

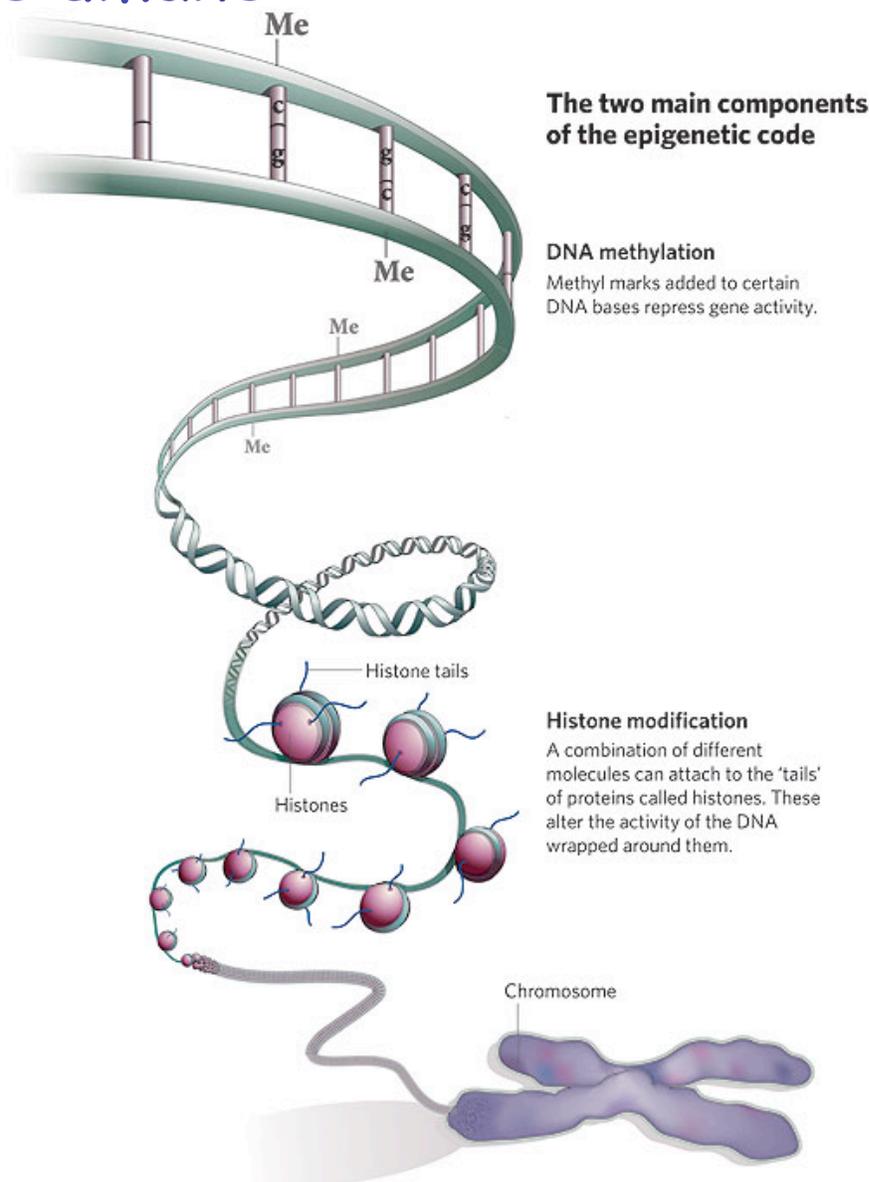
# Epigenetica

Definita come lo studio dei meccanismi responsabili di cambiamenti ereditabili nelle funzioni del genoma senza alcuna modificazione nella sequenza del DNA

“The difference between genetics and epigenetics can probably be compared to the difference between writing and reading a book. Once a book is written, the text (the genes or DNA: stored information) will be the same in all the copies distributed. However, each individual reader of a given book may interpret the story slightly differently, with varying emotions and projections as they continue to unfold the chapters. In a very similar manner, epigenetics would allow different interpretations of a fixed template (the genetic code) and result in different read-outs, dependent upon the variable conditions under which this template is interrogated.”

•Our body contains hundreds of different kind of cells, although each one derives from the same starting point. As cells develop, their state is governed by the selective silencing of genes. This silencing is mainly regulated by epigenetic factors. Failure to silences genes can produce a hazardous cacophony. Epigenetic factors govern the interpretation of DNA within each cell.

I due principali componenti del codice epigenetico sembrano essere la **metilazione del DNA** e le modificazioni della cromatina. Entrambi sono necessari per un corretto sviluppo e differenziamento, entrambi se mal controllati sono coinvolti in severe patologie umane



# La metilazione del DNA



- Dove la troviamo nel nostro genoma;
- Quali enzimi sono necessari per stabilire la sua specifica distribuzione;
- A cosa serve e come esercita il suo meccanismo;
- Cosa succede se viene male distribuita o male interpretata.

# LA METILAZIONE DEL DNA

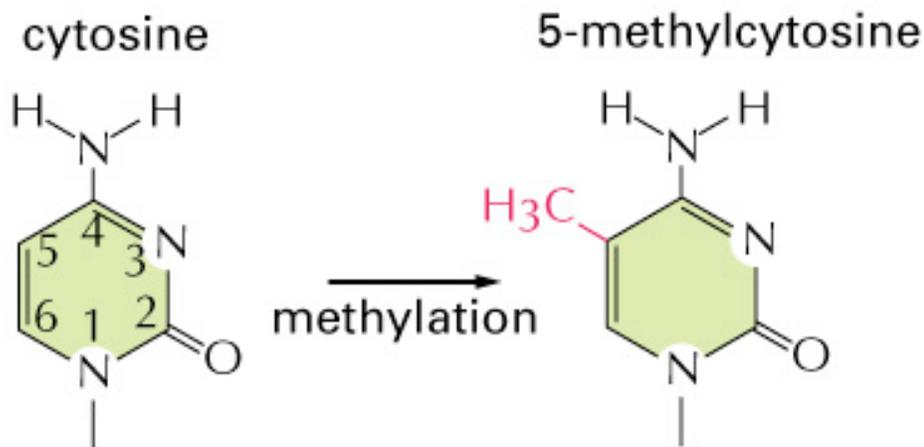


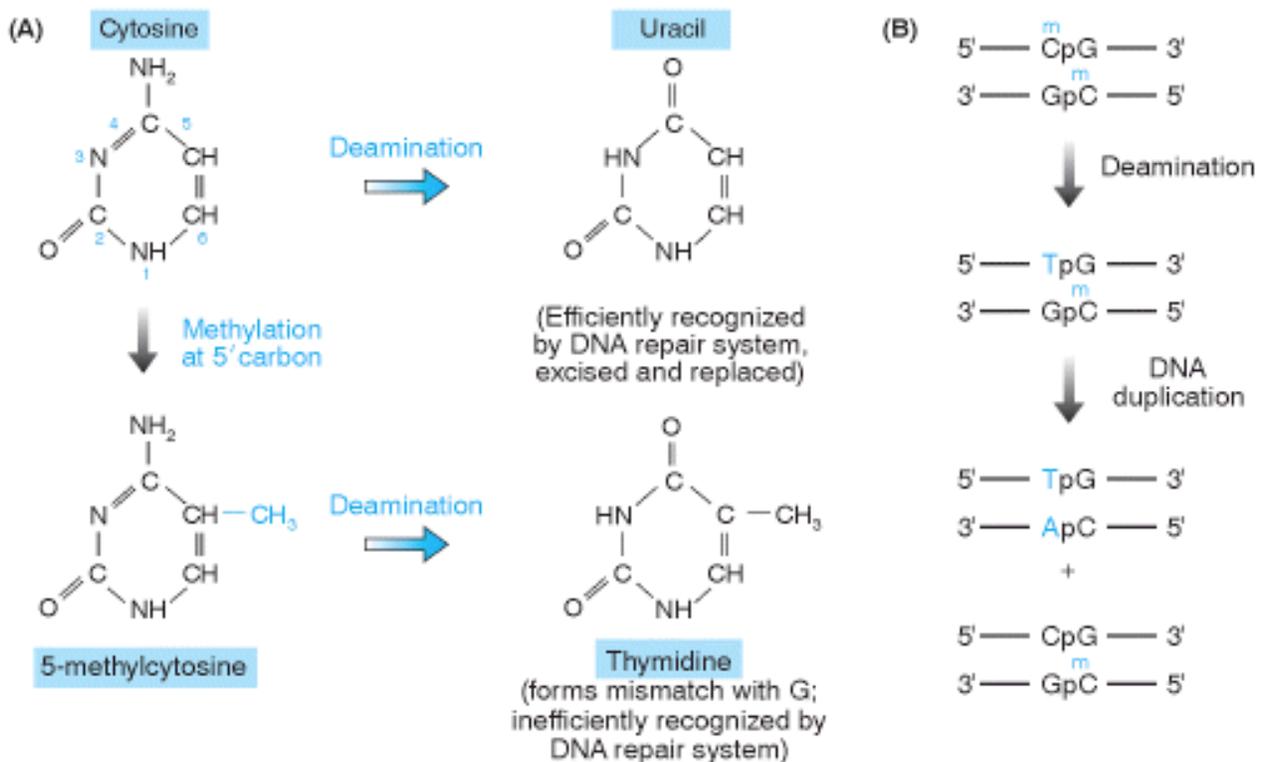
Figure 7–80. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Modificazione postreplicativa del genoma catalizzata dalle DNA metiltransferasi.
- Nei vertebrati interessa solo le citosine appartenenti ai dinucleotidi CpG.
- Nei mammiferi assistiamo ad un'estensiva metilazione del genoma. Tale modificazione epigenetica è coinvolta in diversi fenomeni biologici ed è essenziale per lo sviluppo.

# LA METILAZIONE DEL DNA NEGLI EUCARIOTI

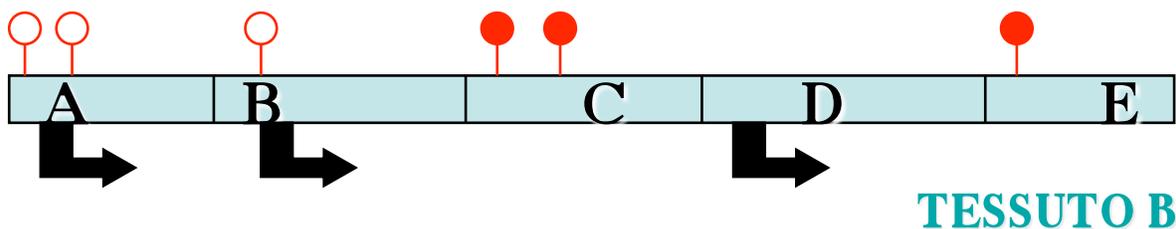
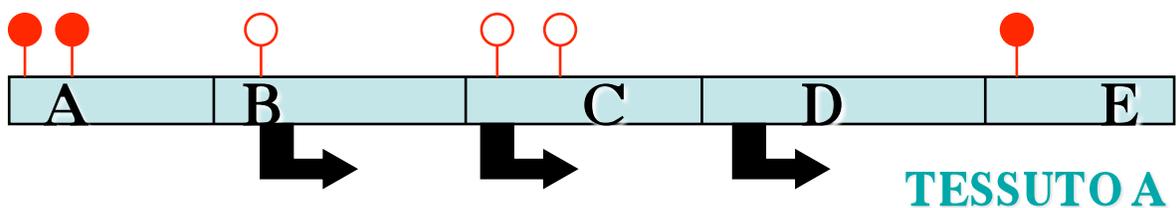
-La metilazione del DNA avviene solo sui dinucleotidi CpG. La 5MC rappresenta <1% dei nucleotidi.

-La frequenza del CpG è ~5X minore dell'atteso a causa di un incremento della frequenza di mutazione. Le transizioni C-T avvengono 10-40 volte più spesso di altri eventi di mutazione. (50% delle mutazioni di p53 nei tumori avvengono in CpG, principale causa di mutazioni germinali).



