



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

Geni che “sfuggono” all'inattivazione del cromosoma X: potenziali contributori alla
sindrome di Klinefelter

Genes that “escape” from X-chromosome inactivation: potential contributors to
Klinefelter syndrome

Tesi di Laurea di:
Angela Carabotto

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Marco Barucca

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2019/2020

GENI CHE “SFUGGONO” ALL’INATTIVAZIONE DEL CROMOSOMA X: Potenziali contributori alla sindrome di Klinefelter

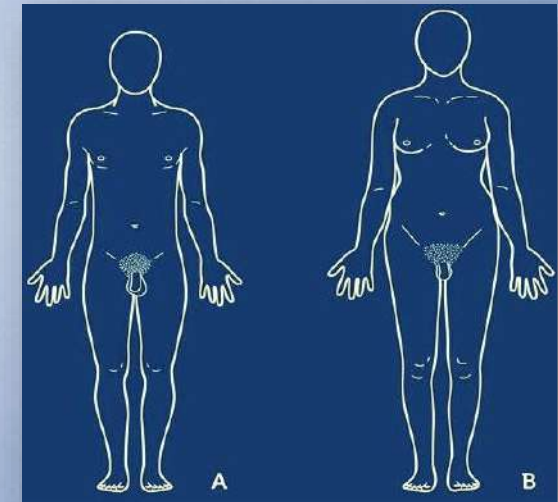


Fig.1



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Corso di Laurea in: Scienze Biologiche

Studentessa: Angela Carabotto

Professore: Marco Barucca

Anno Accademico: 2019/2020

INTRODUZIONE

La determinazione del sesso nei mammiferi, e dunque nell'uomo, è definita dalla presenza di cromosomi sessuali:

- XY per i maschi;
- XX per le femmine.

Un processo biologico detto **inattivazione del cromosoma X** prevede la perdita di funzione di uno dei due cromosomi delle femmine: in questo modo si bilancia la quantità dei geni ereditati. Insieme a Xist (X-inactive specific transcript) entrano in gioco anche altri fattori, sullo stesso cromosoma X, che vanno ad attivare Xist e quindi 'aiutano' Xist RNA a silenziare il cromosoma X. Nonostante questi molteplici percorsi per garantire il silenziamento, alcuni geni su Xi continuano ad essere espressi e quindi sfuggono all'inattivazione.

