

Soluzioni del Capitolo 19

19.1 a. 5; b. 9; c. 3; d. 7; e. 2; f. 1; g. 8; h. 10; i. 6; j. 4; k. 11.

19.2 Va sottolineato che in questo e nei problemi successivi, per semplicità di discorso, viene indicato come *imprinted* l'allele silenziato, mentre, come già esplicitato nel testo, l'imprinting genomico è un fenomeno reciproco: nei geni imprinted un allele (materno o paterno) reca l'impronta epigenetica per rimanere attivo e l'altro (paterno o materno) reca l'impronta per essere silenziato.

Si ricordi che la sindrome di Prader-Willi è causata da una mutazione in un gene autosomico a imprinting materno. Per rispondere a questa domanda, è necessario capire il genotipo del genitore originale affetto. Tutti gli individui hanno un solo allele di questo gene trascrizionalmente attivo, che è l'allele che hanno ereditato dal padre.

a. Vero. Un maschio affetto ha un allele mutante del gene che ha ereditato da suo padre e un allele imprinted (trascrizionalmente silenziato) e presumibilmente normale del gene, che ha ereditato da sua madre. Nei gameti del maschio affetto, i segnali di imprinting vengono rimossi per applicare di nuovo quelli specifici del sesso. Poiché questo gene subisce imprinting materno, nessuno dei due alleli è imprinted nella linea germinale. Pertanto, metà degli spermatozoi avrà l'allele normale non imprinted e l'altra metà avrà l'allele mutante non imprinted. Tutti i suoi figli riceveranno dalla madre un allele inattivato (presumibilmente wild-type) e quindi metà dei suoi figli (e anche metà delle sue figlie) ne sarà affetta.

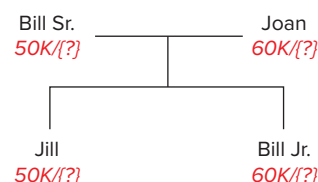
b. Vero. [Vedi parte (a).]

c. Falso. Una femmina affetta ha un allele mutante del gene che ha ereditato da suo padre e un allele imprinted (trascrizionalmente silenziato) e

presumibilmente normale del gene che ha ereditato da sua madre. Nei gameti della femmina colpita, i segnali di imprinting vengono rimossi e vengono poi applicati quelli specifici del sesso. Poiché questo gene è imprinted dalla madre, entrambi i suoi alleli sono imprinted, il che significa che questo gene è silenziato trascrizionalmente in tutti gli oociti. Pertanto, metà delle sue uova avrà l'allele normale imprinted e l'altra metà avrà l'allele mutante imprinted. Tutti i suoi figli riceveranno dal padre un allele attivo (presumibilmente wild-type) di questo gene, quindi nessuno dei suoi figli (figli o figlie) sarà affetto.

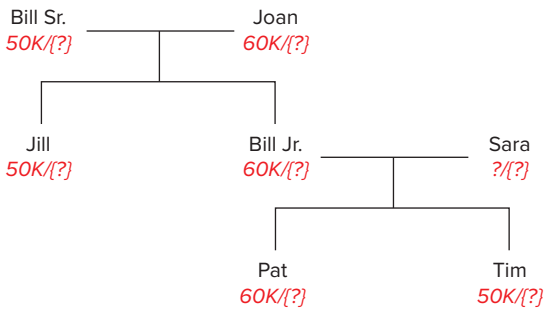
d. Falso. [Vedi parte (c).]

19.3 Si disegna il pedigree, comprese le informazioni fornite nel problema. Nel diagramma che segue, gli alleli del gene *IGF2*, a imprinting materno, sono 60K e 50K, mentre {?} rappresenta un allele che è trascrizionalmente inattivato (imprinted).



a. Entrambi gli alleli di Joan saranno imprinted (silenziati) nei suoi gameti, quindi Jill e Bill Jr. esprimono ciascuno l'allele che hanno ricevuto da Bill. Pertanto, il genotipo di Bill Sr. è 50K/{60K}. Con queste informazioni, non si può dire altro sul genotipo di Joan (60K/{?}) e non c'è modo di dire quali alleli Jill e Bill Jr. abbiano ricevuto da Joan.

b. Il genotipo completo di Bill Sr. e le ulteriori informazioni su Pat e Tim sono presentati nel pedigree che segue:



Come nella parte (a) per Joan, entrambi gli alleli di Sara saranno imprimentati nei suoi gameti. Pertanto, Pat e Tim esprimono gli alleli trascrizionalmente attivi che hanno ricevuto da Bill Jr. Poiché il fenotipo di Tim è 50K, Bill Jr. deve essere eterozigote 60K/{50K}, con il suo allele imprimentato {50K} proveniente da Joan. Pertanto, il genotipo di Joan è 60K/{50K} e il genotipo di Bill Sr. è 50K/{60K}.