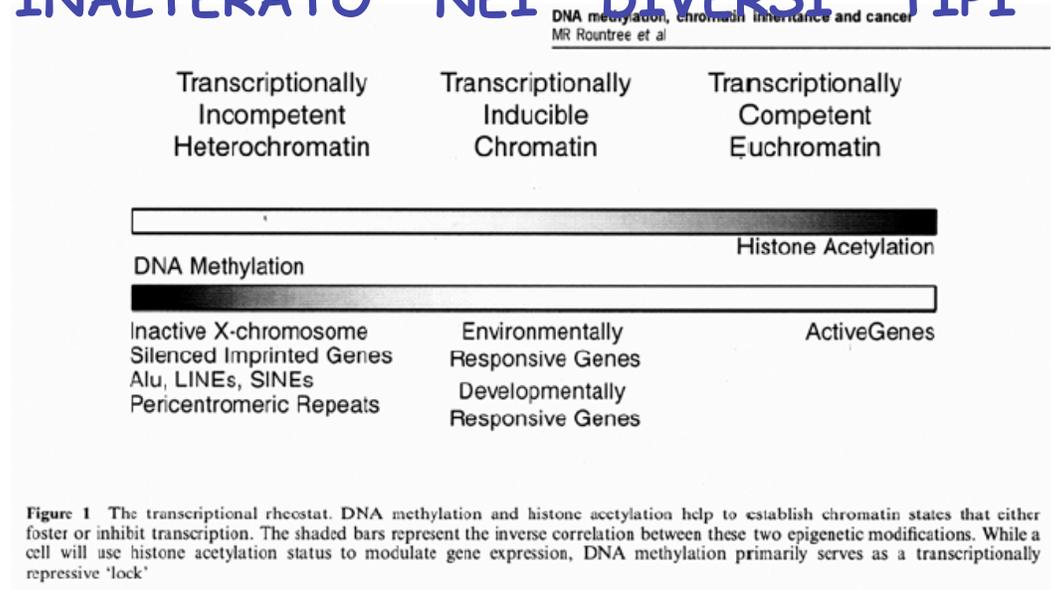
# Distribuzione Della Metilazione Nel Genoma Dei Vertebrati

- IL 70-80% DELLE CITOSINE DEI DINUCLEOTIDI , SONO METILATI NELLA MAGGIOR PARTE DEI TESSUTI.
- IN GENERE I GENI TESSUTO SPECIFICI NON ESPRESI SONO METILATI MENTRE GLI STESSI GENI SONO DEMETILATI NEI TESSUTI IN CUI VENGONO ESPRESI.
- MOLTI GENI HOUSEKEEPING SONO PRECEDUTI DA CpG ISLANDS CHE IN GENERE RIMANGONO DEMETILATE.



# Alcuni Esempi Che Testimoniano L'importanza Della Metilazione Per Lo Sviluppo

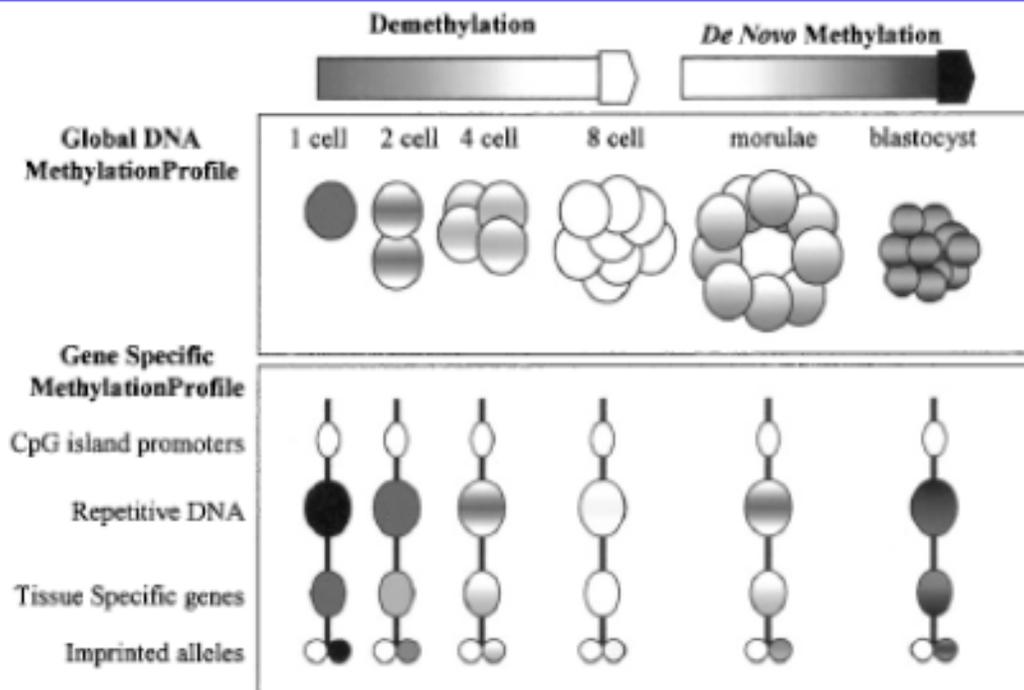
• I MAMMIFERI SONO CARATTERIZZATI DA UNO SPECIFICO PATTERN DI METILAZIONE CHE SI MANTIENE INALTERATO NEI DIVERSI TIPI CELLULARI.



• TOPI TRANSGENICI PRIVI DELLA DNA METILTRANSFERASI 1 SONO LETALI. CELLULE STAMINALI (NON DIFFERENZIATE) IN COLTURA PORTANTI LA MEDESIMA MUTAZIONE OMOZIGOTE CRESCONO SENZA APPARENTE FENOTIPO. VANNO IN APOPTOSI IN SEGUITO A STIMOLAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO.

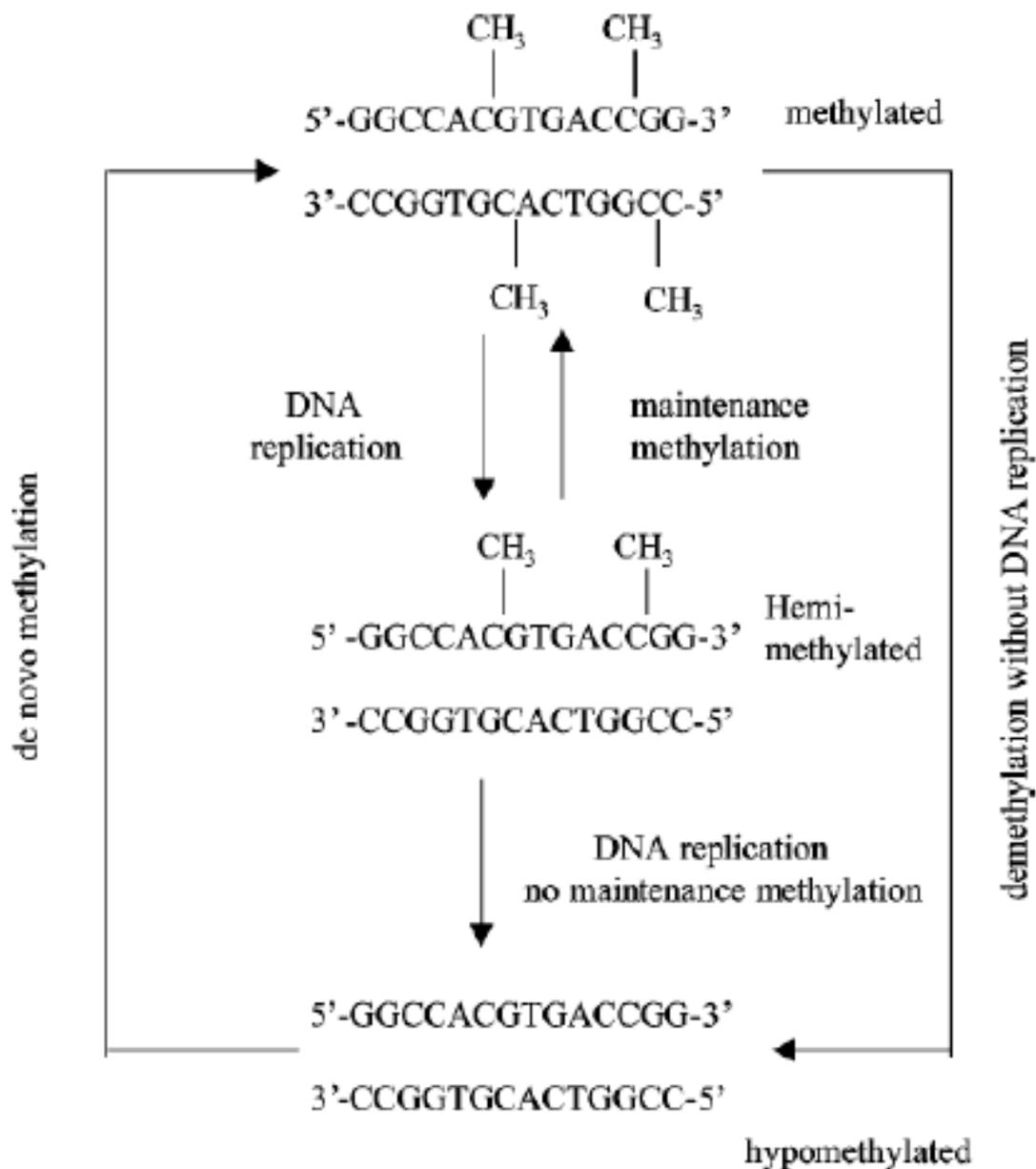
• IL CROMOSOMA X INATTIVO NELLE CELLULE FEMMINILI DI MAMMIFERO E' ALTAMENTE METILATO MENTRE QUELLO ATTIVO NON LO E'.

# Quando viene depositato nell'embriogenesi lo specifico pattern di metilazione?



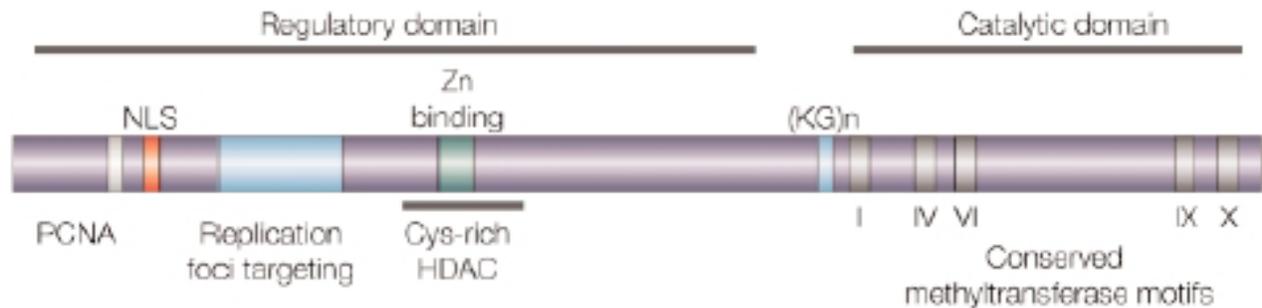
**Figure 1** Global and gene specific DNA methylation changes in the early embryo. During early development the methylation profile of the embryo changes with an initial wave of demethylation from fertilization up until the eight cell stage, followed by a wave of *de novo* methylation from the morulae to blastocyst stage (implantation). The global DNA methylation profile shown in the top panel is based on restriction enzyme analysis (Monk *et al.*, 1987) and therefore principally reflects the repetitive fraction of the genome. The lower panel depicts the gene specific methylation profile, with each class of genes or DNA regions being represented as an oval on a contiguous DNA strand. The level of methylation shown is based on genomic sequencing individual candidate genes from these various regions (Warnecke, 1998; Warnecke *et al.*, 1998; Warnecke and Clark, 1999). The intensity of methylation at each stage during development for both the global methylation profile and the gene specific methylation profile is indicated by the degree of shading

# Il Pattern Di Metilazione Viene Stabilito E Mantenuto Attraverso Tre Processi



# DNMT1

DNMT1 (193.5 kDa)



•NOTA DAL 1988. FINO AL 1997 ERA L'UNICA DNMT EUCARIOTICA CONOSCIUTA.

•E' ESPRESSA IN TUTTI I TESSUTI.

•IN GENERE VIENE CONSIDERATA COME L'ENZIMA RESPONSABILE DEL MANTENIMENTO DEL PATTERN DI METILAZIONE DURANTE LA REPLICAZIONE (ma in vitro sa metilare anche del DNA non metilato). IN ACCORDO CON CIO' SI LOCALIZZA SUI FOCI REPLICATIVI.

•TOPI KNOCK-OUT MUOIONO 10 GIORNI DOPO IL CONCEPIMENTO (TARDA GASTRULAZIONE). Non sappiamo ancora il perchè. QUESTI TOPI SONO CARATTERIZZATI DA UNA GENERALE (90%) DEMETILAZIONE DEL GENOMA.

•IN REALTA' POTREBBE AVERE ANCHE UN'ATTIVITA' DE NOVO. IN ACCORDO CON CIO' IN DIVERSI TUMORI L'OVERESPRESSIONE DI DNMT1 PORTA ALLA METILAZIONE DI REGIONI PRIMA NON METILATE.



# DNMT2

DNMT2



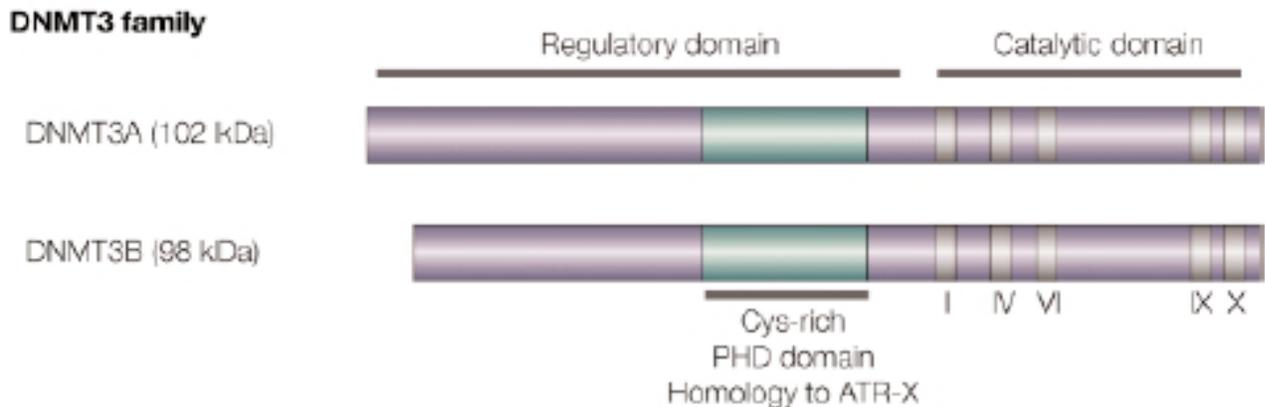
- FUNZIONE ASSOLUTAMENTE IGNOTA (?).
- IN VITRO NONOSTANTE IL DOMINIO TIPICO NON HA ATTIVITA' CATALITICA (?).
- I TOPI KNOCK-OUT NON HANNO FENOTIPO.