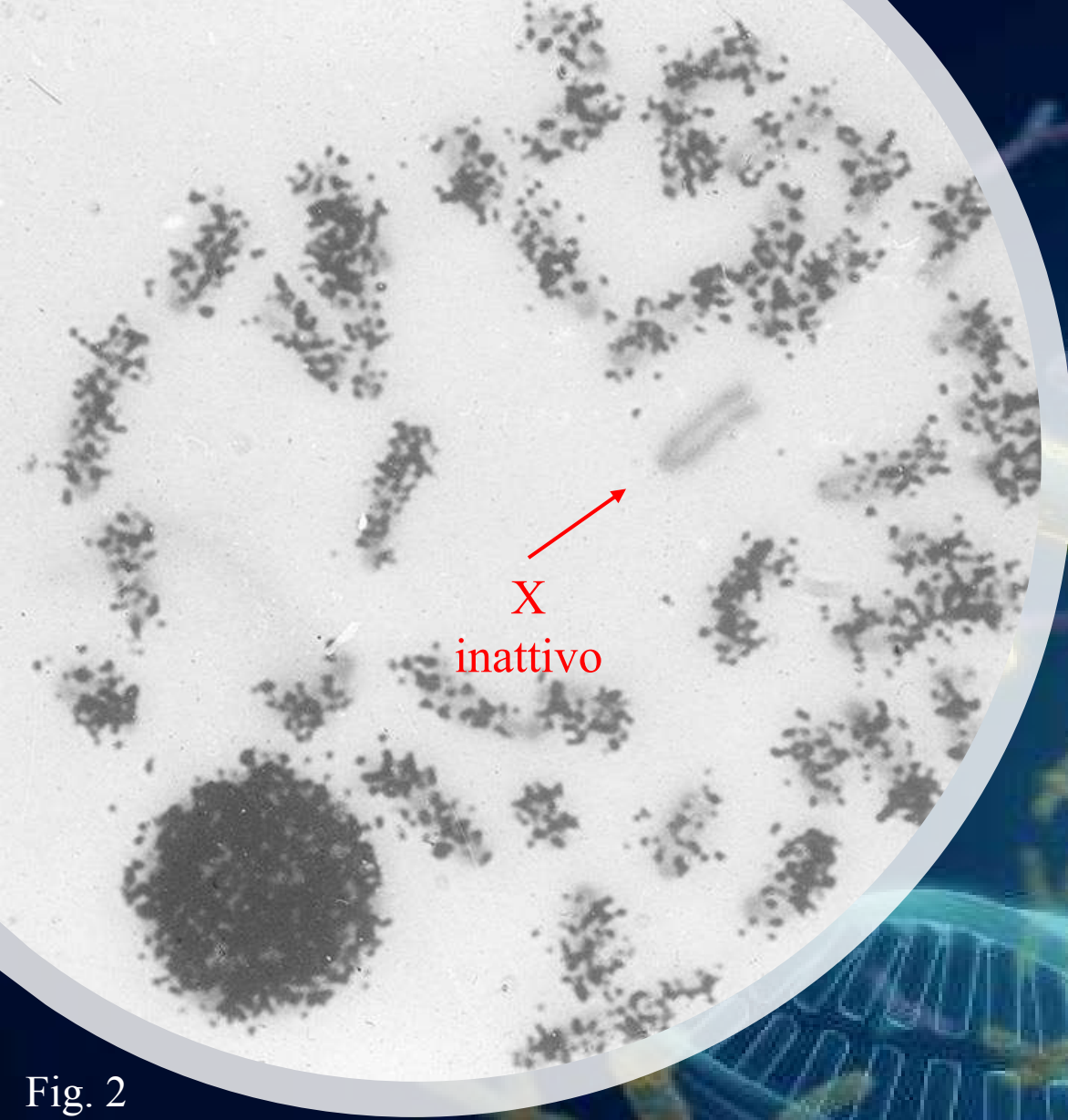
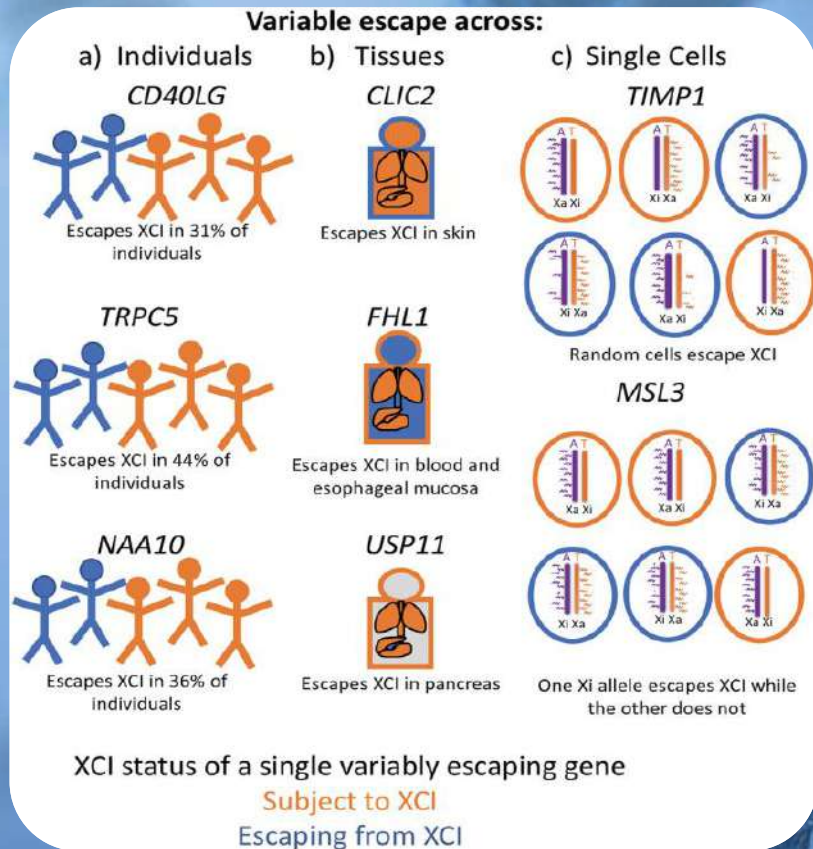


Fig. 2

PROVE CHE I GENI “FUGGONO” DA XCI



I progressi nelle tecniche genomiche hanno consentito l'analisi dell'attività trascrizionale dall'Xi per oltre 600 degli oltre 1000 geni legati all'X. Tra i limiti alla determinazione dello stato di inattivazione dei geni vi sono:

- espressione limitata del gene;
- bassi livelli di espressione di alcuni geni;
- polimorfismi informativi limitati all'interno dei geni.

Mentre alcuni geni sembrano essere coerenti nella fuga dall'XCI, che si verifica a livello delle singole cellule in tutti gli individui e in tutti i tessuti, molti geni invece sono variabili nella loro inattivazione, sfuggendo dall'XCI.