19.4 Può essere utile fare riferimento alla Figura 19.6, che mostra un tipico albero genealogico per una caratteristica controllata da un gene autosomico a imprinting paterno.

a. No. Gli alleli del gene non sono espressi nelle cellule germinali del maschio I-2. Il gene viene imprimentato paternamente e nella linea germinale vengono applicati segnali di metilazione specifici del sesso. Pertanto, alla fine della meiosi, entrambi gli alleli di questo gene vengono imprimentati (inattivati trascrizionalmente).

b. No. L'allele del gene del maschio I-2 non sarà espresso nelle cellule somatiche di II-2. Il gene ereditato da suo padre è stato inattivato nelle sue cellule germinali, quindi le cellule somatiche che si formano dopo la fecondazione conterranno una copia inattiva proveniente da I-2.

c. Sì. L'allele del gene del maschio I-2 sarà espresso nelle cellule germinali di II-2. I segnali di metilazione delle cellule somatiche ereditati da I-2 (l'allele inattivato) vengono cancellati durante la gametogenesi e vengono applicati segnali specifici del sesso. Una femmina non inattiverà nessuno dei suoi alleli di questo gene in nessuna delle sue uova, quindi entrambi gli alleli di questo gene saranno attivi nelle cellule germinali di II-2.

d. No. L'allele del gene del maschio I-2 non sarà espresso nelle cellule somatiche di II-3. L'allele ereditato da I-2 è imprimentato, quindi le cellule somatiche del figlio non esprimeranno quell'allele.

e. No. L'allele del gene del maschio I-2 non sarà espresso nelle cellule germinali di II-3. I segnali di metilazione di I-2 vengono cancellati durante

la gametogenesi, ma il pattern maschile di metilazione verrà applicato a entrambi gli alleli del gene nelle sue cellule germinali.

f. Sì. L'allele del gene del maschio I-2 (se fosse quello ereditato) sarebbe espresso nelle cellule somatiche di III-1. Il nipote (III-1) avrebbe ereditato l'allele non imprimentato del gene da sua madre (II-2), quindi l'allele di I-2 è espresso nelle cellule somatiche di III-1.

g. No. L'allele del gene del maschio I-2 (se fosse quello ereditato) non sarebbe espresso nelle cellule germinali di III-1. Il maschio III-1 avrà silenziato entrambi gli alleli di questo gene nelle sue cellule germinali.

19.5 a. Il gene *A* non è imprimentato; indipendentemente dal fatto che il ceppo AKR fosse il genitore femminile o maschile, metà delle read della sequenza provenivano dall'allele di AKR, il che significa che gli alleli del gene *A* dei ceppi AKR e PWD erano espressi allo stesso modo nel feto. Il gene *B* ha un'impronta materna: quando la madre è AKR, non si ottengono read dagli alleli del gene *B* di AKR, indicando che l'allele del gene *B* ereditato da AKR non è trascritto; quando l'AKR è il genitore maschio (e PWD è il genitore femminile), tutte le read della sequenza provengono dall'allele del gene *B* di AKR, indicando che l'allele PWD è inattivo. Il gene *C* è imprimentato paternamente: quando la madre è AKR, tutte le letture della sequenza dal gene *C* provengono da AKR (non vengono rilevate trascrizioni dall'allele del gene *C* di PWD); quando il genitore maschio è AKR, nessuna delle letture della sequenza del gene *C* proviene dall'allele AKR.

b. Gli incroci reciproci sono importanti per determinare se un gene è imprimentato perché i risultati dei tali incroci possono escludere la possibilità che un allele mutante non possa essere espresso indipendentemente dal genitore da cui provenga l'allele.

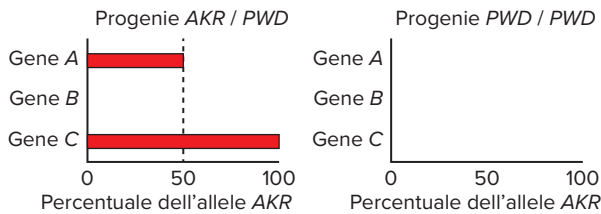
c. Un diagramma dell'incrocio si presenta così:

$$\begin{array}{l} \text{♀ } A^{\text{AKR}} B^{\text{AKR}} C^{\text{AKR}}/A^{\text{PWD}} B^{\text{PWD}} C^{\text{PWD}} \times \\ \text{♂ } A^{\text{PWD}} B^{\text{PWD}} C^{\text{PWD}}/A^{\text{PWD}} B^{\text{PWD}} C^{\text{PWD}} \end{array}$$