## **Dnmt2 methylates tRNA<sup>Asp</sup>**

In a recent biochemical study, Goll *et al.* [11] generated Dnmt2 knockouts in diverse model systems (mouse, *Drosophila* and *Arabidopsis*) to investigate the function of this enzyme. Using RNA preparations from these Dnmt2 mutants, they found that tRNA<sup>Asp</sup> is methylated with high efficiency by Dnmt2. Intriguingly, this

Of note, Dnmt2 activity has been associated with RNA interference in *Dictyostelium* [9] and with covalent histone modifications in *Drosophila* [7], which suggests that Dnmt2 has a role in epigenetic regulation. Whether this role is related to the DNA methyltransferase or the tRNA<sup>Asp</sup> methyltransferase activity of Dnmt2 remains to be determined.

# DNMT3a E DNMT 3b



- SIMILI MA CODIFICATE DA DUE GENI DIVERSI.
- ENTRAMBE MOSTRANO IN VITRO ATTIVITA' DE NOVO E DI MANTENIMENTO.
- MEDIANO LA GLOBALE RIMETILAZIONE DEL GENOMA CHE AVVIENE AL MOMENTO DELL'IMPIANTO. FORSE ANCHE COINVOLTE NEL MANTENIMENTO DEL PATTERN DI METILAZIONE.
- TOPI PRIVI DI DNMT3a MUOIONO A CIRCA 4 SETTIMANE. TOPI KNOCK-OUT DNMT3b MUOIONO DOPO LA GASTRULAZIONE. TOPI PRIVI DI ENTRAMBI GLI ENZIMI MUOIONO ALLA GASTRULAZIONE. DNMT3b NELL'UOMO E' CAUSA DELLA SINDROME ICF.
- SONO ALTAMENTE ESPRESSE IN CELLULE ES E DOWNREGOLATE DOPO IL DIFFERENZIAMENTO ED ESPRESSE A BASSISSIMO LIVELLO NEI TESSUTO SOMATICI ADULTI.

# DNMT 3L



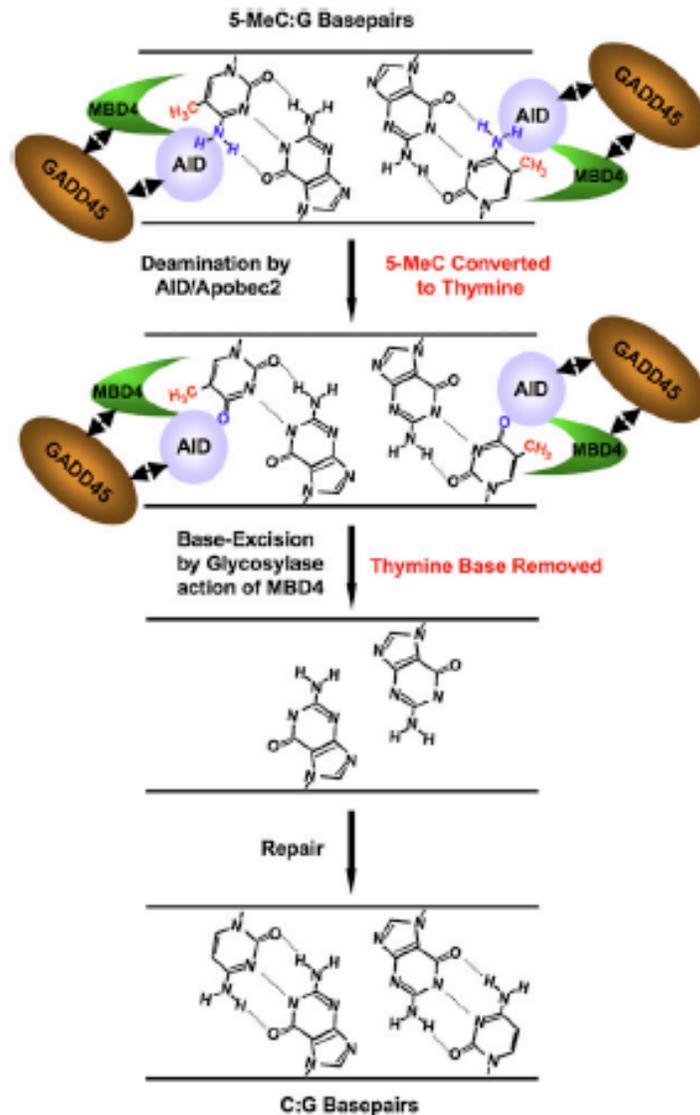
- MANCA DI UN'ATTIVITA' METILTRANSFERASICA.
- I TOPI KO NON STABILISCONO I SEGNALI D'IMPRINTING DATI DALLA METILAZIONE NEGLI OOCITI. LA PROGENIE NON HA LA TIPICA ESPRESSIONE MONOALLELICA DEI GENI MATERNALLY IMPRINTED E MUORE A E10.5.
- INTERAGISCE CON DNMT3A E B E NE REGOLA L'ATTIVITÀ PROBABILMENTE PORTANDOLE SUI SITI DA METILARE.

# ATTIVA DEMETILAZIONE DEL GENOMA

•BENCHE' ESISTANO MOLTE EVIDENZE DELL'ESISTENZA DI UN PROCESSO DI DEMETILAZIONE ATTIVA NON SAPPIAMO COME QUESTO AVVENGA.

•FORSE AVVIENE ATTRAVERSO LA RIMOZIONE DIRETTA DEL GRUPPO METILICO, O ATTRAVERSO UN MECCANISMO DI EXCISIONE DELLA BASE MODIFICATA, O FORSE SI HA UN'INIZIALE DEAMINAZIONE DELLA METILCITOSINA SEGUITA DALL'INTERVENTO DI RIPARAZIONE DEI MISMATCH (MBD4?).

•SU CELL DI DICEMBRE 2008 TROVATO MECCANISMO IN ZEBRAFISH CHE ACCOPPIA UNA 5-MEC DEAMINASI (CONVERTE 5-MEC IN TIMINA) A MBD4 (UNA MISMATCH SPECIFICA TIMINA GLICOSILASI).



**Figure 7. Model for 5-mC Demethylation**

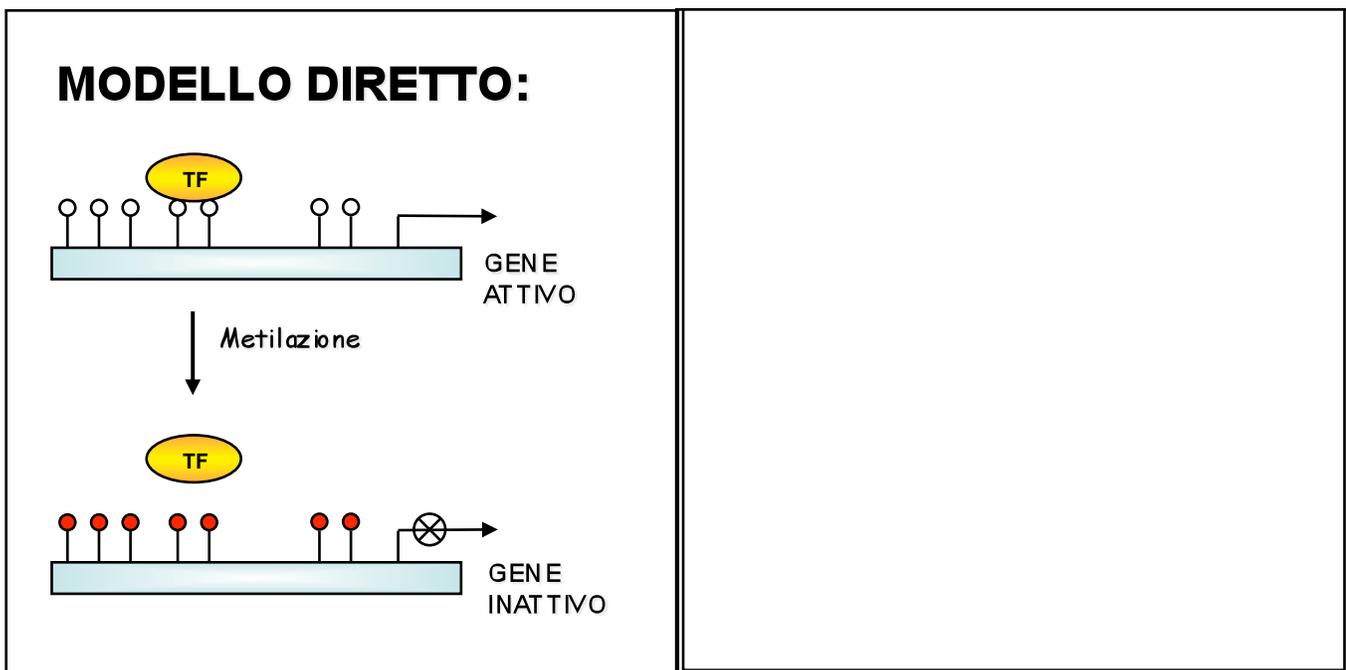
Demethylation may occur through a two-step coupled enzymatic process, promoted by Gadd45. The first enzymatic step involves deamination of 5-mC by AID (amine group removed, in blue), generating a thymine product and a G:T mismatch. The second step involves thymine base removal by Mbd4, generating an abasic site. As the transient G:T intermediate is not detected in cells with active Mbd4, but is with catalytically inactive Mbd4, the thymine is likely rapidly removed, suggesting a coupling between deaminase and glycosylase activity. Gadd45 may promote functional or physical interactions between AID and Mbd4 at the site of demethylation. Mbd4 may couple with a lyase to help promote base replacement through base excision repair (neither shown nor addressed). Targeting of AID/Mbd4 may be promoted by recognition of the 5-mCpG (methyl group in red), or through other mechanisms (data not shown).

# A Cosa Serve La Metilazione Del DNA?

DUE FUNZIONI PRINCIPALI NON MUTUALMENTE ESCLUSIVE.

- 1) INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA
- 2) MANTENIMENTO DELL'INTEGRITA' GENOMICA ATTRAVERSO L'INATTIVAZIONE DI SEQUENZE PARASSITE QUALI I TRASPOSONI E IL DNA DEI PROVIRUS.

# Modelli Di Repressione Trascrizionale Mediata Dalla Metilazione Del DNA



◡ CpG metilata

◡ CpG non metilata

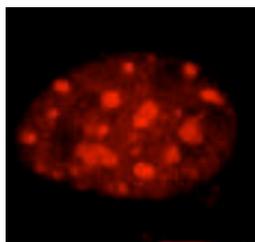
CONFERMA DEL MODELLO DIRETTO: AP2, MYC-  
MAX, E2F, NFKB, CTCF.

# MeCP2

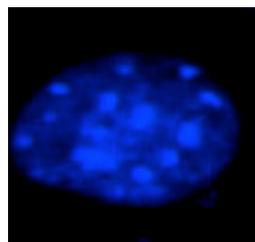


- FATTORE NUCLEARE ABBONDANTE, IN GENERE È CONSIDERATO UBIQUITARIO.
- GRAZIE AL MBD LEGA ANCHE UN SINGOLO DINUCLEOTIDE CpG SIMMETRICAMENTE METILATO. NON HA SPECIFICITÀ DI SEQUENZA.
- IL TRD REPRIME LA TRASCRIZIONE SE PORTATO ARTIFICIALMENTE SUL DNA (GAL4-TRD).
- LA SUA IMMUNOLocalizzazione RIVELA UNA LOCALIZZAZIONE PREVALENTEMENTE SUL DNA ETEROCROMATICO ED ALTAMENTE METILATO.