ESPRESSIONE BIALLELICA E IBRIDI DI CELLULE SOMATICHE

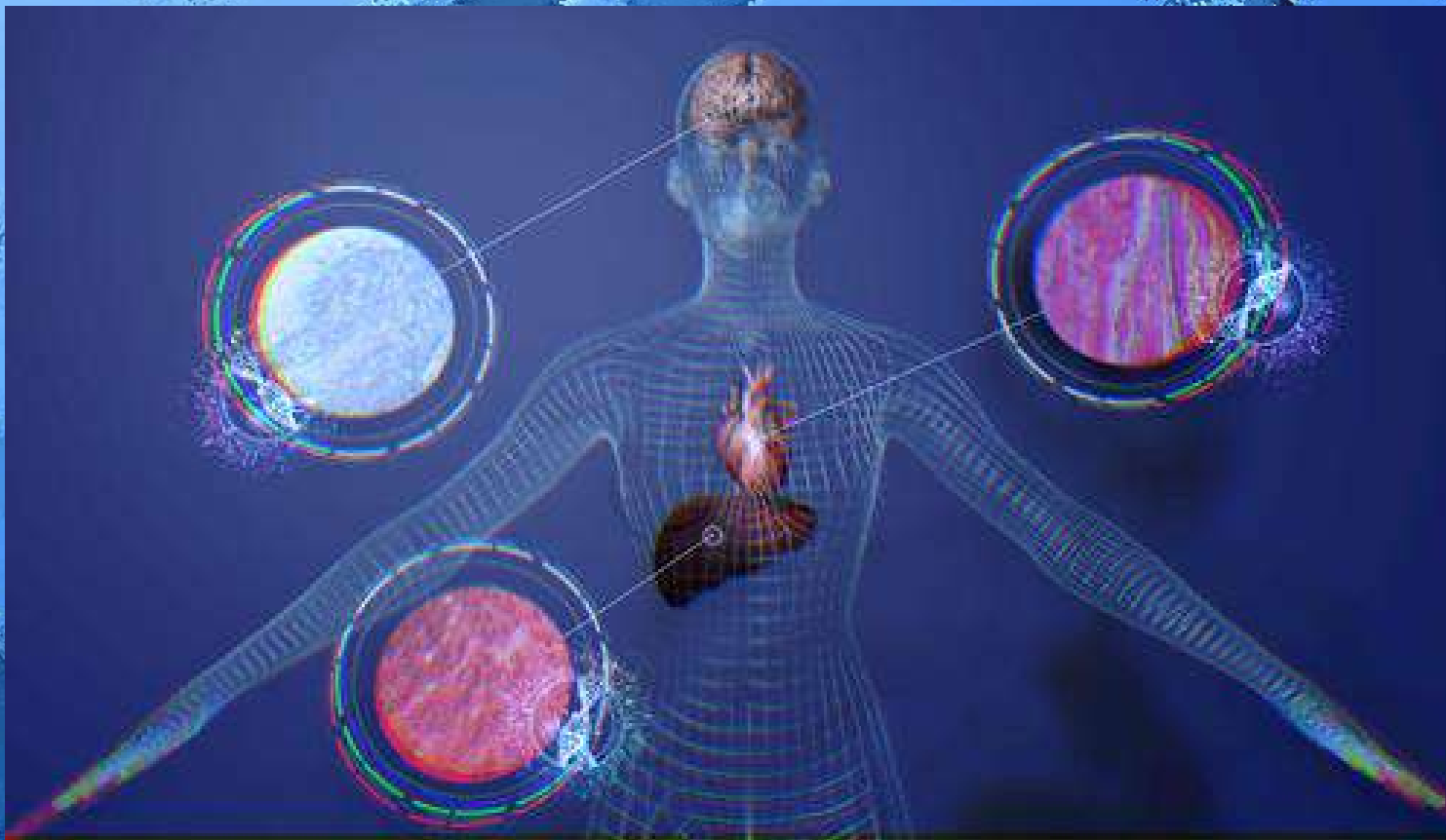


Fig. 3

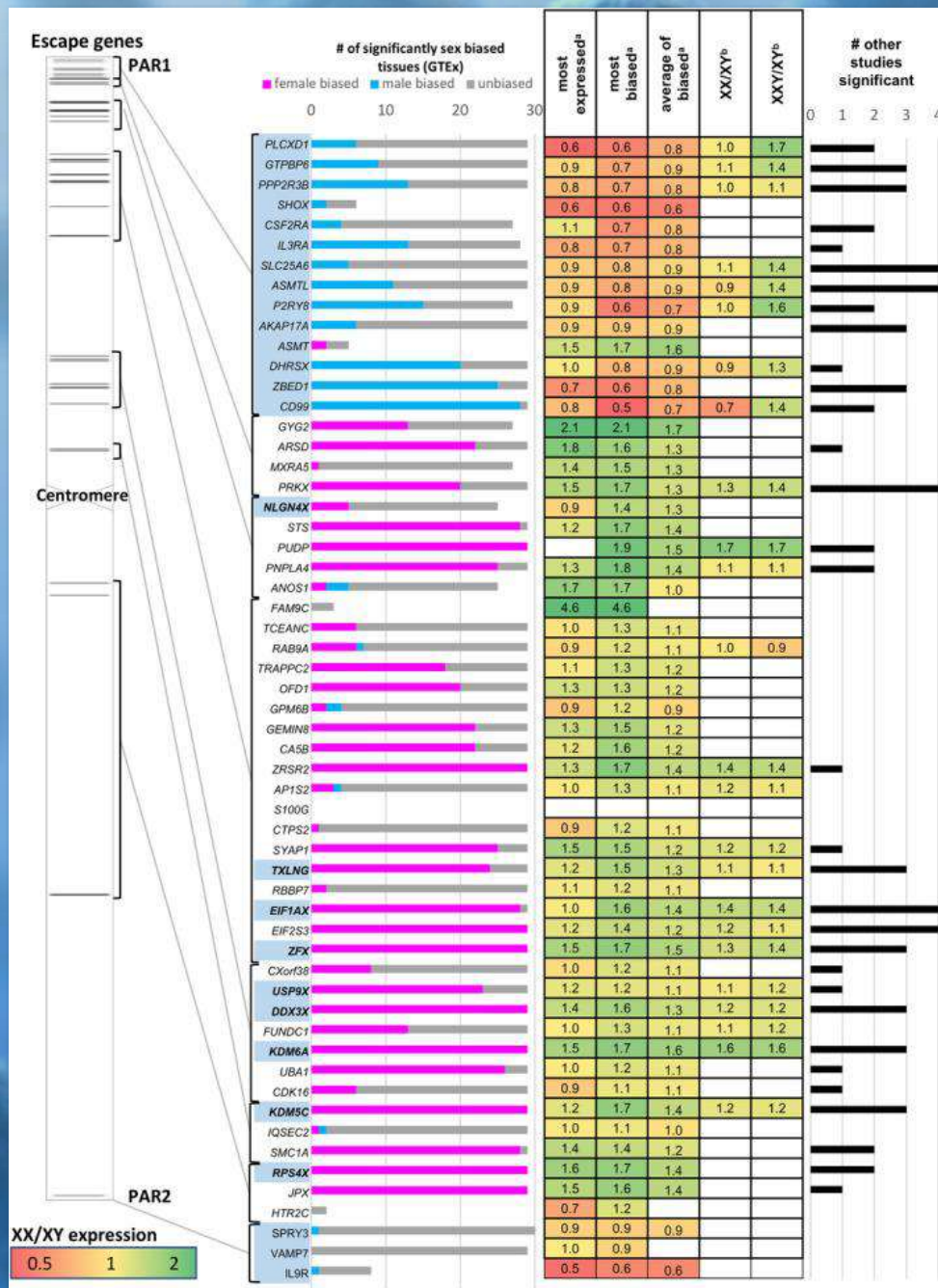
La prova definitiva che i geni “sfuggano” all'XCI è l'osservazione dell'espressione da entrambi gli alleli del gene. Un singolo individuo con XCI distorta è stato identificato nel vasto progetto GTEx scoprendo che:

- il 10,6% dei geni è sfuggito in modo variabile attraverso i 16 tessuti esaminati;
- il 5,8% dei geni è sfuggito solo in un singolo tessuto.

L'espressione biallelica può anche essere utilizzata per trovare geni che sfuggono da XCI in RNA-seq ad una singola cellula di campioni senza inclinazione di XCI. Un altro studio ha rilevato eterogeneità nello stato XCI tra le cellule, alcune di esse hanno più geni di fuga rispetto ad altre a seconda del:

- ciclo cellulare;
- livello di espressione XIST.

Tramite diversi esperimenti anche sulle cellule di un roditore comparate a quelle umane si è evidenziato che le varie linee ibride avevano un numero simile di geni in fuga, suggerendo che la variazione nella fuga era dovuta a una caratteristica intrinseca ai geni e non all'ambiente ibrido o al cromosoma.