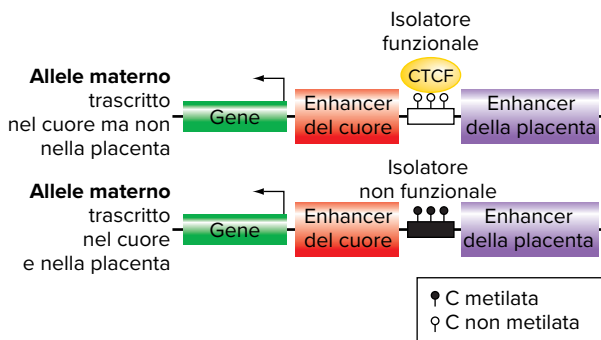
A ogni gene (*A*, *B* e *C*), la progenie di questo incrocio potrebbe essere eterozigote *AKR/PWD* od omozigote *PWD/PWD*. Abbiamo determinato nella parte (a) che il gene *A* non è imprimentato, che il gene *B* è imprimentato maternamente e che il gene *C* è imprimentato paternamente.

Se un topo della progenie è eterozigote (*AKR/PWD*) per uno qualsiasi dei geni, i pattern di espressione attesi sono quelli mostrati nel

diagramma in basso a sinistra. La chiave è che nella progenie gli alleli *AKR* provengono dal genitore femminile e gli alleli *PWD* dal genitore maschile. Se un topo della progenie è omozigote (*PWD/PWD*) per uno qualsiasi dei geni, quel topo non avrà alleli *AKR*, quindi la percentuale di read per l'mRNA specifico di *AKR* sarà zero.



- 19.6** Come mostra il diagramma che segue, un isolatore che controlla l'imprinting potrebbe essere posizionato tra gli enhancer separati di placenta e cuore fetali, in modo tale che l'isolatore si trovi tra l'enhancer della placenta e il promotore, ma non tra l'enhancer cardiaco e il promotore. In questa configurazione, l'imprinting potrebbe essere tessuto-specifico: il gene potrebbe essere a imprinting materno nella placenta ma non nel cuore del feto.



- 19.7** Un anticorpo che si lega specificamente al DNA contenente 5-metilcitosina potrebbe essere utilizzato per identificare frammenti di DNA genomico che presentano pattern di metilazione sesso-specifici; questi frammenti potrebbero includere sequenze che regolano geni imprinted. La procedura è simile a quella delineata in Figura 18.16, partendo però dal DNA genomico piuttosto che dalla cromatina. Si ottengono preparazioni di DNA genomico separate per cellule maschili e femminili. Si frammenta quindi il DNA e lo si incuba con l'anticorpo; l'anticorpo immunoprecipita (IP) i frammenti di DNA solo se metilati. Quindi si sequenziano i frammenti precipitati e si determina se alcune sequenze vengono recuperate solo da cellule maschili o solo da cellule femminili. Si verifica, quindi, la sequenza del genoma per deter-

minare se queste sequenze metilate sesso-specifiche sono vicine o all'interno dei geni. Infine, tramite RNA-Seq, si analizza se quei geni sono imprinted. La presenza di differenze alleliche nelle copie del gene ereditato da ciascun genitore permetterebbe di determinare se i trascritti del gene nella progenie appartengono indifferentemente alle due copie parentali, o se invece corrispondono solo a un allele parentale.

- 19.8 a.** Si esegue un esperimento di RNA-Seq utilizzando mRNA dai tessuti delle operaie e delle regine allo stadio larvale e si identificano i geni differenzialmente espressi. Inoltre, si analizza il pattern di metilazione del DNA genomico di operaie e regine. Un modo per esaminare i pattern di metilazione è eseguire un esperimento di IP, utilizzando anticorpi contro la 5-metilcitosina come appena descritto nel Problema 7. Un altro modo è sequenziare i genomi di operaie e regine in presenza e assenza di bisolfito, come descritto nel Problema risolto II.

b. La normale dieta a base di nettare e polline ha alti livelli di donatori di gruppi metilici. I genomi delle larve alimentate con una dieta normale diventano altamente metilati, determinando un pattern di espressione genica che fa sì che le larve si sviluppino come operaie. La dieta della pappa reale non è arricchita di donatori di gruppi metilici. Pertanto, i genomi delle larve che mangiano la pappa reale sono meno metilati di quelli che seguono una dieta normale, risultando in un programma di espressione genica che trasforma le larve in regine. La soppressione della DNMT3 imita l'effetto della pappa reale perché senza l'enzima DNMT anche le larve alimentate con una dieta normale non possono aggiungere i gruppi metilici ai residui di citosina.

