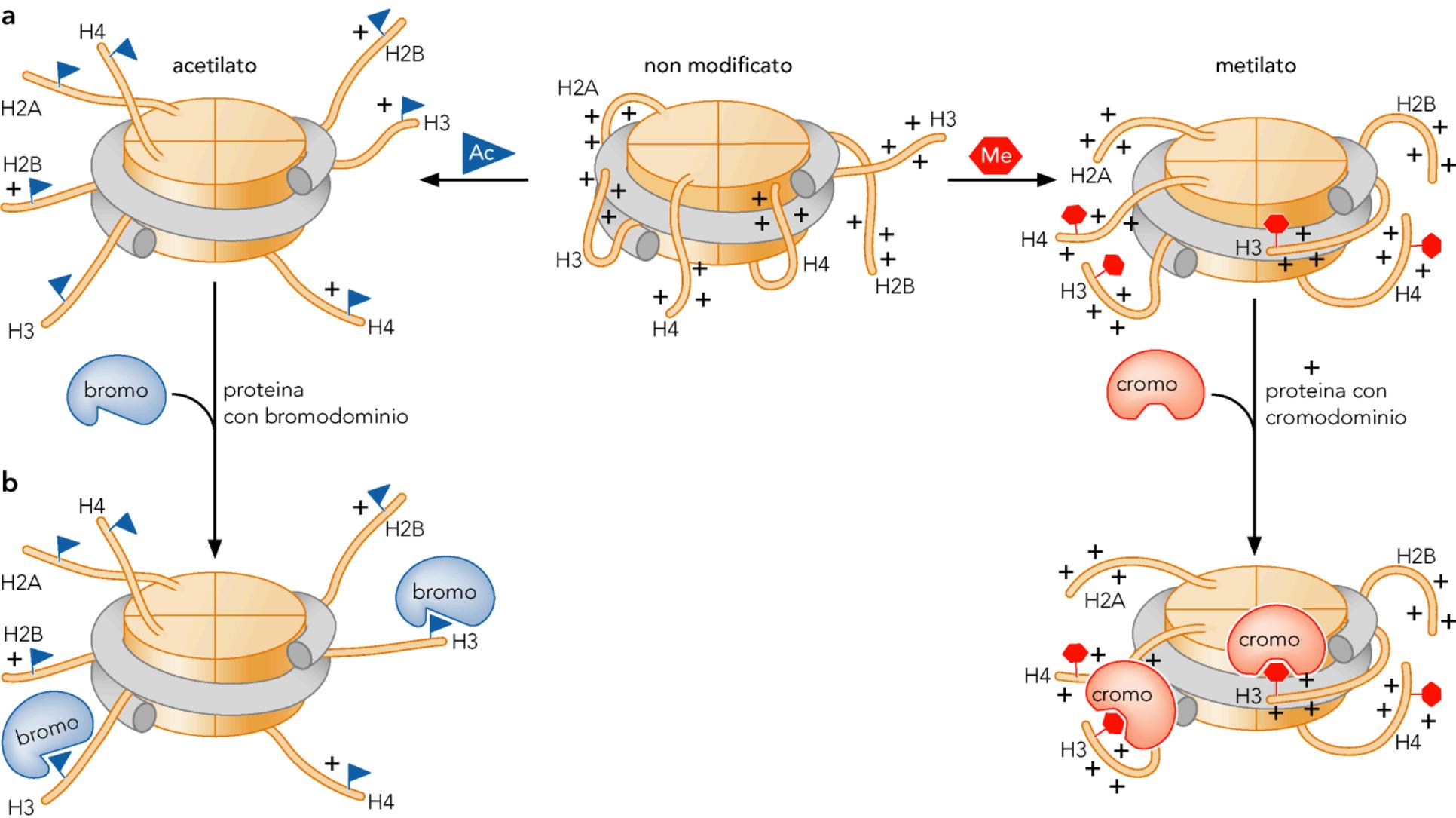
## ESISTE un “codice istonico”?