CONFRONTI A LIVELLO DI ESPRESSIONE

I campioni GTEx

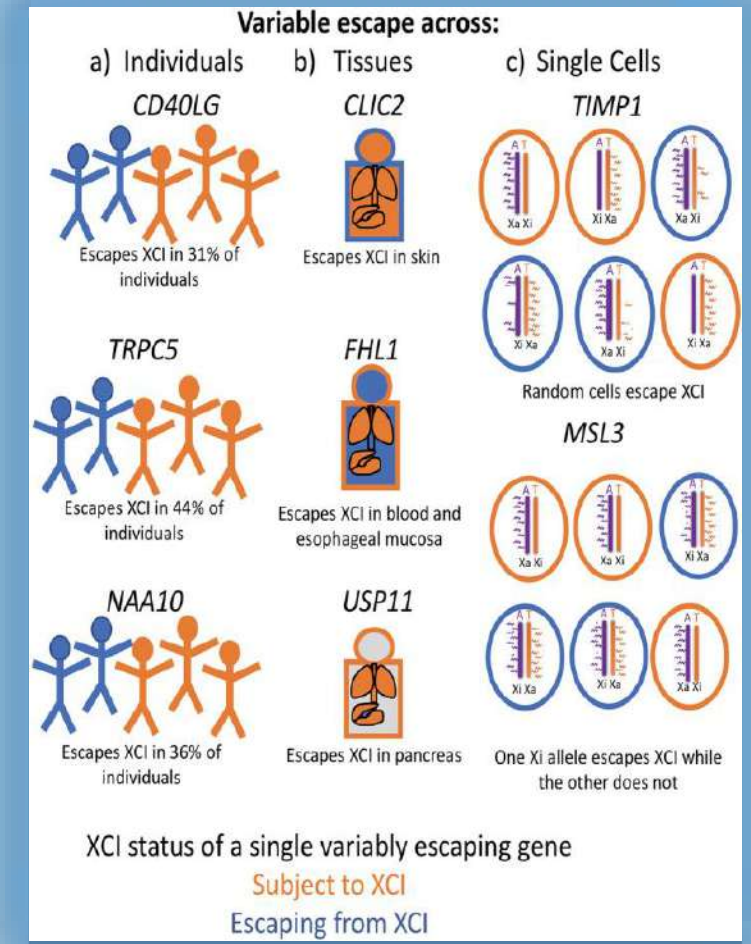
Differenziano l'espressione tra Xi e Xa

Meccanismi come la regolazione del feedback limitano l'espressione delle differenze tra maschio e femmina causata dalla fuga di XCI.

Il confronto dei livelli di espressione negli individui X, XX, XY, XXY, XYY e XXYY ha mostrato chiari effetti della ploidia del cromosoma X sui geni di fuga. C'erano anche 6 geni Y con cambiamenti di espressione statisticamente significativi con un numero crescente di cromosomi Y, che hanno tutti conservati omologhi X. Tuttavia, sono evidenti ulteriori influenze normative, poiché l'aumento del conteggio X o Y non ha aumentato l'espressione in modo lineare, c'erano effetti autosomici dall'aumento della ploidia X o Y e c'era un chiaro impatto del cromosoma Y sull'espressione genica legata all'X.

DIFFERENZE EPIGENETICHE

La metilazione del DNA viene anche utilizzata per identificare i geni che sfuggono a XCI, poiché Xa e Xi differiscono notevolmente nella loro metilazione. I livelli di metilazione del DNA sui cromosomi X dei pazienti con Klinefelter erano distinti dai controlli XX e X e anche tra i pazienti con KS e sindrome di Turner (TS), con ipometilazione in TS e ipermetilazione. La metilazione del DNA in XIST (un gene specifico per Xi) e FMR1 (un gene inattivato per Xi) è stata sufficiente per differenziare XY da XXY. Con l'aumento del numero di studi e dell'ampiezza dei tessuti, si prevede che aumenterà il numero di geni identificati per sfuggire in modo variabile dall'XCI.



I GENI CHE SFUGGONO DA XCI E IL LORO RUOLO NELLA SINDROME DI KLINEFELTER

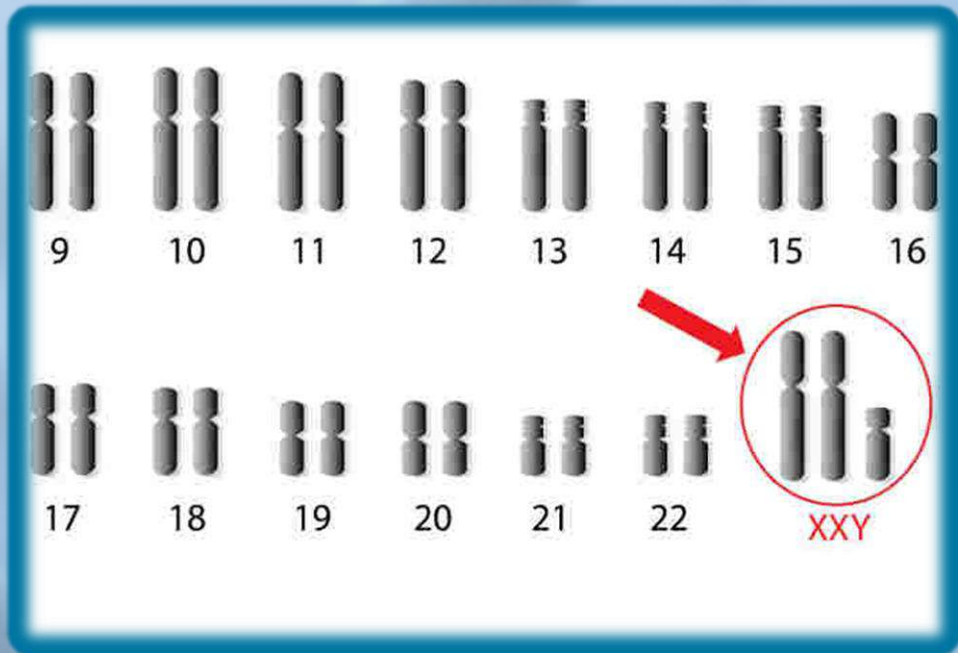


Fig.4

Le regioni pseudoautosomiche sono segmenti omologhi presenti su entrambi i cromosomi X e Y.