MeCP2



Hoechst

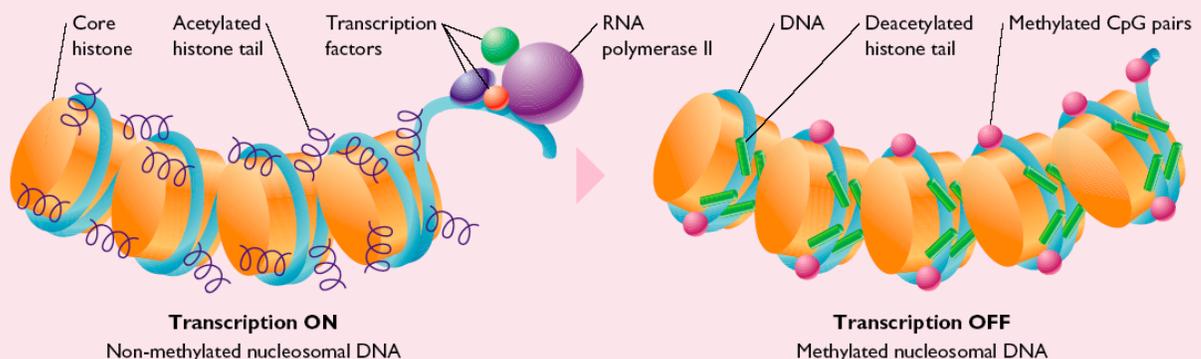


•IL DNA METILATO NEL GENOMA HA UNA STRUTTURA PARTICOLARMENTE CONDENSATA, RESISTENTE AL TRATTAMENTO CON NUCLEASI

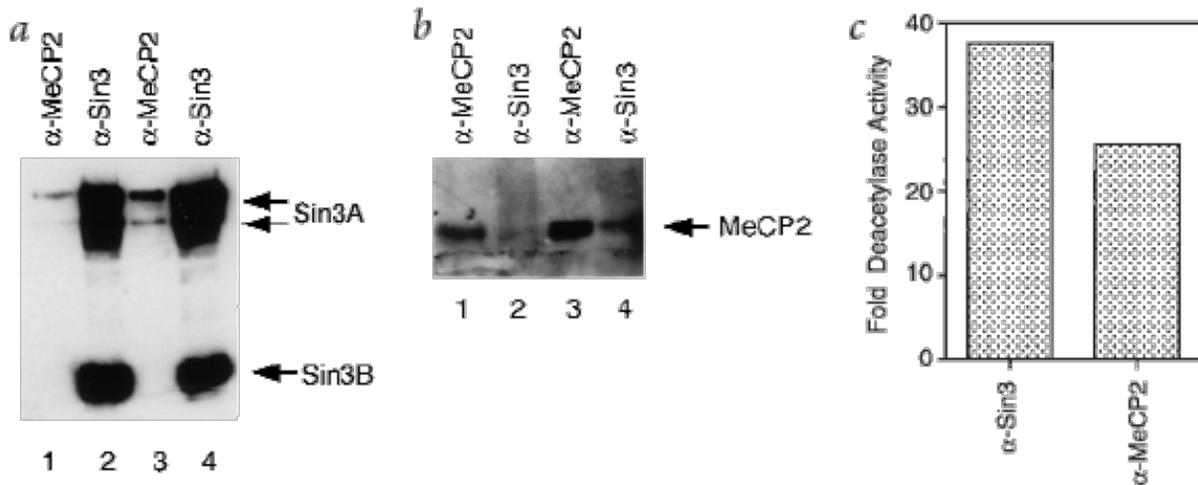
•IN OOCITI DI XENOPUS LA REPRESSIONE TRASCRIZIONALE MEDIATA DALLA METILAZIONE SPESSO SI INSTAURA DOPO UN CERTO TEMPO, UN TEMPO CHE CORRELA CON LA DEPOSIZIONE DEI NUCLEOSOMI SUL TEMPLATO.

**NASCE L'IDEA CHE IL SECONDO MODELLO DI INIBIZIONE INDIRETTA POSSA ESSERE PIU' COMPLICATO.**

Figure 3: The effect of promoter methylation on chromatin structure and transcription



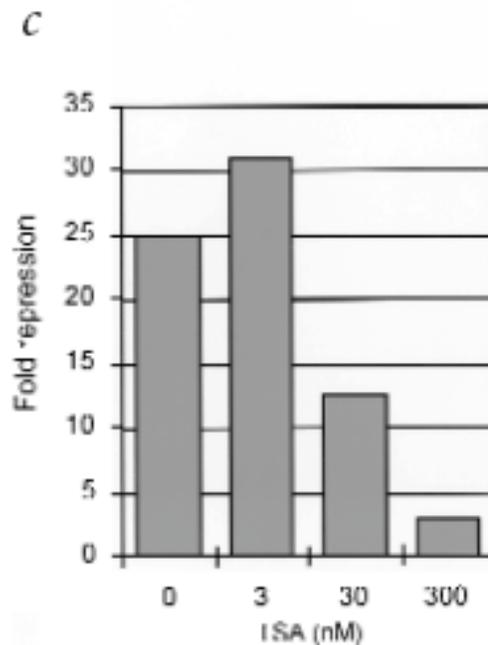
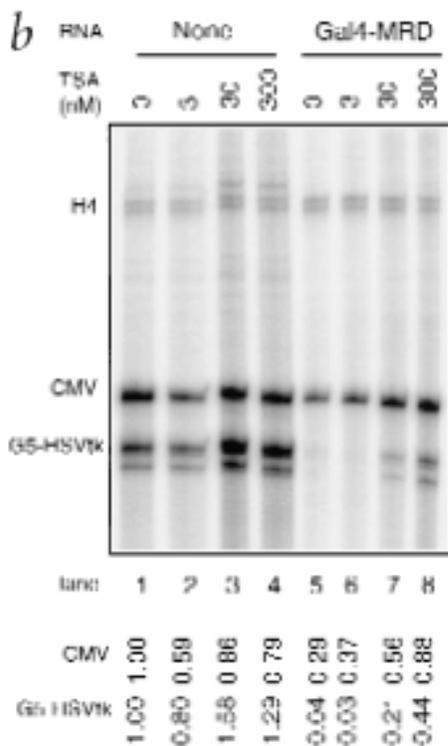
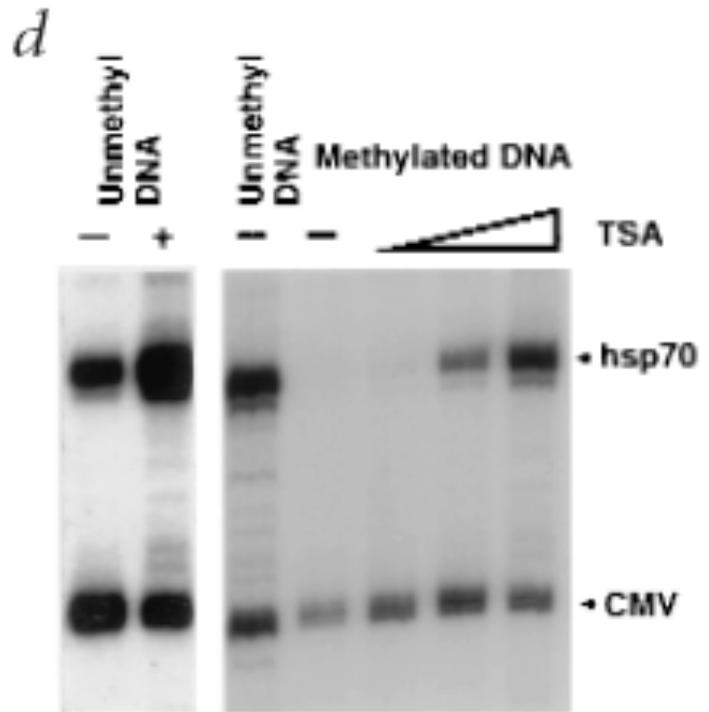
# MeCP2



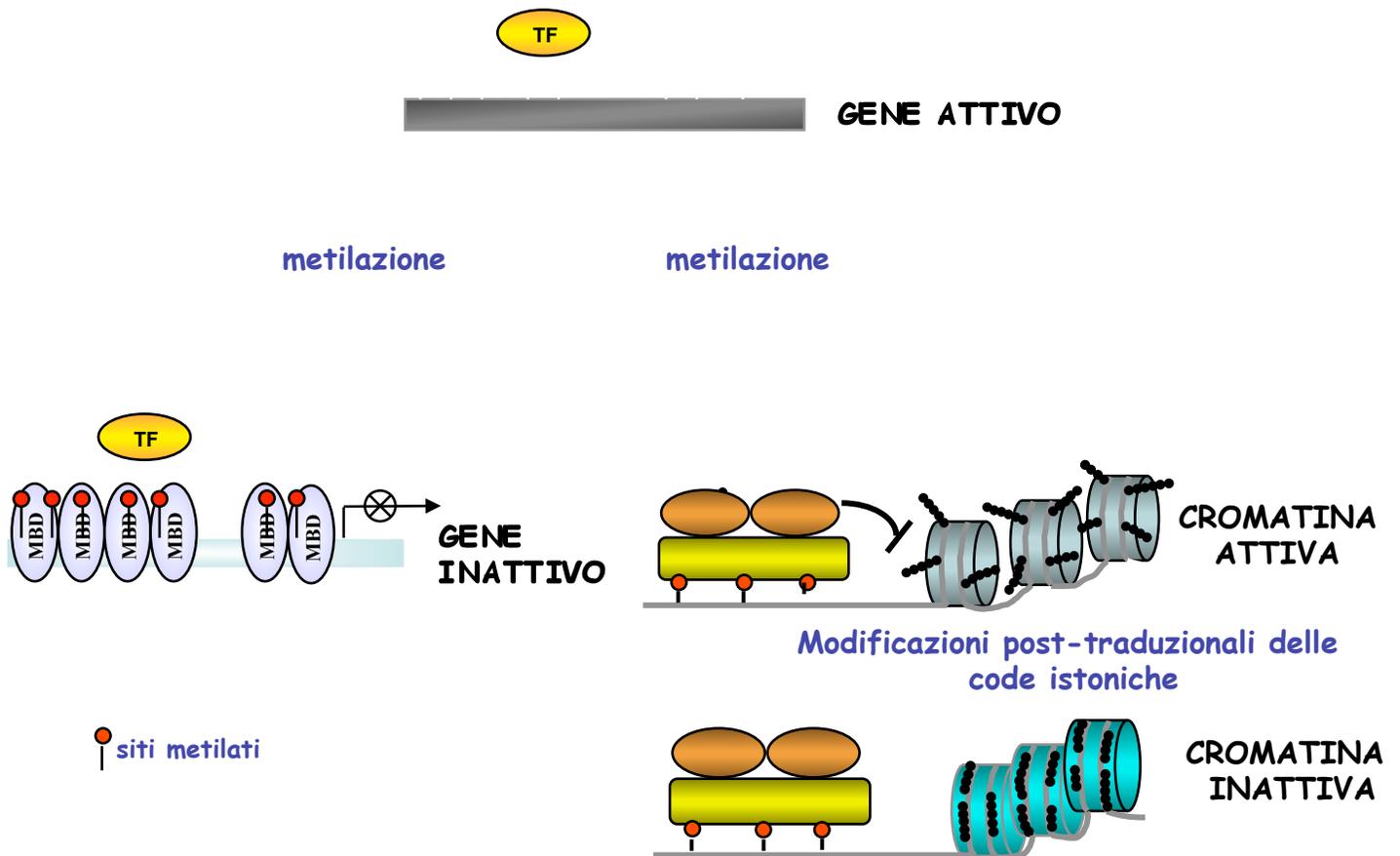
**Fig. 2** MeCP2, Sin3 and histone-deacetylase activity coimmunoprecipitate. Immunoprecipitations of oocyte extract using antibodies against either MeCP2 ( $\alpha$ -MeCP2; *a* and *b*, lanes 1 and 3) or Sin3 ( $\alpha$ -Sin3; *a* and *b*, lanes 2 and 4) were analysed by western-blotting and probed for *a*, Sin3; or *b*, MeCP2. Immunoprecipitations were carried out in either 5 mM KCl (lanes 1 and 2) or 50 mM NaCl (lanes 3 and 4). Sin3A and Sin3B and MeCP2 are indicated. Pre-immune sera did not immunoprecipitate any detectable MeCP2 or Sin3 (data not shown). *c*, Immunoprecipitations were carried out from the BioRex 0.5 M elution using either Sin3 or MeCP2 antibodies and assayed for histone-deacetylase activity (shown as fold activity over background).

•NEL 1997 DUE GRUPPI INDIPENDENTI DIMOSTRANO CHE MECP2 SA INTERAGIRE CON DEI COMPLESSI AD ATTIVITA' ISTON-DEACETILASICA.