Code aminoterminali

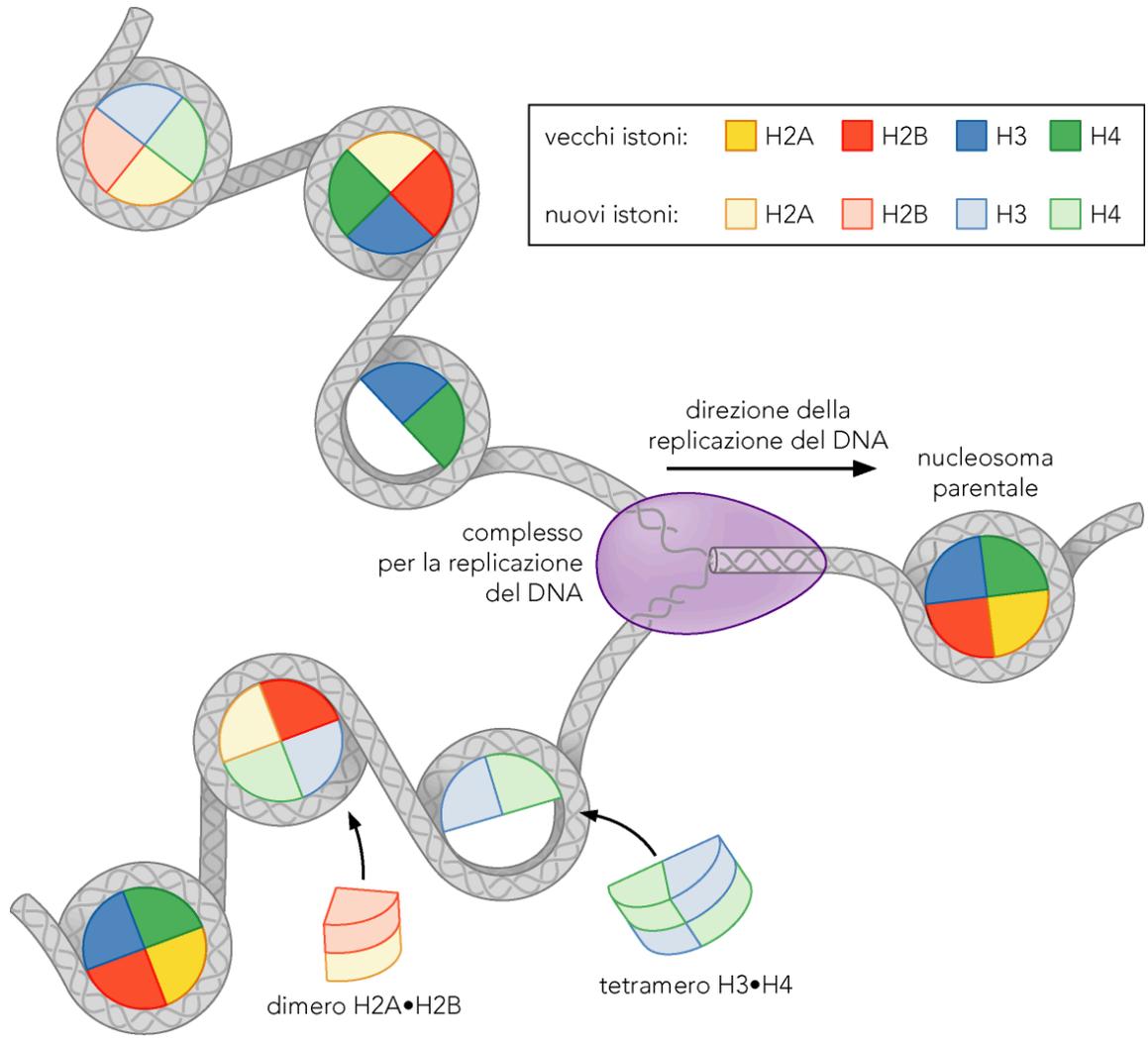


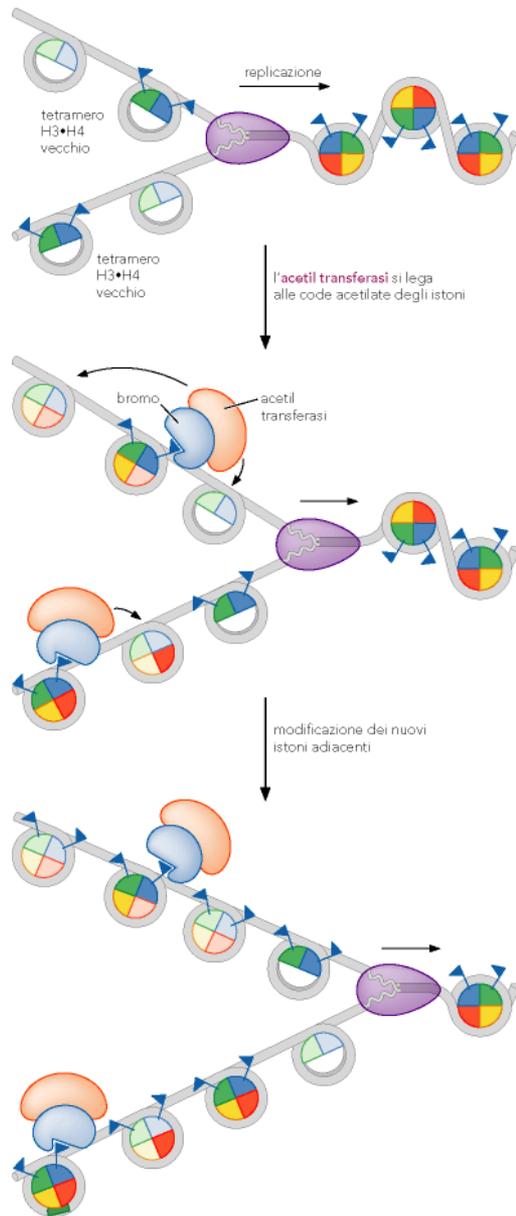
Acetilazione, metilazione, fosforilazione, sumoilazione.

# Effetti indotti dalle modificazioni covalenti delle code istoniche



# Assemblaggio dei nucleosomi durante la replicazione del DNA





## L'eredità dei tetrameri H3\*H4 parentali facilita la trasmissione dello stato della cromatina

Quando il cromosoma viene replicato la distribuzione dei tetrameri H3\*H4 parentali determina la stessa distribuzione delle modificazioni istoniche presenti sui cromosomi parentali. La capacità di queste modificazioni di reclutare enzimi che determinano le stesse modificazioni facilita la corretta propagazione dello stesso stato di modificazione sui due cromosomi di neosintesi

La struttura della cromatina viene modulata da:

## 1- MODIFICAZIONI A CARICO DEGLI ISTONI:

- **Modificazioni covalenti**

Acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione

- **Modificazioni ATP-dipendenti**

modificazioni che richiedono idrolisi di ATP e che non alterano la composizione chimica della cromatina