- PAR1 si trova all'estremità del braccio corto di entrambi i cromosomi sessuali e ha un ruolo essenziale nella ricombinazione durante la meiosi maschile;
- PAR2 nell'uomo si trova all'estremità del braccio lungo dei cromosomi X e Y e, contrariamente a PAR1, in questa regione la ricombinazione non è un evento comune.

La regolazione di questa regione è influenzata da qualcosa di più della sequenza del DNA, poiché lo Xi appare più condensato dell'Y ed è più sensibile alla perdita di metilazione del DNA. L'80-90% dei pazienti con KS ha il cariotipo classico 47, XXY, mentre il resto mostra aneuploidie multiple come:

- 48 XXXY;
- 48, XXYY;
- 49, XXXXY.

Quando il soprannumerario X diventa inattivato, è naturale chiedersi se siano i geni che sfuggono da XCI a contribuire al fenotipo KS. Eppure, sorprendentemente, l'unica correlazione genotipo / fenotipo ben stabilita con i geni di fuga e KS è per la statura, quindi la storia è chiaramente più complessa del singolo gene - singolo fenotipo.

EFFETTI SULLA STATURA, NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA E SUL NEUROSVILUPPO



L'alta statura nei pazienti con KS si osserva come:

- un aumento della lunghezza delle gambe;
- una diminuzione del rapporto corporeo;
- un'altezza media superiore al 95 ° percentile.

L'aumento dell'altezza è generalmente attribuito a una copia extra del gene PAR1 SHOX, ma la carenza di testosterone può anche contribuire tramite una fusione epifisaria ritardata. Il gene SHOX codifica un fattore di trascrizione che controlla la proliferazione e la differenziazione dei condrociti nella cartilagine di accrescimento. La sovraespressione di KS dei geni PAR è maggiore di quella di altri geni che sfuggono da XCI e più geni nel PAR hanno funzioni rilevanti per l'immunità. Inoltre il cromosoma X è sovrarappresentato per i geni con un ruolo nel cervello.

Studi di neuroimaging rivelano riduzioni del volume del cervello nelle regioni caudato, frontale e temporale.

Fig. 5

IPOTESI EXiTS DEL CANCRO E SPERMATOGENESI

L'ipotesi "EXiTS" suggerisce l'idea che i geni che sfuggono dall'inattivazione di X siano soppressori tumorali, con l'espressione da Xi che protegge le femmine dal cancro. Pertanto, un secondo cromosoma X potrebbe essere protettivo dal cancro per gli individui KS, inoltre in questi individui, il 10-12% dei maschi presenta azoospermia non ostruttiva (NOA) e, sebbene in alcuni studi prima della pubertà sia stata segnalata una riduzione delle dimensioni dei testicoli, dopo questo periodo la degenerazione delle strutture testicolari è evidente nei tubuli seminiferi che mostrano ialinizzazione, fibrosi e degenerazione delle cellule di Sertoli. Meno del 9% dei pazienti con KS ha sperma nell'eiaculato, che può essere utilizzato per l'iniezione intracitoplasmatica di sperma.