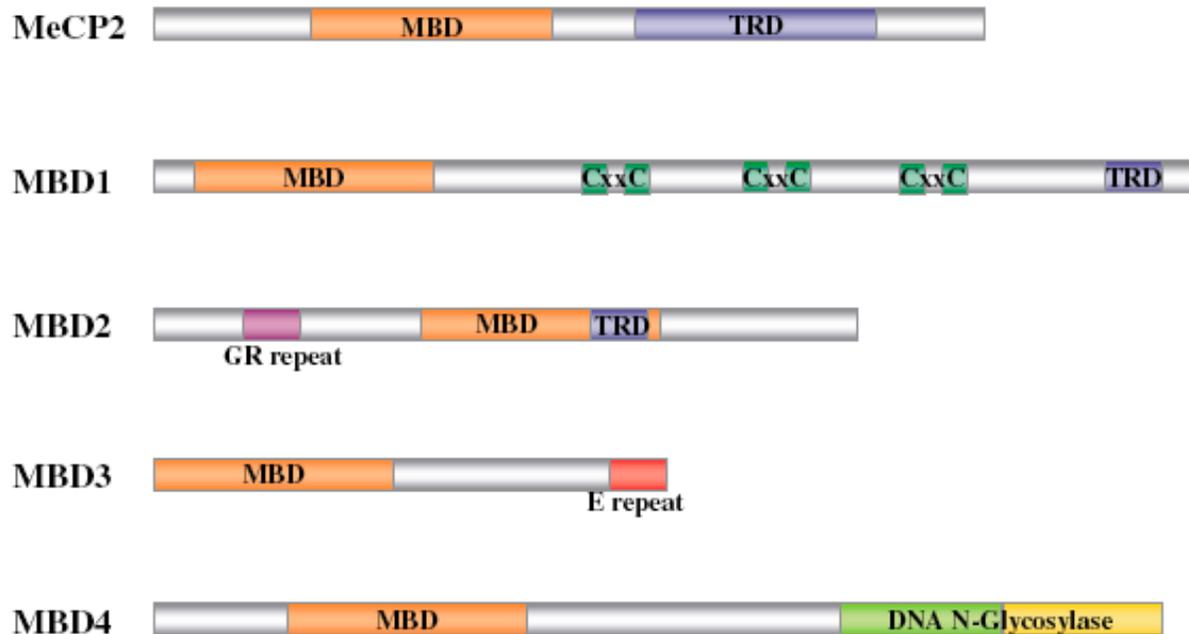
In accordo con il modello la repressione mediata dalla metilazione del DNA può essere parzialmente revertita trattando con inibitori delle iston-deacetilasi



# MeCP2 e/o le Methyl-binding Proteins Portano alla Formazione di una Particolare Struttura Cromatinica



# Le Methyl Binding Proteins

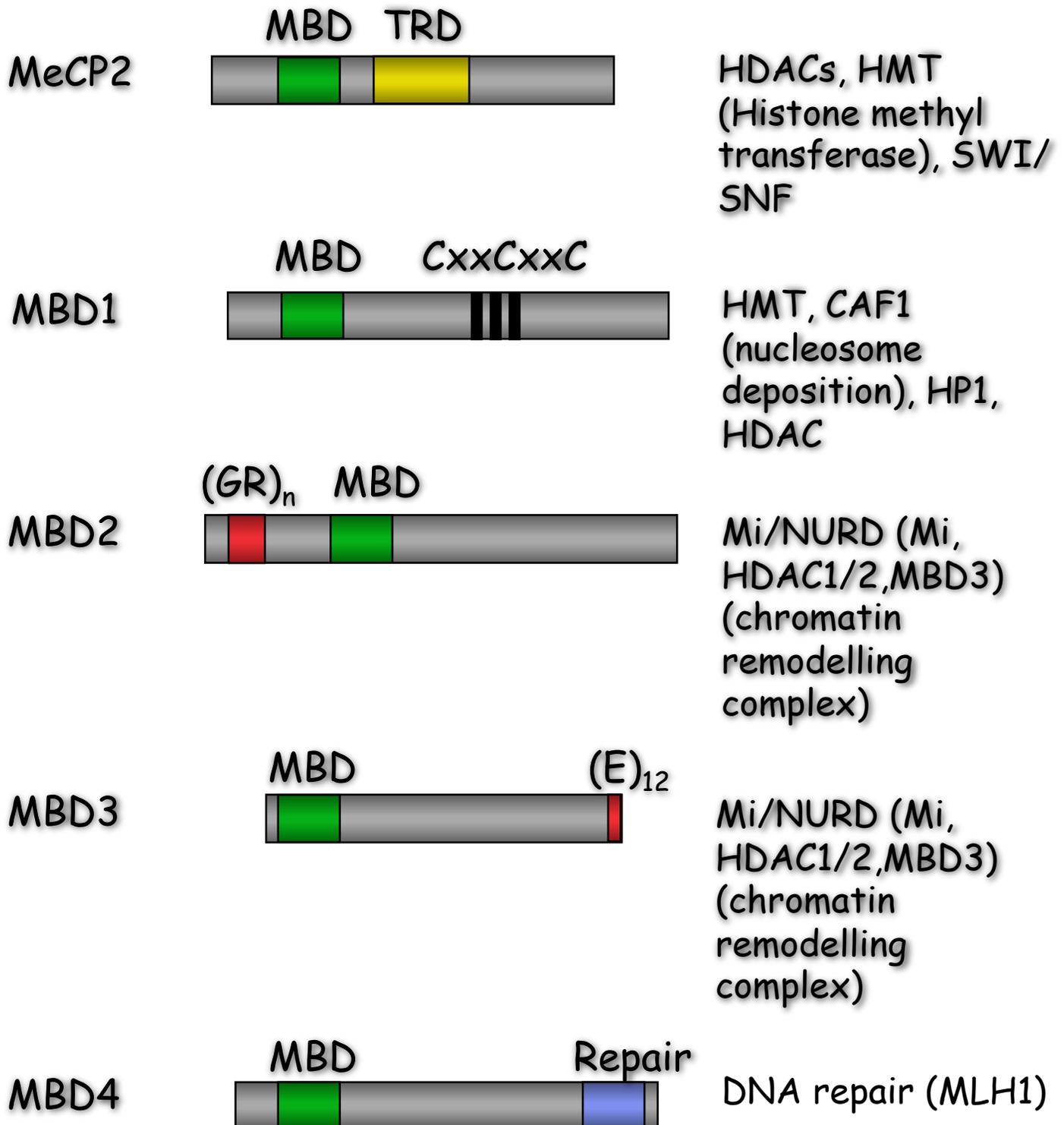


**Fig. 2.** Characteristic domains of the methyl CpG binding (MBD) protein family. The predominant isoform of MeCP2 expressed in human brain has 498 residues. MBD1 has multiple isoforms, ranging in size from 50 to 70 kDa (605 residues, 586 residues, 556 residues, 549 residues and 503 residues). MBD2 contains 414 residues (44 kDa); MBD3 has two splice variants: 285 residues and 253 residues (27 and 32 kDa, respectively). MBD4 contains 554 residues (63 kDa). The MBD sequence motif is depicted as an orange box in each protein. Other defined sequence motifs in the individual MBD family members are also depicted.

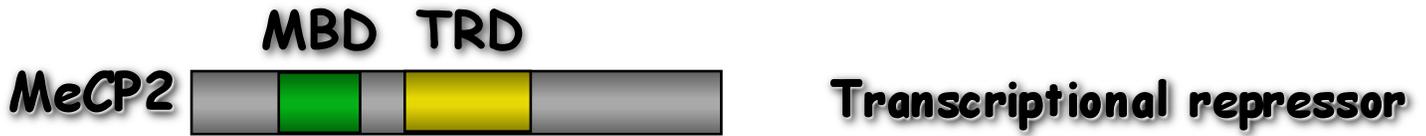
•FUORI DAL MBD QUESTE PROTEINE NON SI ASSOMIGLIANO.

•IN GENERALE QUESTE PROTEINE SONO UBIQUITARIAMENTE ESPRESSE NEI TESSUTI SOMATICI.

# THE METHYL BINDING PROTEINS MODIFY CHROMATIN STRUCTURE



# Chi Interpreta la Metilazione del DNA?



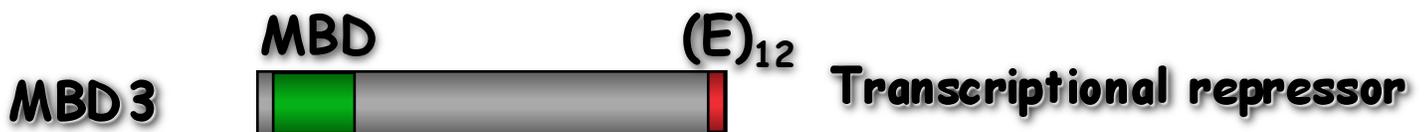
**MeCP2<sup>-/-</sup> complex  
neurological defects**



**MBD1<sup>-/-</sup> defects  
in neurogenesis**



**MBD2<sup>-/-</sup> defective  
in maternal behavior**



**MBD3<sup>-/-</sup> early  
developmental arrest**

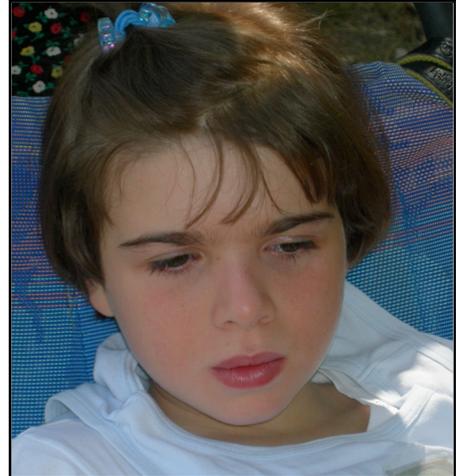


LA METILAZIONE DEL DNA E  
LE PATOLOGIE AD ESSA  
ASSOCIATE

# La Metilazione Del DNA Puo' Indurre Diverse Patologie Attraverso Tre Meccanismi Fondamentali:

- 1. DANNI AL DNA CHE INDUCONO TUMORI E MALATTIE EREDITARIE**
- 2. ERRATO SILENZIAMENTO DELL'ESPRESSIONE GENICA A DARE SINDROMI GENETICHE DIVERSE DAL CANCRO (RTT, ICF).**
- 3. SILENZIAMENTO SCORRETTO DI SPECIFICI GENI (CANCRO).**

## Cos'è la Sindrome di Rett?

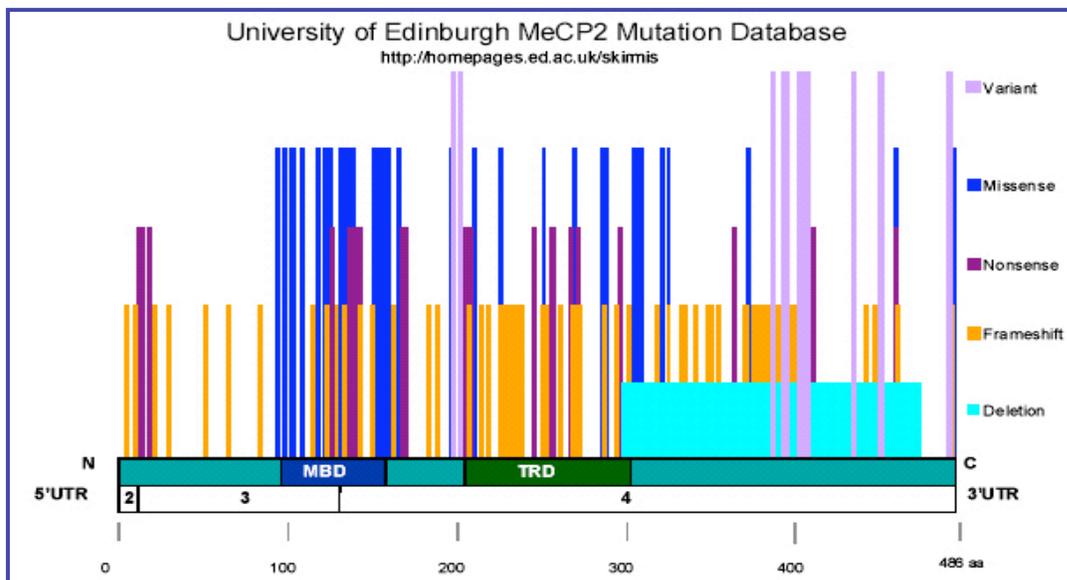


- La Sindrome di Rett e' la seconda causa di ritardo mentale femminile (incidenza 1:10000 nate vive).
- Gli individui affetti nascono sani e sembrano avere uno sviluppo normale per 6-18 mesi.
- Segue un periodo di rapida regressione in cui perdono le abilità acquisite.
- Una complessa malattia caratterizzata da: stereotipia delle mani (hand-washing, clapping e mouthing); apraxia ovvero incapacità di coordinare i movimenti volontari; anomalità respiratorie (apnee e iperventilazione); epilessia; grave curvatura della spina dorsale bruxismo; irregolarità del sonno; frequente agitazione ed irritabilità.

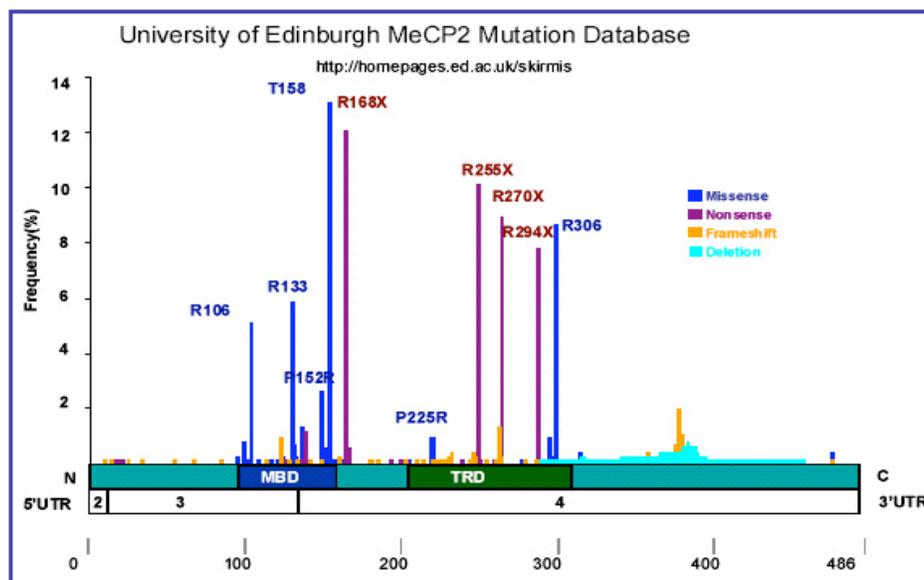
•NEL 1999 VIENE IDENTIFICATA LA CAUSA MOLECOLARE NEL GENE CHE CODIFICA PER MeCP2 CHE E' SITUATO SUL CROMOSOMA X.