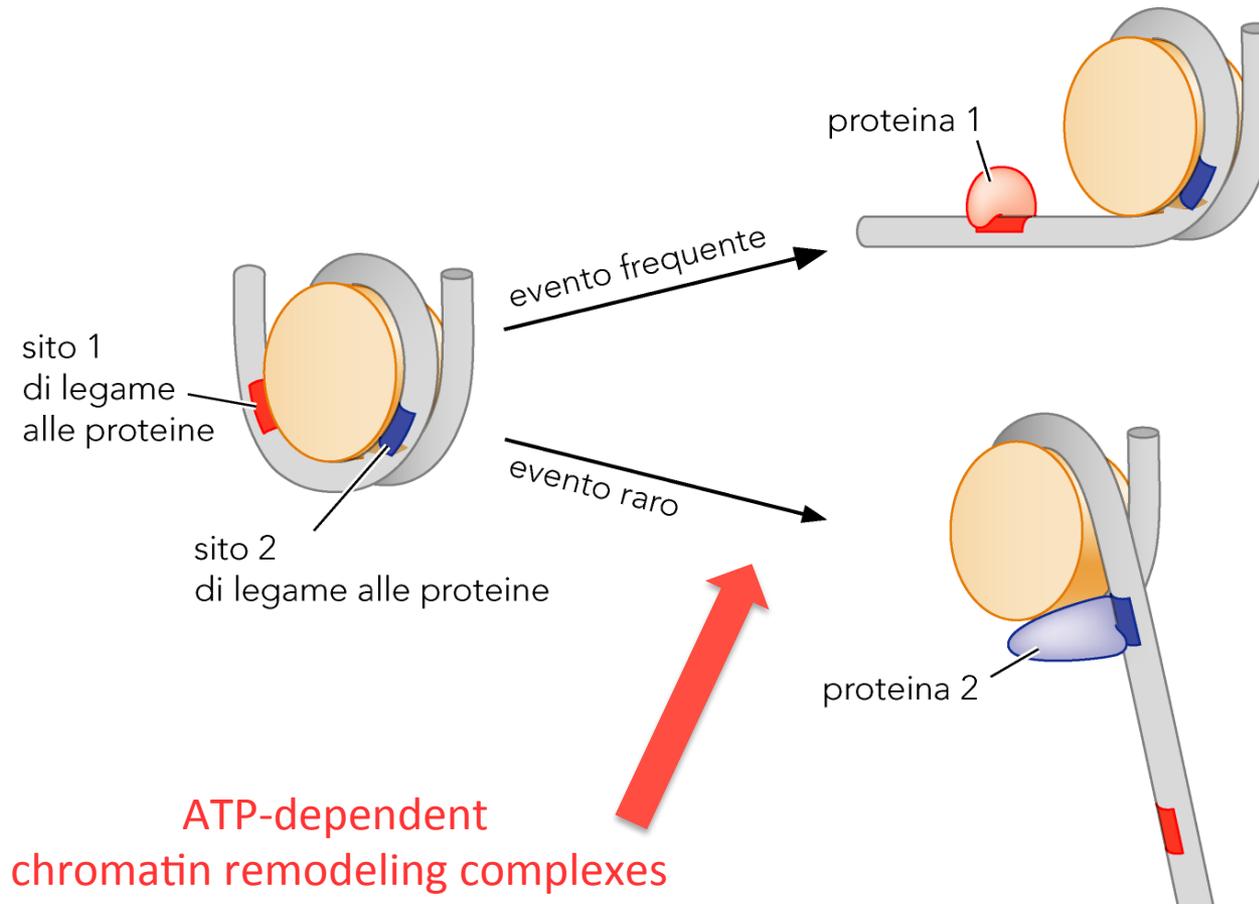
## 2- METILAZIONE del DNA

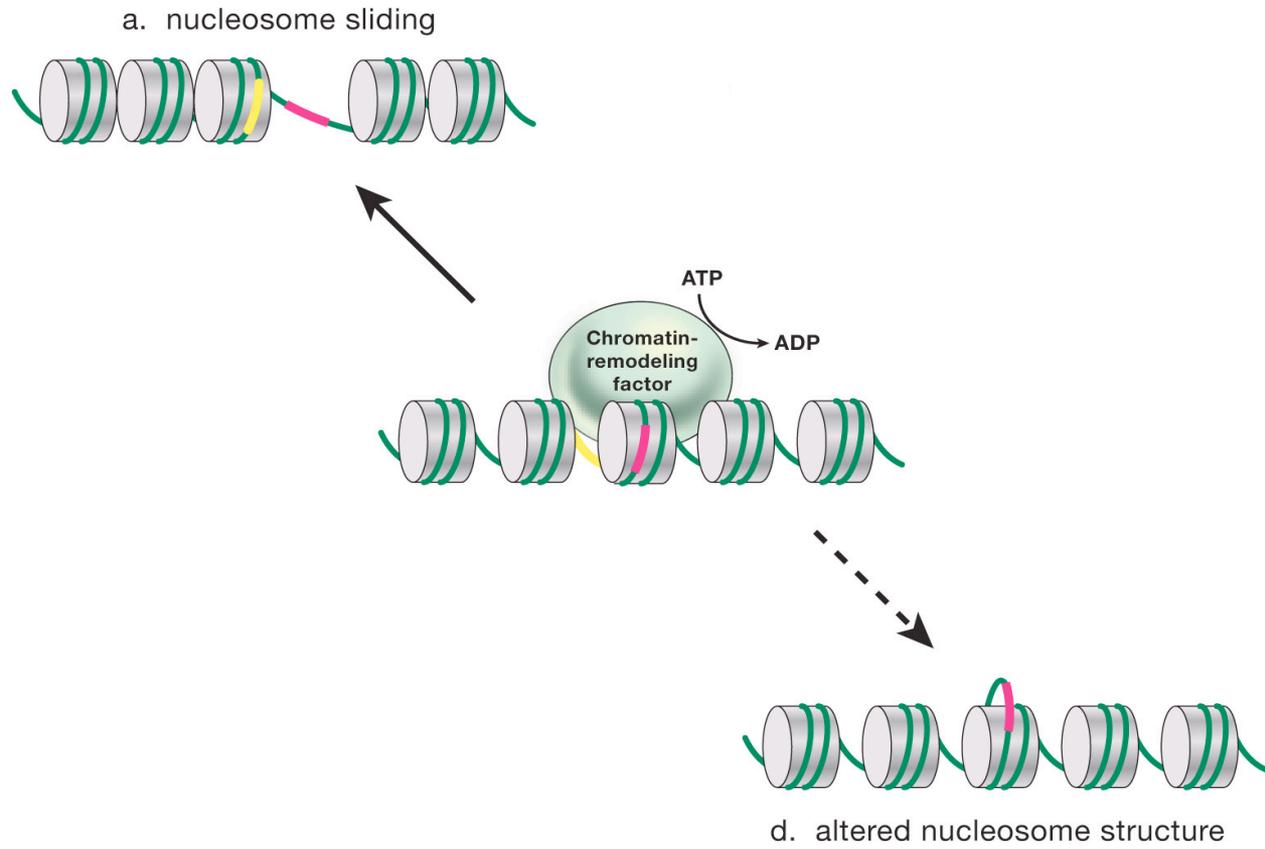
# MODIFICAZIONI ATP-DIPENDENTI DELLA CROMATINA:

L'interazione del DNA con l'ottamero istonico è dinamica

1- Aumentare accessibilità dei fattori di trascrizione

2- Compattare o allentare l'associazione tra nucleosomi adiacenti





**Figure 6. Mechanisms for ATP-dependent Remodeling**

---

La struttura della cromatina viene modulata da:

## **1- MODIFICAZIONI A CARICO DEGLI ISTONI:**

- **Modificazioni covalenti**

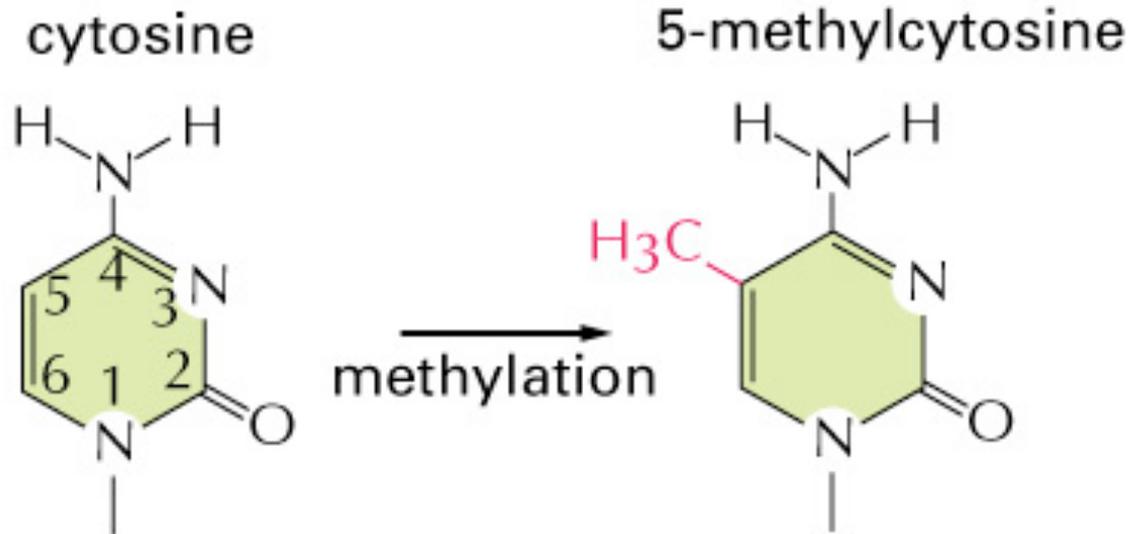
Acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione

- **Modificazioni ATP dipendenti**

modificazioni che richiedono idrolisi di ATP e che non alterano la composizione chimica della cromatina

## **2- METILAZIONE del DNA**

# METILAZIONE del DNA



La citosina metilata NON esiste nel pool dei nucleotidi liberi presenti nella cellula!  
E' una modificazione post-replicativa del genoma catalizzata da enzimi DNA-metil-transferasi  
Avviene solo a carico dei dinucleotidi CpG (no CpA-CpT o CpC).

# METILAZIONE del DNA

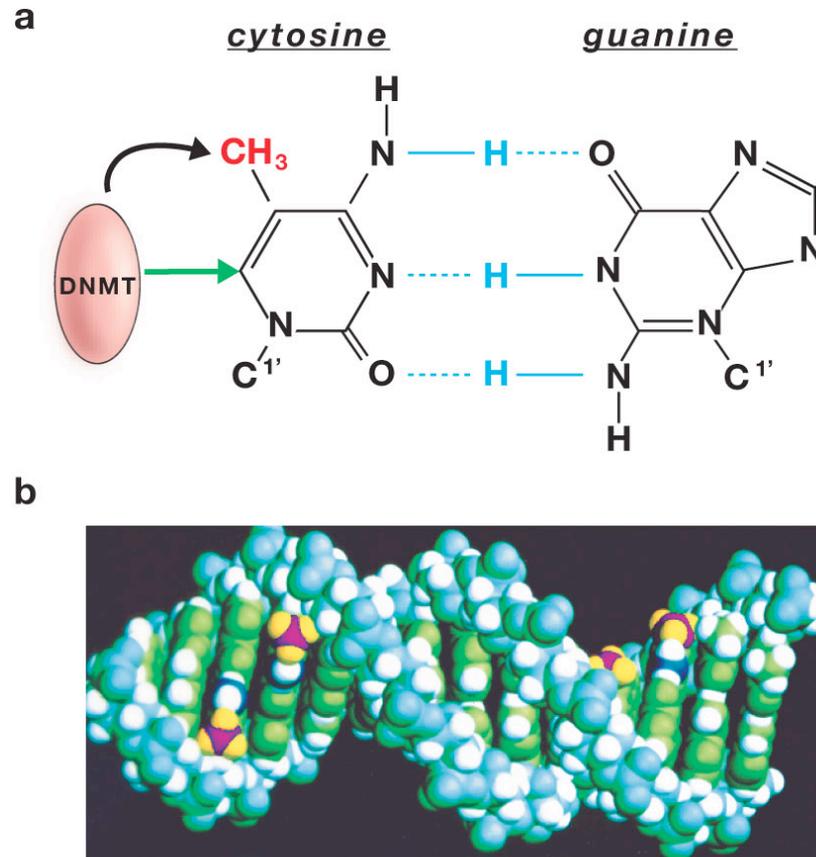
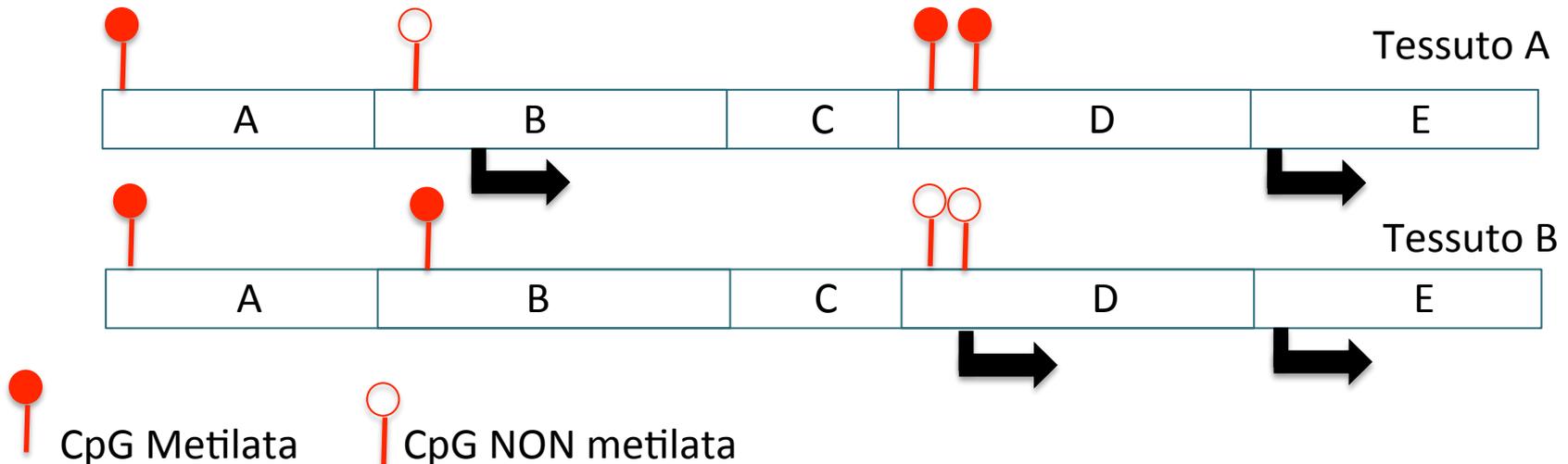