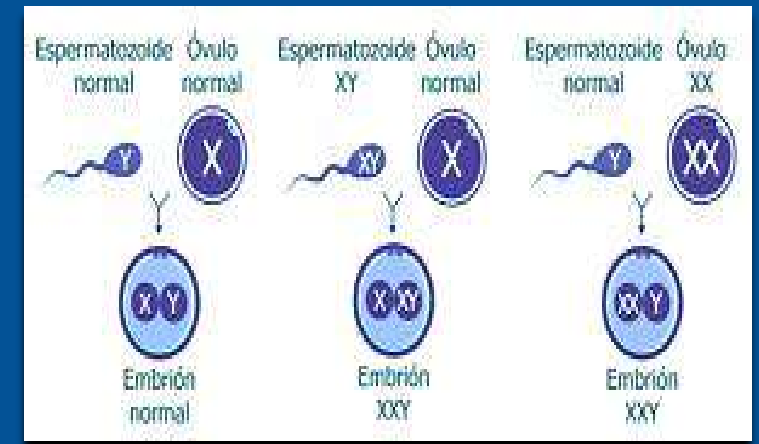
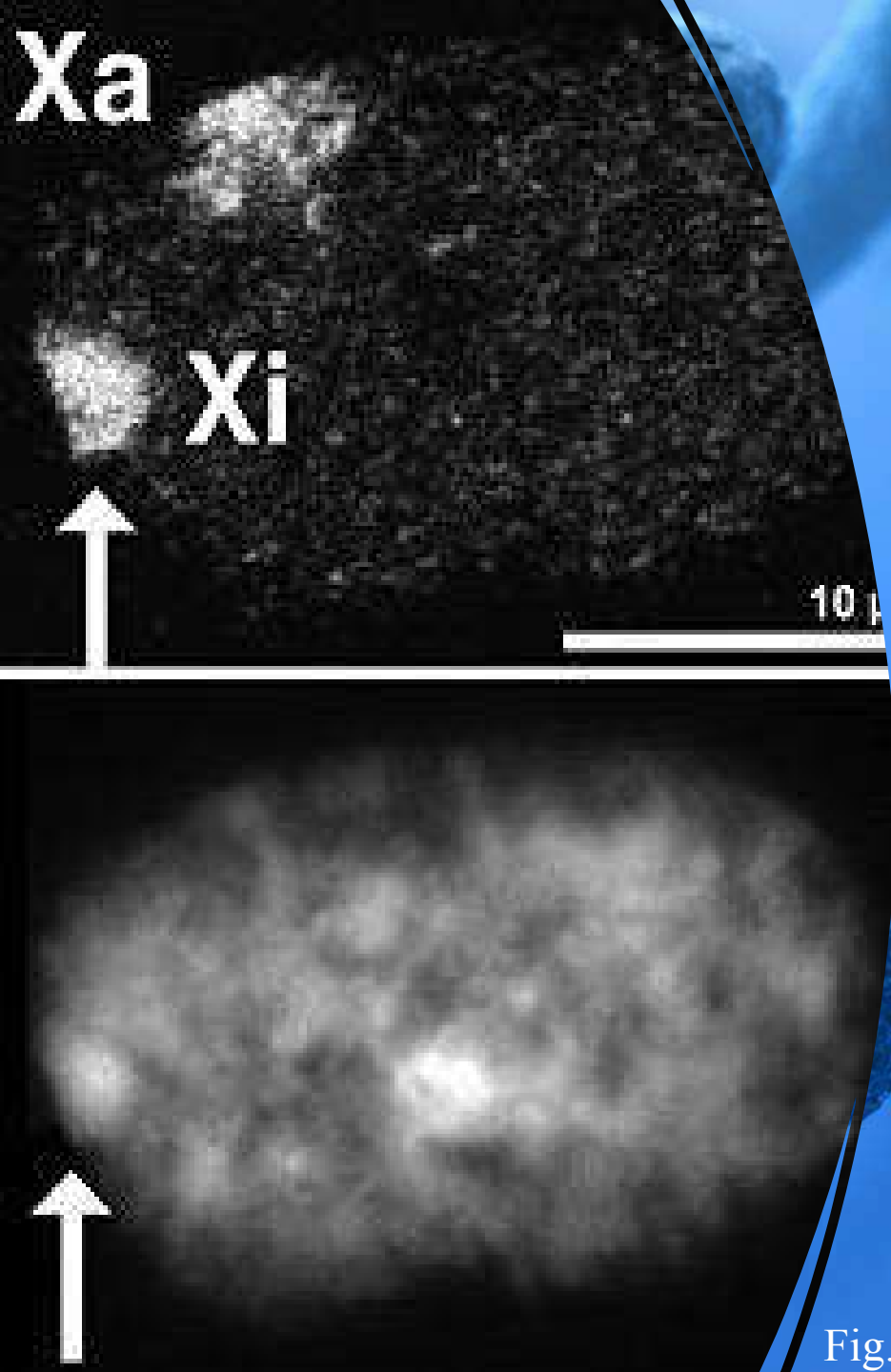


Fig.6



MECCANISMI DI FUGA

I geni che sfuggono all'XCI mostrano generalmente caratteristiche epigenetiche simili alle loro copie Xa, evitando in qualche modo la diffusione dell'eterocromatina indotta da XIST che si estende attraverso la Xi. Quando il materiale autosomico viene traslocato sul cromosoma X, è in grado di essere inattivato, sebbene la "diffusione" meno robusta del silenziamento nell'autosoma abbia portato all'ipotesi di stazioni di passaggio che amplificerebbero il silenziamento e che si arricchirebbero sul cromosoma X. La conservazione della fuga dall'XCI, in particolare per i geni ancestrali conservati in Y, suggerisce la presenza di elementi che favoriscono l'espressione. Tra l'eucromatina dei geni che sfuggono da XCI e l'eterocromatina dei geni soggetti a XCI, è probabile che vi siano elementi di confine. Recenti studi sull'intero cromosoma e gene-specifici dimostrano che la fuga è generalmente un modo per evitare il silenziamento piuttosto che un fallimento nel mantenere un silenziamento iniziale.