•80%-90% DEI PAZIENTI AFFETTI DALLA FORMA CLASSICA DELLA SINDROME PRESENTANO MUTAZIONI IN MeCP2.

### Tipo di mutazione



### Frequenza



## Il modello murino privo di MeCP2 ricapitola le caratteristiche della Sindrome di Rett



---

### **Wild-type**

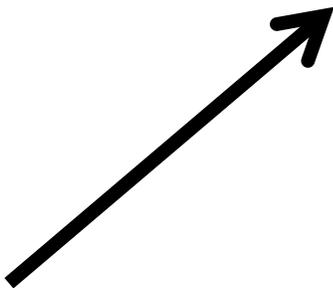
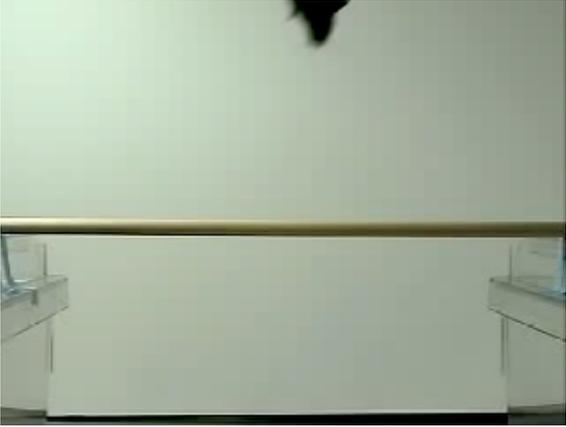
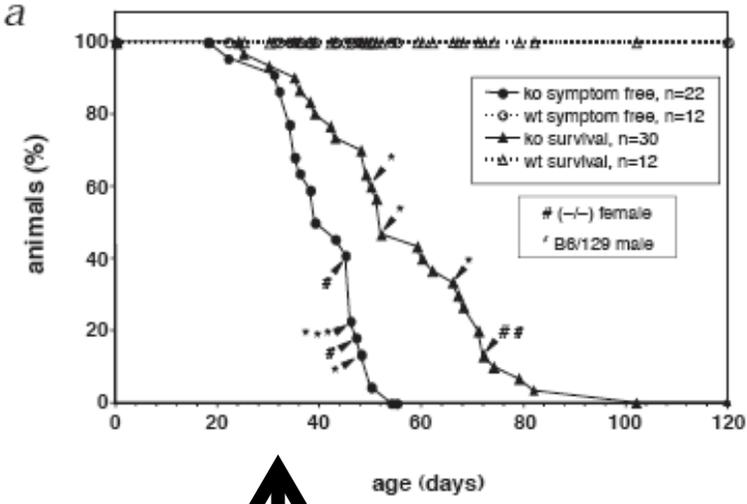
Guy et al (2001). *Nat. Genet.* **27**, 322-326; Chen et al (2001). *Nat. Genet.* **27**, 327-331

### ***Mecp2*-null**

•Il topo ko sviluppa sintomi simili alla Rett. Il topo condizionale mostra che la sindrome di Rett è una malattia esclusivamente neuronale.

•L'espressione di MeCP2 nei topi ko recupera per breve tempo il fenotipo ma in breve gli animali sviluppano un fenotipo che ricorda la Rett. In accordo con ciò, ora sappiamo che duplicazioni del gene MECP2 portano all'insorgenza della Rett nei maschi.

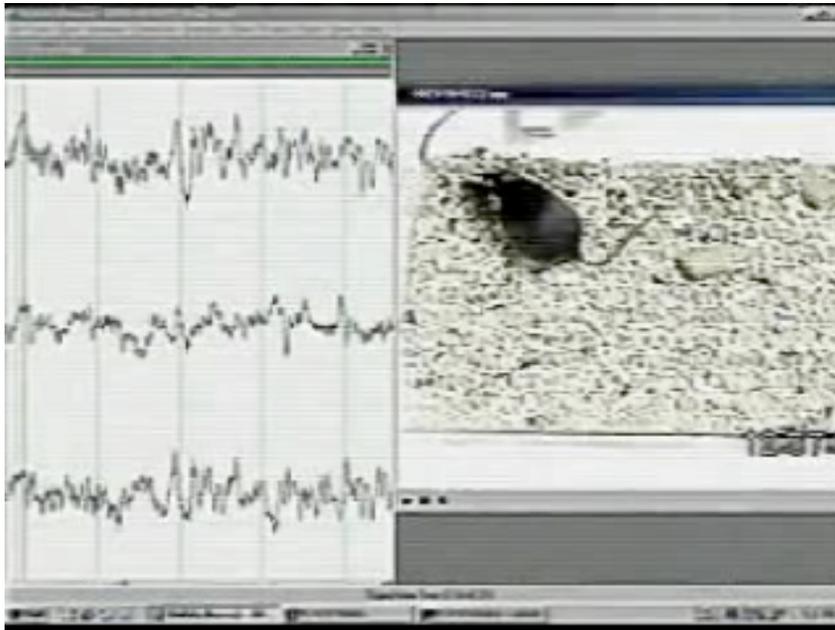
# Sintomi dei topi privi del gene MeCP2.



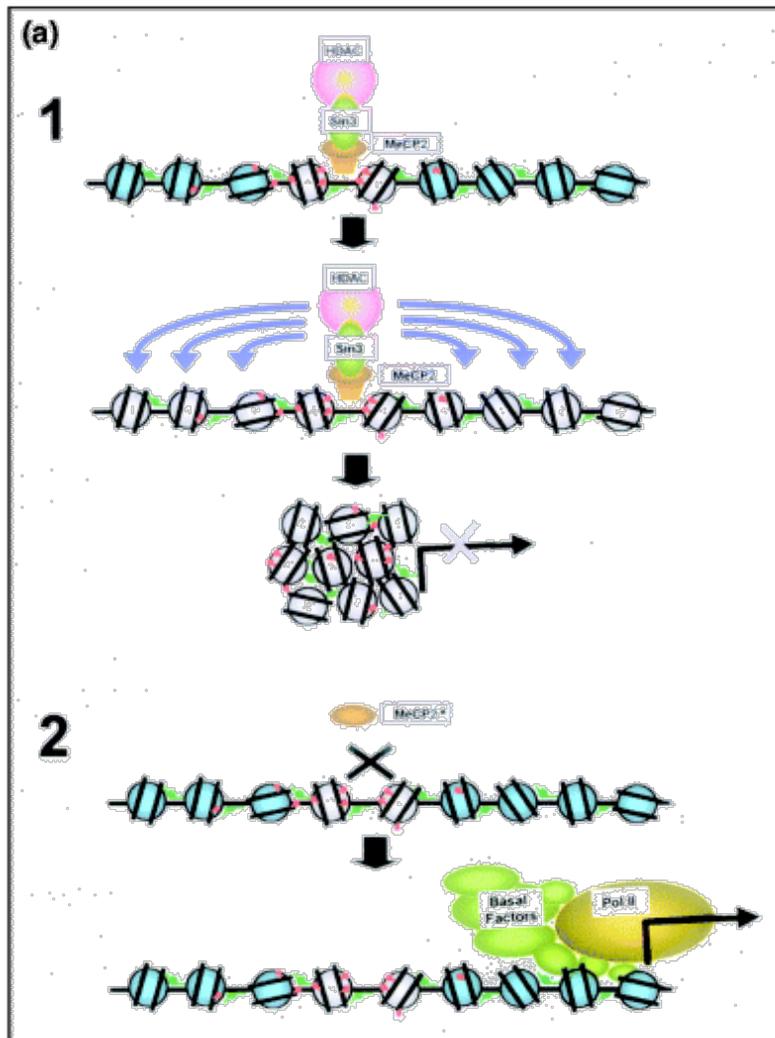
Topi privi del gene MeCP2



## Sintomi dei topi privi del gene MeCP2. II



# Ma Quale E' La Causa Molecolare Dell'insorgenza Della Patologia?



## MODELLO:

**MeCP2 NON REPRIME PIU'  
LA TRASCRIZIONE DI  
UN LARGO NUMERO DI  
GENI.**

## PROBLEMI:

- 1) COME MAI UNA PROTEINA PRESSOCHE' UBIQUITARIA CAUSA UNA MALATTIA PREVALENTEMENTE NEURONALE? RIDONDANZA IN ALTRI TESSUTI
- 2) PERCHE' CONFRONTANDO LA TRASCRIZIONE GLOBALE DI CELLULE WT O RTT O DI TOPI WT O KNOCK-OUT PER MeCP2 SI ASSISTE SOLO A PICCOLE VARIAZIONI DEI LIVELLI DI TRASCRIZIONE?

# MeCP2 Reprime in Modo Specifico Alcuni Geni Neuronali

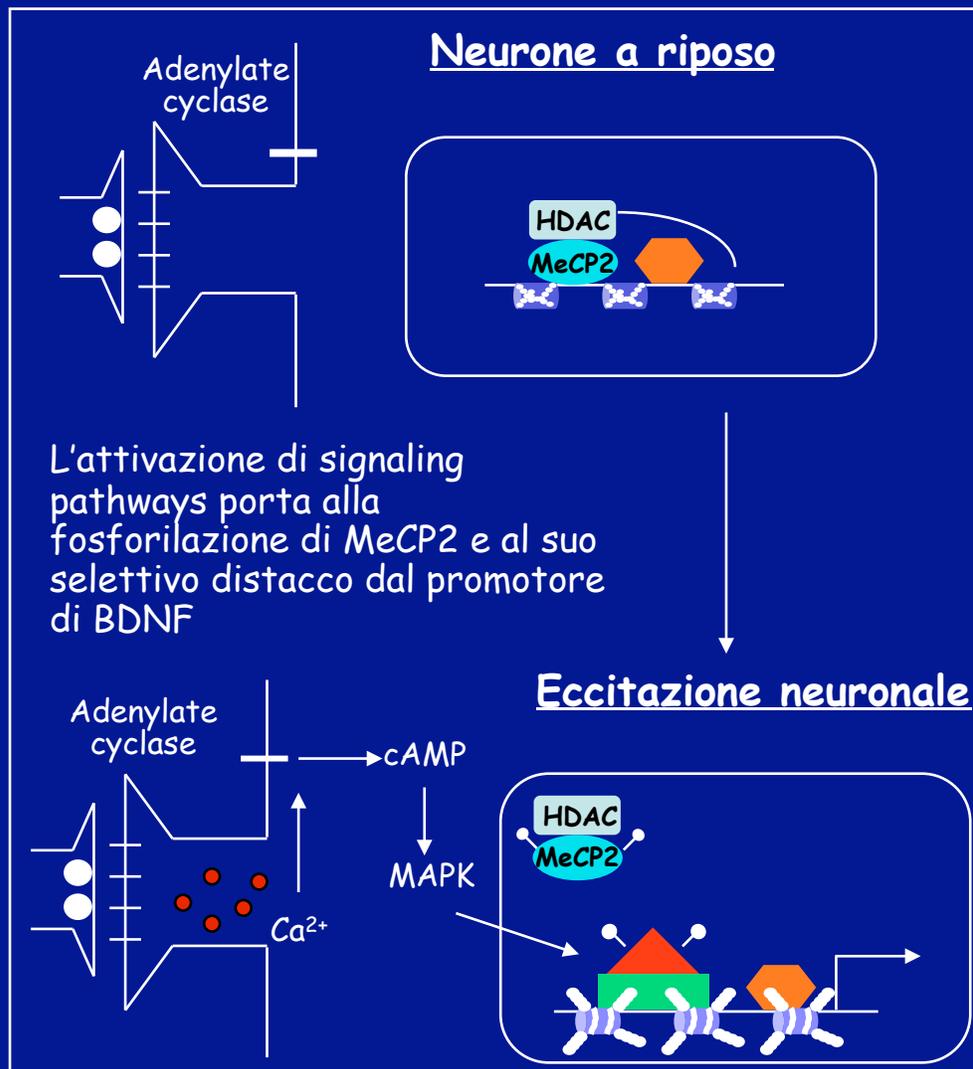
## Derepression of BDNF Transcription Involves Calcium-Dependent Phosphorylation of MeCP2

Wen G. Chen,<sup>1,2</sup> Qiang Chang,<sup>3</sup> Yingxi Lin,<sup>1</sup>  
Alexander Meissner,<sup>3,4</sup> Anne E. West,<sup>1</sup> Eric C. Griffith,<sup>1</sup>  
Rudolf Jaenisch,<sup>3,4</sup> Michael E. Greenberg<sup>1,2\*</sup>