Figure 1. Cytosine Methylation in DNA

La citosina metilata NON esiste nel pool dei nucleotidi liberi presenti nella cellula!  
E' una modificazione post-replicativa del genoma catalizzata da enzimi DNA-metil-transferasi  
Avviene solo a carico dei dinucleotidi CpG (no CpA-CpT o CpC).

# Distribuzione delle 5MeC nel genoma di mammifero

- Il 70% delle citosine sono metilate in tutti i tessuti
- In genere, i geni tessuto-specifici sono metilati nei tessuti dove NON devono essere espressi, e non metilati nei tessuti dove sono espressi
- I geni espressi in tutte le cellule, geni housekeeping NON vengono regolati mediante metilazione



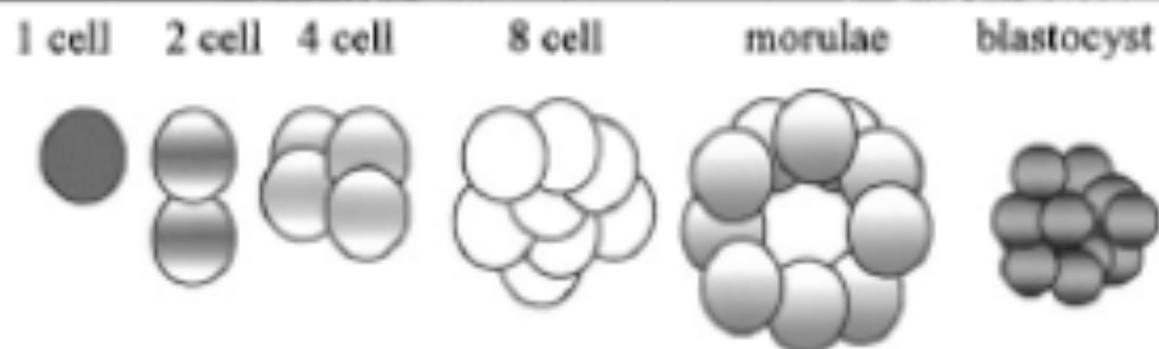
**Demethylation**



**De Novo Methylation**



**Global DNA  
Methylation Profile**