Fig. 7

GENI CHE SFUGGONO ALL'INATTIVAZIONE DEL CROMOSOMA X: POTENZIALI CONTRIBUTORI ALLA SINDROME DI KLINEFELTER

UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE-RELAZIONE FINALE- LAUREA
TRIENNALE 2019/2020

REFERENZE E SITOGRAFIA:

Articolo scientifico di riferimento: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7384012/>

Immagini di sfondo:

1. <https://www.focus.it/scienza/scienze/nettie-stevens-e-il-cromosoma-x-e-y>
2. <https://sciencecue.it/le-donne-veri-mosaici-genici/12205/>
3. <https://www.ilvaloreitaliano.it/trapianto-di-cromosoma-su-cellule-staminali-umane/>

Figure:

1. <https://www.medicitalia.it/minforma/andrologia/2387-la-sindrome-di-klinefelter-e-importante-una-diagnosi-precoce.html>
2. https://elearning.uniroma1.it/pluginfile.php/670532/mod_folder/content/0/20%29%20Inattivazione%20del%20cromosoma%20X.ppt
3. <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Genotype-Tissue-Expression-Project>
4. <https://www.nurse24.it/studenti/patologia/sindrome-klinefelter.html>
5. https://it.wikipedia.org/wiki/Sindrome_di_Klinefelter
6. <https://www.nascereklinefelter.it/?p=464>
7. https://it.wikipedia.org/wiki/Inattivazione_del_cromosoma_X

RIASSUNTO ESTESO

La determinazione del sesso nei mammiferi, e dunque nell'uomo, è definita dalla presenza di cromosomi sessuali. Un processo biologico detto inattivazione del cromosoma X prevede la perdita di funzione di uno dei due cromosomi delle femmine: in questo modo si bilancia la quantità dei geni ereditati. Insieme a Xist (X-inactive specific transcript) entrano in gioco anche altri fattori, sullo stesso cromosoma X, che vanno ad attivare Xist e quindi 'aiutano' Xist RNA a silenziare il cromosoma X. Mentre alcuni geni sembrano essere coerenti nella fuga dall'XCI, che si verifica a livello delle singole cellule in tutti gli individui e in tutti i tessuti, molti geni invece sono variabili nella loro inattivazione, sfuggendo dall'XCI. La prova definitiva che i geni "sfuggano" all'XCI è l'osservazione dell'espressione da entrambi gli alleli del gene. Un altro studio ha rilevato eterogeneità nello stato XCI tra le cellule, alcune di esse hanno più geni di fuga rispetto ad altre a seconda del ciclo cellulare e del livello di espressione XIST. Un altro approccio per differenziare l'espressione tra Xi e Xa è confrontare l'espressione tra maschi e femmine, e questo è stato ampiamente analizzato con i campioni GTEx. Le regioni pseudoautosomiche sono segmenti omologhi presenti su entrambi i cromosomi X e Y. PAR1 si trova all'estremità del braccio corto di entrambi i cromosomi sessuali e ha un ruolo essenziale nella ricombinazione durante la meiosi maschile. PAR2 nell'uomo si trova all'estremità del braccio lungo dei cromosomi X e Y e, contrariamente a PAR1, in questa regione la ricombinazione non è un evento comune. Ciò suggerisce che Xi non è espresso così bene come il cromosoma Y, ma che l'espressione di Y o la repressione di X variano tra i tessuti. L'alta statura nei pazienti con KS si osserva come un aumento della lunghezza delle gambe, una diminuzione del rapporto corporeo e un'altezza media superiore al 95 ° percentile. Il gene SHOX codifica un fattore di trascrizione che controlla la proliferazione e la differenziazione dei condrociti nella cartilagine di accrescimento. La sovraespressione di KS dei geni PAR è maggiore di quella di altri geni che sfuggono da XCI e più geni nel PAR hanno funzioni rilevanti per l'immunità. I pazienti con KS comprendono il 10-12% dei maschi con azoospermia non ostruttiva (NOA) e, sebbene in alcuni studi prima della pubertà sia stata segnalata una riduzione delle dimensioni dei testicoli, dopo questo periodo la degenerazione delle strutture testicolari è evidente e i tubuli seminiferi mostrano ialinizzazione, fibrosi e degenerazione delle cellule di Sertoli. I geni che sfuggono all'XCI mostrano generalmente caratteristiche epigenetiche simili alle loro copie Xa, evitando in qualche modo la diffusione dell'eterocromatina indotta da XIST che si estende attraverso la Xi. La conservazione della fuga dall'XCI, in particolare per i geni ancestrali conservati in Y, suggerisce la presenza di elementi che favoriscono l'espressione. Tra l'eucromatina dei geni che sfuggono da XCI e l'eterocromatina dei geni soggetti a XCI, è probabile che vi siano elementi di confine. Recenti studi sull'intero cromosoma e gene-specifici dimostrano che la fuga è generalmente un modo per evitare il silenziamento piuttosto che un fallimento nel mantenere un silenziamento iniziale.