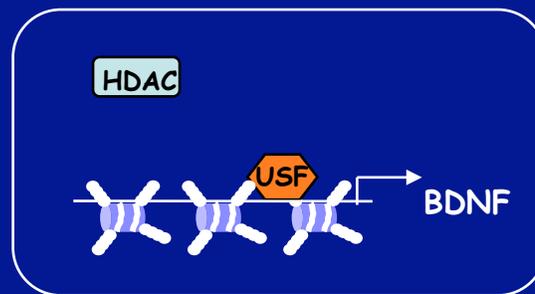
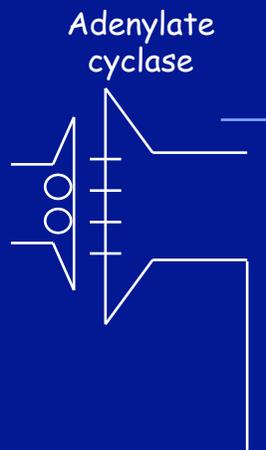
SCIENCE VOL 302 31 OCTOBER 2003

## DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity- Dependent *Bdnf* Gene Regulation

Keri Martinowich,<sup>1,2</sup> Daisuke Hattori,<sup>3\*</sup> Hao Wu,<sup>2\*</sup>  
Shaun Fouse,<sup>4\*</sup> Fei He,<sup>2</sup> Yan Hu,<sup>4</sup> Guoping Fan,<sup>1,4†</sup> Yi E. Sun<sup>1,2†</sup>



# Neurone a riposo di un topo privo di MeCP2



# La Mancanza di MeCP2 Altera Lievemente l'Espressione di Diversi Geni che nel Loro Insieme Portano al Complesso Fenotipo

Table 2 | MeCP2 target genes

Gene	Species	Unigene cluster	Function	Tissue in which gene is expressed	Change in expression level caused by MeCP2	References
<i>BDNF</i>	Mouse	Mm.1442	Survival, neuronal plasticity	Cultured neurons	Upregulated ~2-fold	77,78
<i>hairy2</i>	Xenopus	XL25977	Neuronal differentiation	Whole embryo	Downregulated ~2-fold	93
<i>Fkbp5</i>	Mouse	Mm.276405	Hormonal signalling	Brain (74 days of age)	Upregulated 2.26-fold	76
<i>IGF2</i>	Human	Hs.147470	Cell proliferation	Lymphoblastoid cells	Upregulated 2.21-fold	74
<i>DLX5</i>	Human	Hs.99348	Transcription factor	Lymphoblastoid cells	Upregulated ~2-fold	88
<i>Dlx5</i>	Mouse	Mm.4873	Transcription factor	Brain	Upregulated ~2-fold	88
<i>Dlx6</i>	Mouse	Mm.5152	Transcription factor	Brain	Upregulated ~2-fold	5
<i>Ube3a</i>	Mouse	Mm.9002	Proteolysis	Brain	Downregulated ~2-fold	87
<i>UBE3A</i>	Human	Hs.22543	Proteolysis	Brain (2–20 years of age)	Downregulated ~2-fold	87
<i>Sgk1</i>	Mouse	Mm.28405	Cellular stress response	Brain (74 days of age)	Upregulated 3.44-fold	76
<i>MPP1</i>	Human	Hs.305360	Signal transduction	Lymphoblastoid cells	Upregulated 3.32-fold	74

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DLX, distal-less homeobox; Fkbp5, FK506-binding protein 5; IGF2, insulin-like growth factor 2; MeCP2, methyl-CpG-binding protein 2; MPP1, palmitoylated membrane protein 1; Sgk1, serum/glucocorticoid kinase 1; Ube3a, ubiquitin protein ligase E3A.

Ma quanti e quali geni causano il complesso fenotipo della Sindrome di Rett?

# Fenotipi Associati a Disfunzioni in MeCP2

**Table 1. Phenotypes of MeCP2 Dysfunction**

MeCP2 State	Sex-Associated Syndromes and Symptoms	
	Female	Male
Loss of Function	Classic RTT	Infantile encephalopathy
	Atypical RTT	Classic RTT (47,XXY or somatic mosaic)
	Angelman-like syndrome	Mental retardation with motor deficits
	Mental retardation with seizures	Bipolar disease, mental retardation, and tremors
	Mild mental retardation	Juvenile-onset schizophrenia, mental retardation, and tremors
	Learning disability	Mental retardation, psychosis, pyramidal signs, and macroorchidism
	Autism	
Overexpression	Normal	
	Preserved speech variant of RTT	Severe mental retardation and RTT features
		Nonspecific X-linked mental retardation

• Mutazioni in *MECP2* portano a molti diversi disordini neuropsichiatrici.

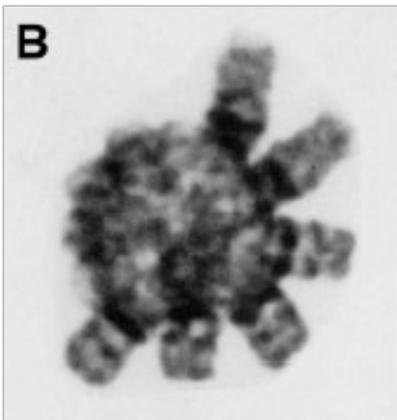
# La Sindrome Da Immunodeficienza, Instabilita' Centromerica, Anormalita' Facciali (ICF)

- Sindrome recessiva autosomica
- 50 pazienti al mondo. Vita media 8 anni per continue infezioni alle vie respiratorie. 1/3 sono caratterizzati da ritardi nelle milestones dello sviluppo e da ritardo mentale.

## Caratterizzata:

1. da un' importante diminuzione delle immunoglobuline nel siero nonostante un normale numero di cellule B;
2. instabilità dell'eterocromatina pericentromerica dei cromosomi 1, 16 e a volte 9 che porta a tipici e distintivi riarrangiamenti;
3. ipometilazione del DNA satellite e dismorfismi facciali.

- In genere il genoma dei pazienti non è ipometilato ma lo è severamente il DNA satellite dei cromosomi 1, 16, 9. Il DNA satellite centromerico di questi cromosomi nei pazienti ICF è in genere decondensato e mostra una forte tendenza a rompersi e a riunirsi causando riarrangiamenti cromosomici. I cromosomi acquisiscono lunghe braccia e i linfociti stimolati ad andare in mitosi hanno tipiche configurazioni multiradiali dei cromosomi
- Demetilato anche satellite dell'Y nei maschi e alcune regione del corpo di Barr.



regulated (red circle), respectively. **B:** The effect of DNA hypomethylation on chromosome structure. The picture shows an aberrant chromosome from a patient diagnosed with ICF syndrome. ICF patients lack the activity of the DNMT3B DNA methyltransferase and show extensive demethylation of pericentromeric satellite DNA. Aberrant chromosomes are characterized by the formation of multiradial figures and by the decondensation of centromeric heterochromatin (reproduced and adapted from Smeets DF, Moog U, Weemaes CM, Vaes-Peeters G, Merckx GF, Niehof JP, Hamers G. Hum Genet 1994;94:240–246 by permission of Springer Verlag).

•I pazienti nel 60-70% dei casi portano mutazioni bialleliche eterozigoti nel dominio catalitico di DNMT3b. Si pensa che la totale assenza dell'attività sia letale come nel topo. Il fenotipo probabilmente correla con l'attività residua.

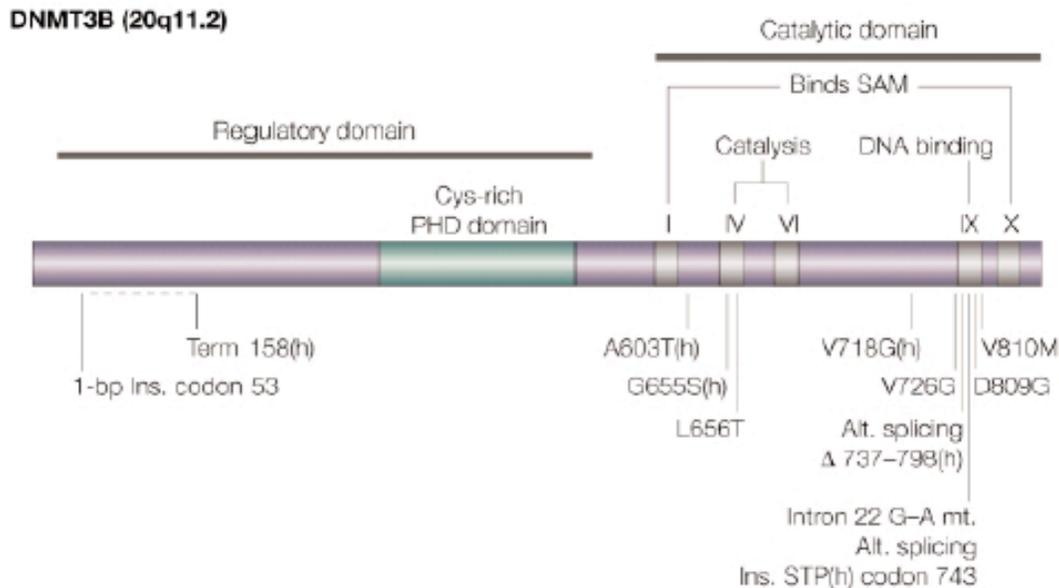


Figure 5 | **Summary of mutations in DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) identified in ICF syndrome patients**<sup>3,83,84</sup>. Many individuals were compound heterozygotes for two independent mutations (denoted with an h). Nearly all mutations affect the catalytic domain. Loss of catalytic activity was confirmed for the D809G mutation in cell line overexpression studies<sup>83</sup>. The conserved methyltransferase motifs within the catalytic domain are indicated with roman numerals. The cysteine-rich PHD (plant homeodomain) region in the N terminus is highly homologous to a PHD motif within the  $\alpha$ -thalassaemia, mental retardation, X-linked (ATR-X) protein<sup>85</sup>. The S-adenosyl-L-methionine (SAM) binding domain is indicated, as well as motifs involved in catalysis (IV, VI) and DNA binding (IX). Several mutations (mt.) result in altered splicing patterns (Alt.) and the insertion (Ins.) or deletion ( $\Delta$ ) of coding sequence.

•Fuori dal dominio catalitico vi sono regioni d'interazione prevalentemente con repressori e in genere queste regioni non sono mutate. Esiste solo una mutazione riportata che delocalizza la proteina e non associandosi più all'eterocromatina porta a satellite demetilato.

•Topi nulli muoiono tra E13.5 e E16.5. Topi con due mutazioni missenso nel dominio catalitico in genere muoiono a un giorno di vita ma alcuni sopravvivono fino ad adulti.

•Sono più piccoli, anomalie facciali, sistema immunitario difettoso ma per una riduzione di timociti causata da un aumento di apoptosi.

•Hanno DNA satellite ipometilato. Cromosomi vanno incontro a rotture e in verità anche problemi di aneuploidia che nell'uomo non si riscontrano.

•Per HPLC in brain trovato che ipometilazione è a carico del 7% delle 5metC.

•Fatti diversi microarrays e molti geni deregolati potrebbero avere senso con la patologia. Non erano però tutti demetilati (30-50%).

•Il modello attuale è che la causa della malattia sia l'ipometilazione principalmente dell'eterocromatina costitutiva (no chr Y) che normalmente influenza l'espressione genica via trascrizione di miRNA, e organizzazione dei territori nucleari (in effetti cellule in interfase hanno grandi PML bodies).

**LA METILAZIONE DEL DNA PUO'  
INDURRE DIVERSE PATOLOGIE  
ATTRAVERSO TRE MECCANISMI  
FONDAMENTALI:**

- 1. DANNI AL DNA CHE INDUCONO  
TUMORI E MALATTIE EREDITARIE**
- 2. ERRATO SILENZIAMENTO GENERALE  
DELL'ESPRESSIONE GENICA (RTT?  
ICF?).**
- 3. SILENZIAMENTO SCORRETTO DI  
SPECIFICI GENI (CANCRO).**