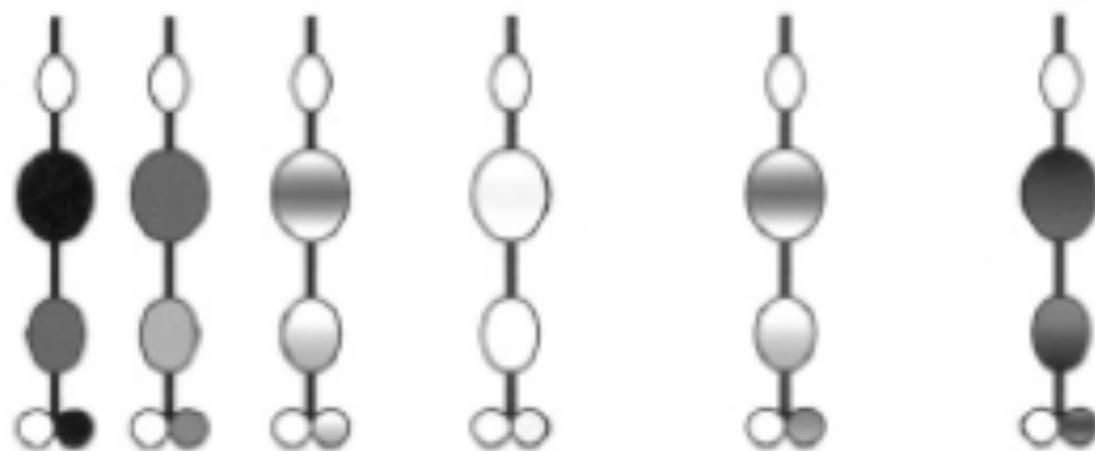
**Gene Specific  
Methylation Profile**

CpG island promoters

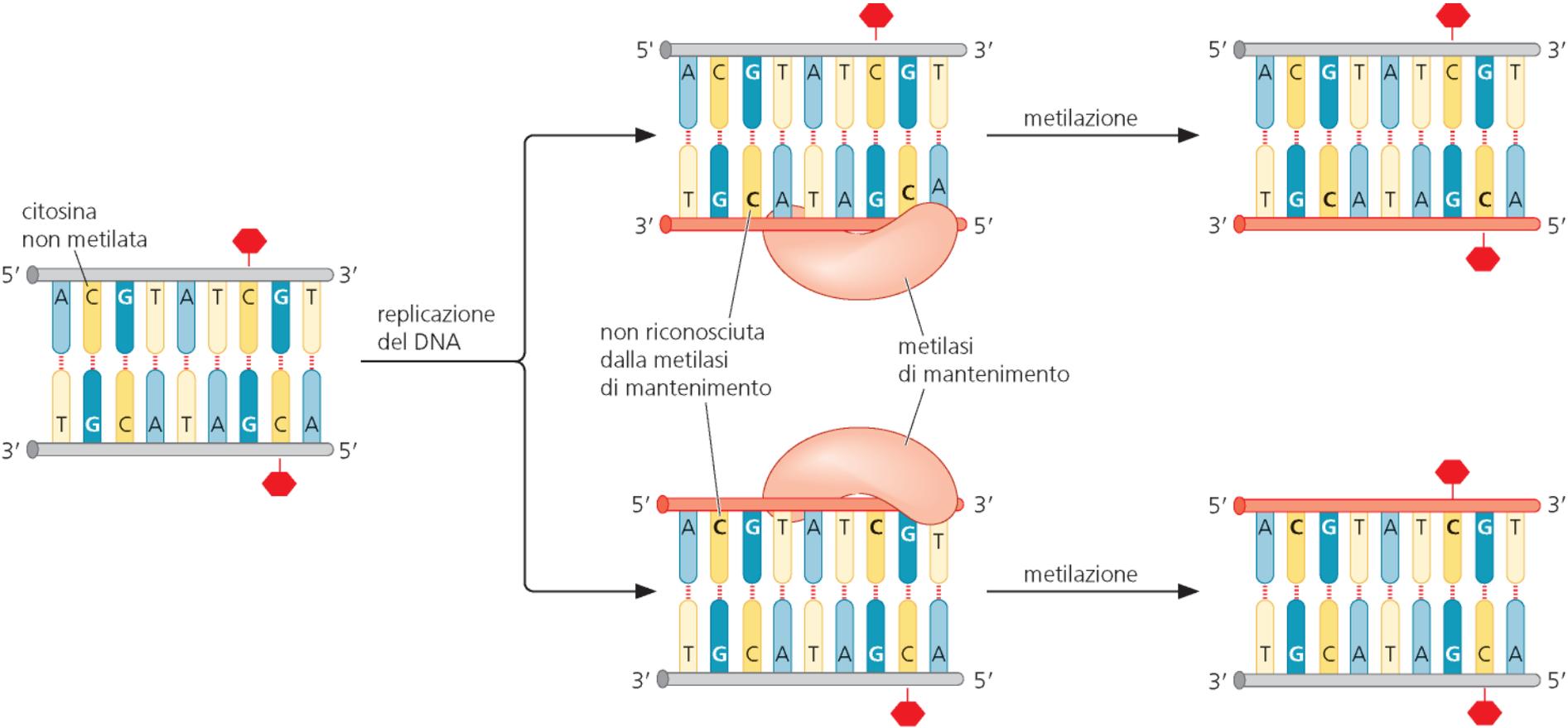
Repetitive DNA

Tissue Specific genes

Imprinted alleles



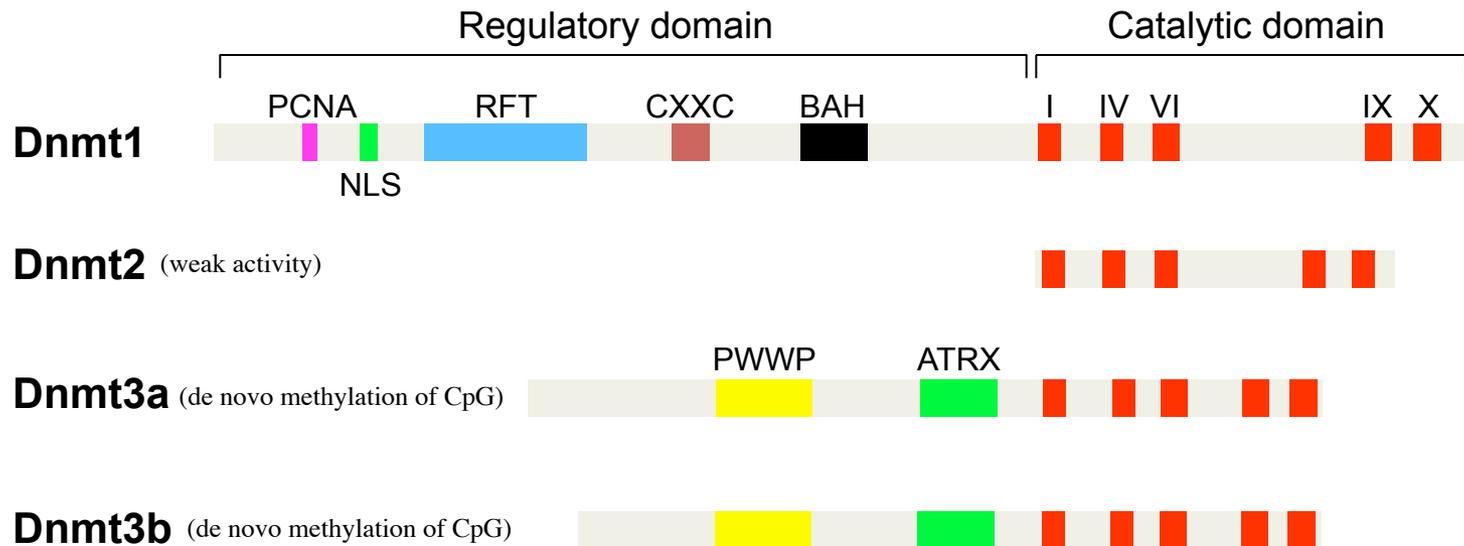
# DNA metilasi di mantenimento: Dnmt1



La sua mancanza non permette lo sviluppo (KO non è vitale)  
Nei tumori funziona anche come metilasi de novo!!

# Metilasi de novo

All known prokaryotic cytosine methyltransferases share a set of diagnostic protein motifs. These features are also found in Dnmt1. These features eventually led to the discoveries of the mammalian de novo methyltransferases (Okano et al. 1998).



# A cosa serve la metilazione del DNA?

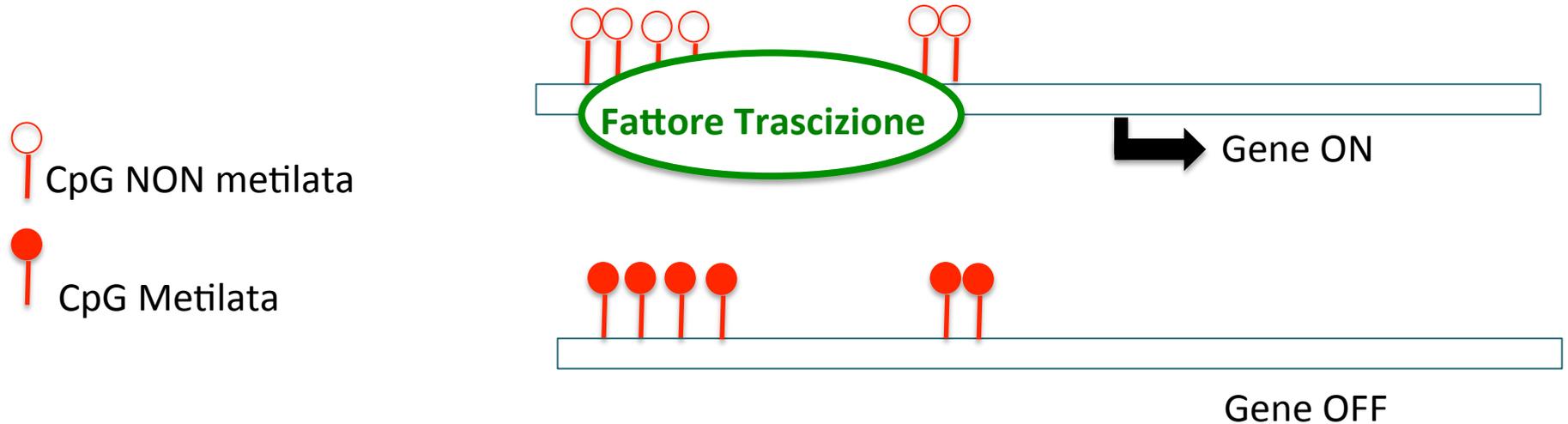
Due funzioni principali non mutualmente esclusive.