## Frequent Target DNA Sequences for Cancer-Associated Hypermethylation or Hypomethylation

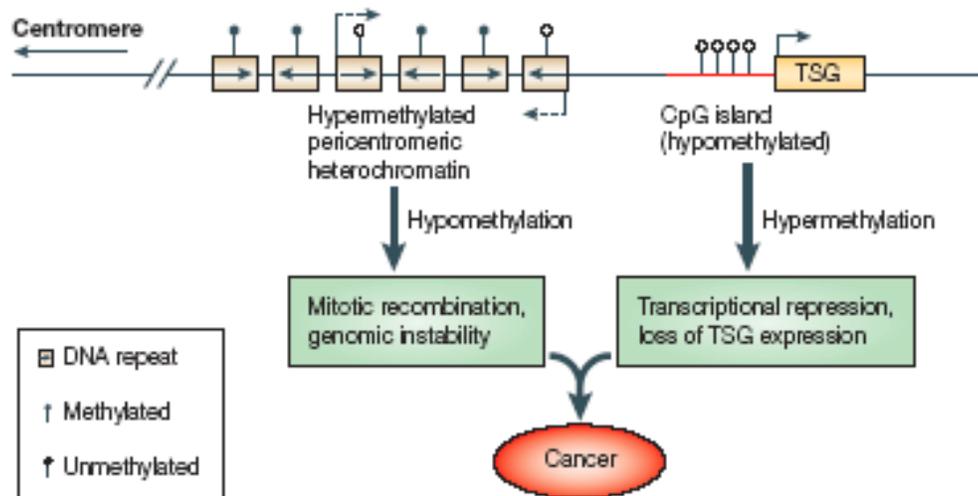
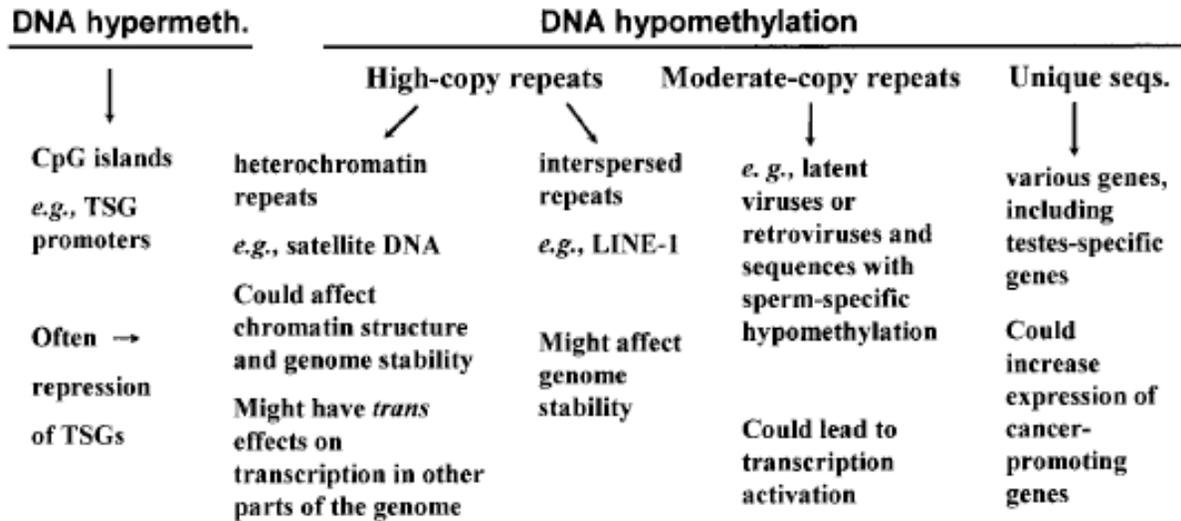


Figure 1 | DNA methylation and cancer. The diagram shows a representative region of genomic DNA in a normal cell. The region shown contains repeat-rich, hypermethylated pericentromeric heterochromatin and an actively transcribed tumour suppressor gene (TSG) associated with a hypomethylated CpG island (indicated in red). In tumour cells, repeat-rich heterochromatin becomes hypomethylated and this contributes to genomic instability, a hallmark of tumour cells, through increased mitotic recombination events. *De novo* methylation of CpG islands also occurs in cancer cells, and can result in the transcriptional silencing of growth-regulatory genes. These changes in methylation are early events in tumorigenesis.

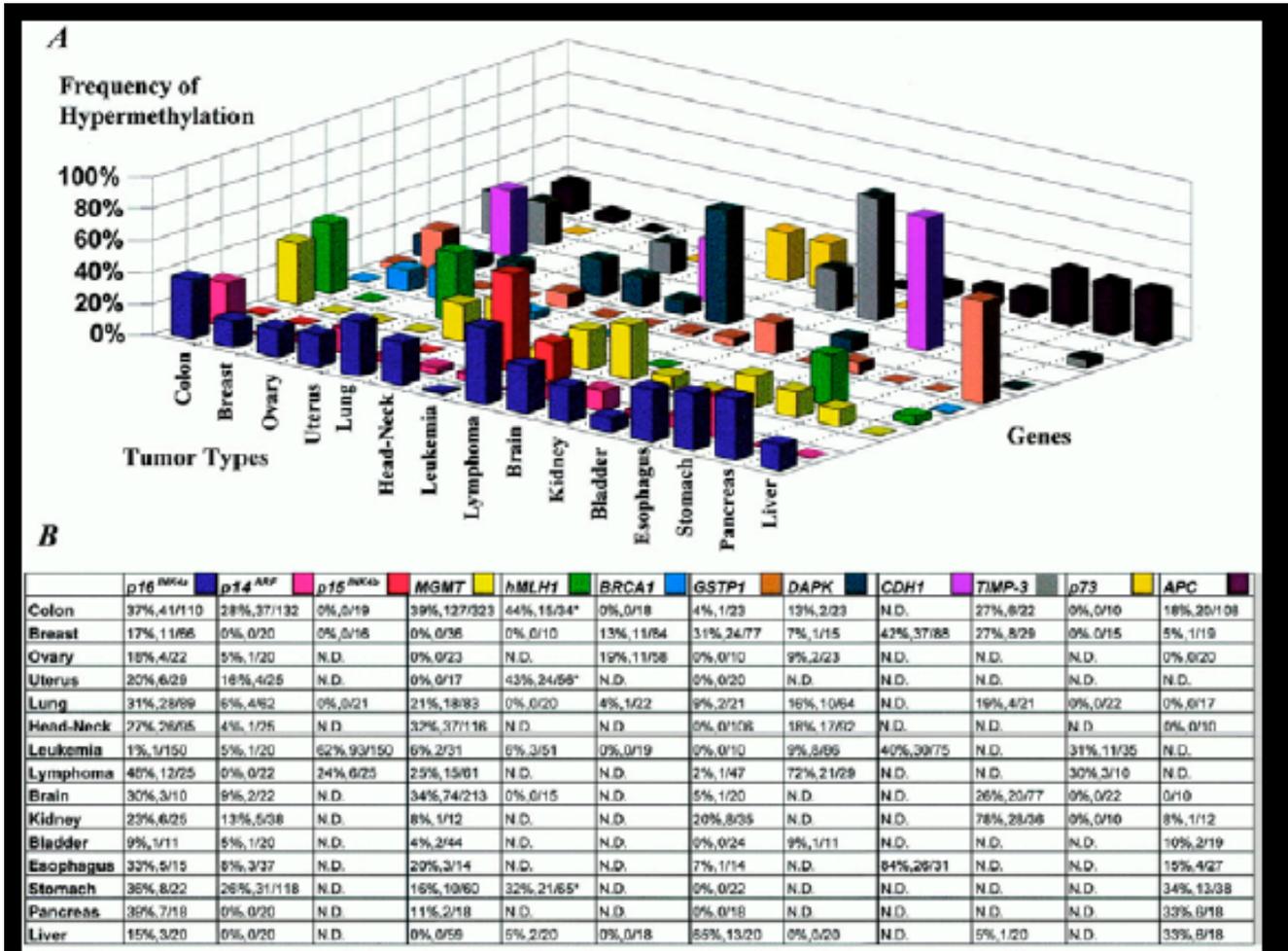
# Quali Sono I Principali Cambiamenti Nella Metilazione Del DNA Nel Cancro? Quali Gli Effetti?

Table 1 | Hypomethylation and hypermethylation in cancer

	Hypomethylation	Hypermethylation
Frequency	Ubiquitous even in the earliest benign tumours	Some early hypermethylation, with increasing frequency with tumour progression
Targets	Repetitive sequences, coding regions, promoters	Promoters
Primary/secondary change	Primary?	Can be secondary to gene silencing, chromatin changes
Possible effects in humans	Chromosomal instability, loss of imprinting, oncogene activation	Maintenance of tumour-suppressor-gene silencing
Effects in animal models	Lymphoma, increased intestinal tumour initiation, liver cancer	Increased intestinal tumour progression
Variation in the age of onset	Yes	Yes
Therapy	Inhibitor side effect?	Inhibitor therapy

formation. Therefore, both hypomethylation and hypermethylation are important in cancer. Hypomethylation generally arises earlier and is strongly linked to chromosomal instability and loss of imprinting<sup>6-8,46,47</sup>, whereas hypermethylation is associated with promoters and can arise secondary to gene silencing<sup>48-50</sup>, but might be a target for epigenetic therapy<sup>30</sup>.

# Ogni Tumore Ha Un Suo Set Di Geni Specifico Che Viene Preferenzialmente Metilato



**MA PERCHE' IN CERTI TUMORI SI HA LA SPECIFICA IPERMETILAZIONE DI ALCUNE CpG ISLAND? O IN ALTRI TERMINI QUAL E' IL MECCANISMO CHE PROTEGGE DALLA METILAZIONE DELLE CpG ISLANDS NELLE CELLULE NORMALI? E COSA VA STORTO NELLE CELLULE TUMORALI?**

•L'IPERMETILAZIONE DEL DNA APPARE OGGI COME UN IMPORTANTE MEZZO PER LA DIAGNOSI E LA PROGNOSI DI UN TUMORE

•L'IPOMETILAZIONE DEL DNA PUO' ANCHE ESSERE UTILE PER DIAGNOSTICARE O PER LA PROGNOSI DI UN TUMORE. IN ALCUNI TUMORI L'IPOMETILAZIONE DI SPECIFICHE SEQUENZE CHE POSSONO ESSERE RIPETUTE O SINGLE COPY CORRELA SIGNIFICATIVAMENTE CON LA PROGRESSIONE DEL TUMORE. DIVERSI STUDI MOSTRANO INOLTRE COME UNA SIGNIFICATIVA IPOMETILAZIONE DEL GENOMA SIA UN SEGNO DI CATTIVA PROGNOSI.

•QUINDI SERVONO SIA SAGGI PER VALUTARE L'IPERMETILAZIONE CHE L'IPOMETILAZIONE DEL GENOMA.

# EPIGENOMICA

## *Tumour classification by methylation patterns*

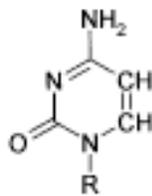
Several groups have shown that tumour classes can be determined by microarray-based expression profiling. Golub and colleagues (Golub *et al.*, 1999) investigated the expression levels of some 6800 genes and discovered that the profiles of just 50 informative genes were sufficient to distinguish between acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and acute myeloid leukaemia (AML). Using a similar gene expression approach, subclasses of diffuse large B-cell lymphoma could be classified according to their differences in response to therapy and disease outcome (Alizadeh *et al.*, 2000).

A number of recent studies have also shown an association between the pattern of DNA methylation in a tumor cell and tumor development. Costello and colleagues used restriction landmark genomic scanning to show that methylation patterns are tumour-type specific (Costello *et al.*, 2000). Highly characteristic DNA methylation patterns have been shown for breast cancer cell lines (Huang *et al.*, 1999). Unique hypermethylation profiles, in several types of cancer, have also been demonstrated for a limited number of genes (Eads *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2001). Zion and colleagues showed that *de novo* methylation of the normal ABL promoter, embedded in the BCR-ABL fusion gene, could be used as a reliable marker for tracking the progression of CML (Zion *et al.*, 1994). As with mRNA expression profiles, genome-wide methylation patterns should represent a molecular fingerprint of cancer tissues; determination of susceptibility to malignancy and prediction of outcome may be feasible using methylation profiling.

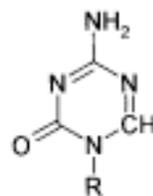
# LA FARMACOLOGIA DELLA METILAZIONE

•IL FATTO CHE UN TUMORE ORIGINI DA IPERMETILAZIONE E NON LOH CI DA' UNA POSSIBILTA' TEORICA DI RIACCENDERE QUEL GENE LEVANDO LA METILAZIONE (TERAPIA EPIGENETICA).

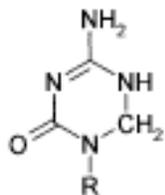
•SI STANNO USANDO INIBITORI DELLE DNMT (AZACITIDINA E ZEBULARINA)



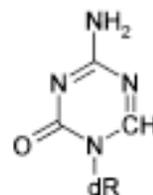
Cytidine (Cyd)



5-Azacytidine (ZCyd)



5,6-Dihydroazacytidine (DZCyd)



5-Aza-2'-deoxycytidine (ZdCyd)

•PER RAGIONI IGNOTE LE LINEE CELLULARI TUMORALI TRATTATE RISPONDONO AL FARMACO, QUELLE NORMALI NO.

**•QUESTI FARMACI SONO SPESSO TOSSICI FORSE PERCHE' DANNEGGIANO IL DNA.**

**•SI STA ORA CERCANDO DI USARE BASSE DOSI DI AZA UNITE AD INIBITORI DELLE HDAC.**

**•BISOGNA COMUNQUE ESSERE CAUTI PERCHE' SICURAMENTE L'IPOMETILAZIONE DEL GENOMA NON E' SUFFICIENTE PER FARE VENIRE IL CANCRO (VEDI ICF) MA CONTRIBUISCE ALLA TUMORIGENESI E/O ALLA PROGRESSIONE DEL TUMORE. QUINDI IL FARMACO POTREBBE AVERE UN INIZIALE BENEFICIO MA POI ACCELERARE LA VELOCITA' DEL TUMORE DI RESIDUE CELLULE CANCEROSE.**

**NON SEMBRA CAUSARE UNA GENERALE ATTIVAZIONE DEL GENOMA PROBABILMENTE PERCHE' LA REPRESSIONE AVVIENE A PIU' STADI MA CI SONO PERPLESSITA' PER QUEL CHE CONCERNE L'ATTIVAZIONE DELLE SEQUENZE PARASSITICHE.**