1) inibizione dell'espressione genica

2) mantenimento dell'integrità genomica attraverso l'inattivazione di sequenze "parassite" quali i trasposoni e il DNA dei provirus, diminuire la ricombinazione somatica.

# Modelli di repressione trascrizionale mediata dalla metilazione del DNA (Adrian Bird)

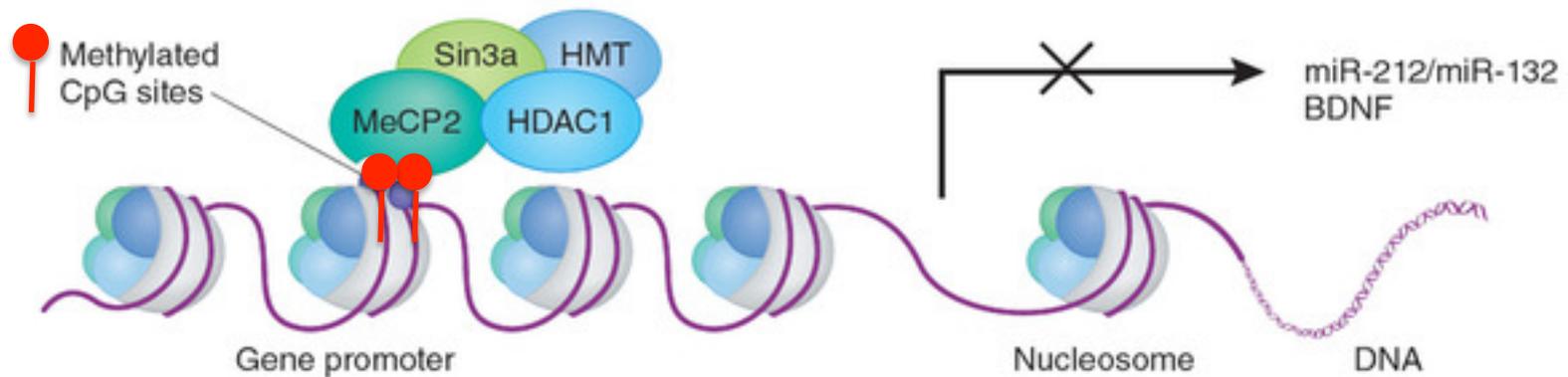
**Modello diretto:** la metilazione impedisce il legame del fattore di trascrizione al DNA



**Modello indiretto:** prevede l'esistenza di proteine che legano il DNA quando questo è metilato. Scoperta di MeCP2 (fine anni '90)

# Modelli di repressione trascrizionale mediata dalla metilazione del DNA (Adrian Bird)

**Modello indiretto:** prevede l'esistenza di proteine che legano il DNA quando questo è metilato. Scoperta di MeCP2 (fine anni '90)



Complex interrelationship between DNA methylation and histone modification, which result in heterochromatin formation and gene silencing.

# The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers

**Frank Lyko<sup>1,9</sup>, Sylvain Foret<sup>2,9</sup>, Robert Kucharski<sup>3</sup>, Stephan Wolf<sup>4</sup>, Cassandra Falckenhayn<sup>1</sup>, Ryszard Maleszka<sup>3\*</sup>**

**1** Division of Epigenetics, DKFZ-ZMBH Alliance, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, **2** ARC Centre of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, Australia, **3** Research School of Biology, the Australian National University, Canberra, Australia, **4** Genomics and Proteomics Core Facility, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

## Author Summary

The queen honey bee and her worker sisters do not seem to have much in common. Workers are active and intelligent, skillfully navigating the outside world in search of food for the colony. They never reproduce; that task is left entirely to the much larger and longer-lived queen, who is permanently ensconced within the colony and uses a powerful chemical influence to exert control. Remarkably, these two female castes are generated from identical genomes. The key to each female's developmental destiny is her diet as a larva: future queens are raised on royal jelly.

# The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers

Frank Lyko<sup>1,9</sup>, Sylvain Foret<sup>2,9</sup>, Robert Kucharski<sup>3</sup>, Stephan Wolf<sup>4</sup>, Cassandra Falckenhayn<sup>1</sup>, Ryszard Maleszka<sup>3\*</sup>

**1** Division of Epigenetics, DKFZ-ZMBH Alliance, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, **2** ARC Centre of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, Australia, **3** Research School of Biology, the Australian National University, Canberra, Australia, **4** Genomics and Proteomics Core Facility, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

This specialized diet is thought to affect a particular chemical modification, methylation, of the bee's DNA, causing the same genome to be deployed differently. To document differences in this epigenomic setting and hypothesize about its effects on behavior, we performed high-resolution bisulphite sequencing of whole genomes from the brains of queen and worker honey bees. In contrast to the heavily methylated human genome, we found that only a small and specific fraction of the honey bee genome is methylated. Most methylation occurred within conserved genes that provide critical cellular functions. **Over 550 genes showed significant methylation differences between the queen and the worker, which may contribute to the profound divergence in behavior.** How DNA methylation works on these genes remains unclear, but it may change their accessibility to the cellular machinery that controls their expression. We found a tantalizing clue to a mechanism in the clustering of methylation within parts of genes where splicing occurs, suggesting that methylation could control which of several versions of a gene is expressed. Our study provides **the first documentation of extensive molecular differences that may allow honey bees to generate different phenotypes from the same genome.**



Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 26;  
102(30):10604-9. Epub 2005 Jul 11.

*Epigenetic differences arise during the  
lifetime of monozygotic twins*

Monozygous twins share a  
common genotype and are  
genetically identical.

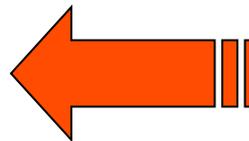
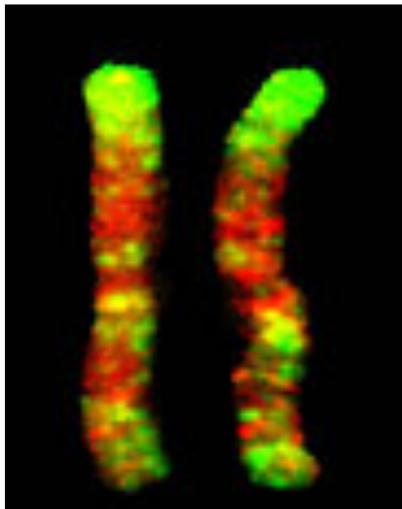
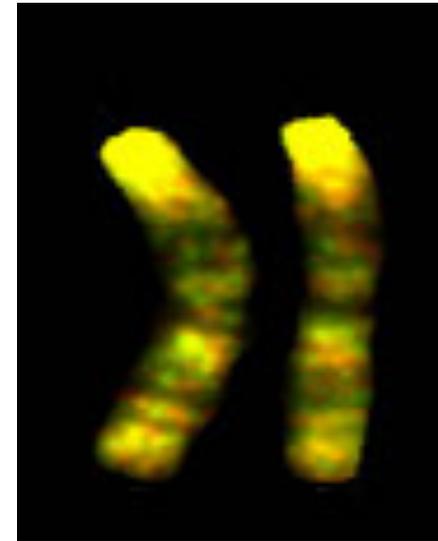
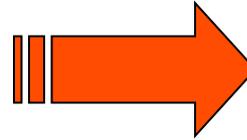
HOWEVER

**There is significant  
phenotypic discordance:**

- Mental disorders (schizophrenia)
- Cancer



# Age Dependent Epigenetic differences in Monozygotic (MZ) twins



# Altri esempi: Epigenetica e Ambiente

## Dutch Hunger Winter

Inverno 1944-1945 in Olanda, Grande carestia. Madri sottanutrite nell'ultimo trimestre di gravidanza hanno generato neonati sottopeso e che sono rimasti più piccoli della media per tutta la loro vita (studi epidemiologici)

## SRESS

Bambini che hanno sofferto di abusi, o sono stati molto trascurati in età infantile hanno da adulti una maggiore probabilità di sviluppare depressione e di tendenza suicidio.

Questi casi così diversi sono tutti esempi di un effetto epigenetico in azione.

Quando cambiamenti dell'ambiente hanno conseguenze biologiche che durano nel tempo dopo che l'evento stesso è del tutto dimenticato.

# Genetica ed Epigenetica

## Mutazione genetica:

...ATAG**C**TACCGT...    ...ATAG**T**TACCGT...



- Perdita o alterazione di funzionalità proteica
- Perdita o alterazione dell'espressione



**IRREVERSIBILE**

## Modificazione epigenetica:

...ATAG**C**TACCGT...

...ATAG**C**TACCGT...



- Alterazione dell'espressione



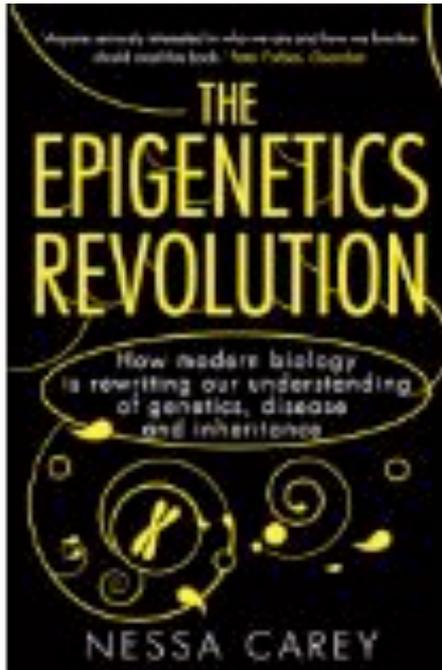
**REVERSIBILE**

# EPI-PHARMACOLOGY

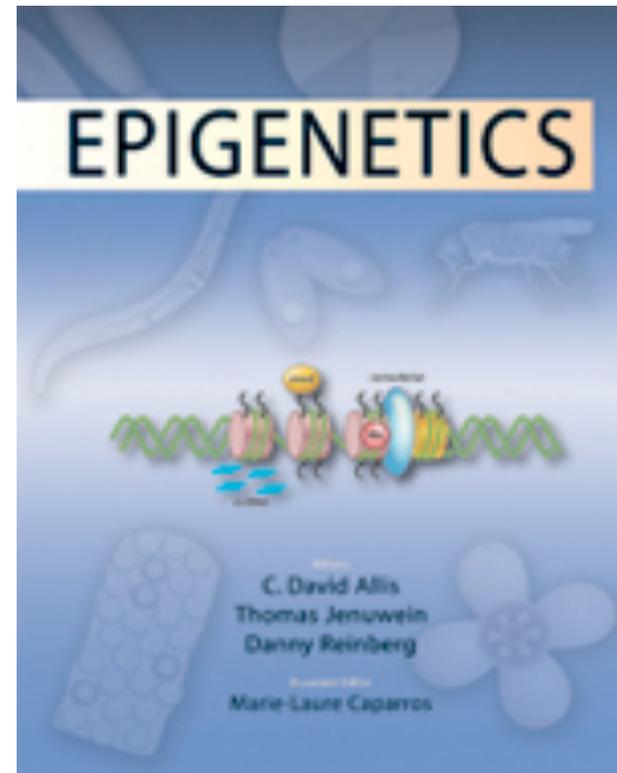
**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!**



<http://www.nature.com/nature/supplements/insights/epigenetics/index.html>



Nessa Carey



C. David Allis Thomas Jenuwein,  
and Danny Reinberg,

<http://www.nature.com/nature/supplements/insights/epigenetics/index.html>

<http://www.genesandsignals.org/epigenetics.php>