- 19.9 a.** Le moli potrebbero originarsi dalla fecondazione di "uova vuote", che non contengono cromosomi materni, a causa di qualche tipo di errore nella meiosi, o a causa della perdita di tutti i cromosomi materni dopo la fecondazione per altri eventi aberranti. Il più delle volte, le moli idatiformi sono dovute alla fecondazione di tali uova con un singolo spermatozoo. Queste uova fecondate inizierebbero come aploidi. Per creare una cellula diploide, dovrebbe verificarsi un errore durante la citochinesi in una divisione mitotica precoce in modo che le due copie di ogni cromosoma paterno rimangano nella stessa cellula. Si noti che questo meccanismo produrrebbe un individuo diploide XX. Lo spermatozoo doveva portare un cromosoma X.

Meno frequentemente (in circa il 20% dei casi), le moli idatiformi sono causate dalla fecondazione simultanea di un uovo vuoto con due spermatozoi. Questo potrebbe produrre individui diploidi XX o XY. Quest'ultimo caso si potrebbe verificare solo attraverso tale doppia fecondazione. (Gli individui diploidi YY non vengono osservati, presumibilmente perché le cellule senza un cromosoma X sono non vitali.)

b. L'imprinting è il motivo più probabile per cui queste moli non si sviluppano come embrioni normali. Entrambe le copie dei geni a imprinting paterno verrebbero silenziati, quindi questi geni non potrebbero essere espressi. Al contrario, i geni normalmente imprinted nella madre verrebbero espressi da entrambe le copie della mole.

19.10 a. Gli individui con una malattia causata da una ICR mutante non funzionale esprimerebbero in modo aberrante gli alleli del gene sia paterni sia materni il cui imprinting è controllato dall'ICR. Innanzitutto, si cerca un locus SNP all'interno di un esone del gene per il quale le copie del gene paterno e materno portino alleli diversi. Quindi, si sintetizzano sonde ASO per ciascun allele SNP, si aggiunge un tag fluorescente diverso a ciascuno e si esegue un esperimento FISH, utilizzando cellule (che normalmente esprimono il gene in questione) prelevate da persone affette e non affette. L'mRNA nelle cellule delle persone non affette si ibriderebbe con una sola delle due sonde ASO e quindi emetterebbe fluorescenza di un solo colore, mentre le cellule delle persone affette si ibriderebbero con entrambe le sonde ASO emettendo fluorescenza di entrambi i colori (o la loro somma cromatica, per esempio rosso + verde = giallo).

b. Le malattie dovute a mutazioni che colpiscono le ICR mostrano espressività variabile in individui diversi. Una possibile spiegazione è che l'imprinting è soppresso in modo incompleto e in misura diversa in individui diversi. In tal caso, le cellule di individui diversi mostrerebbero livelli diversi di fluorescenza dall'ASO per l'allele espresso in modo inappropriato. Un'altra possibilità è che le cellule di una stessa persona differiscano in modo significativo nella misura in cui l'imprinting è compromesso; gli individui più gravemente colpiti dalla malattia avrebbero per caso un numero maggiore di cellule con imprinting alterato nei tessuti cruciali. In questo caso, cellule diverse di un singolo individuo mostrerebbero livelli di fluorescenza marcatamente diversi con la sonda ASO per l'allele espresso in modo inappropriato.

c. Ovviamente, è necessario ottenere campioni di tessuto cerebrale (presumibilmente da biopsie o individui recentemente deceduti) e altri tessuti. Sezioni sottili di questi tessuti si ibridano con le due sonde ASO per ciascun gene. Se un gene è imprinted in modo specifico nel cervello, l'ibridazione sarebbe molto più forte con una sonda che con l'altra nel tessuto cerebrale; in altri tessuti, si riscontrerebbero livelli uguali di ibridazione con le due sonde o nessuna ibridazione con nessuna delle sonde (se il gene non fosse espresso in quel tessuto).

Questa procedura FISH potrebbe essere utilizzata per identificare i geni che sono imprinted specificamente nel cervello come suggerito da questo problema, ma il metodo non sarebbe molto efficiente perché sarebbe necessario ripeterlo per ogni gene candidato. Un metodo più efficiente sarebbe quello di eseguire un esperimento di RNA-Seq nei diversi tessuti, cercando trascritti in cui un allele materno o paterno siano sovra-rappresentati nel tessuto cerebrale ma non in altri tessuti. In questo modo, si potrebbero analizzare tutti i geni con lo stesso esperimento.

19.11 La repressione trascrizionale si verifica quando i repressori si legano agli enhancer e impediscono la trascrizione di un promotore. La repressione non è ereditata; deve essere ristabilita a ogni divisione cellulare. Il silenziamento è una repressione a lungo termine che viene ereditata attraverso le divisioni cellulari e talvolta anche attraverso i gameti. Il silenziamento comporta le modificazioni repressive degli istoni e la metilazione del DNA degli elementi regolativi che agiscono in *cis*.

19.12 Innanzitutto, si estrae la cromatina da un particolare tipo di cellule. Successivamente si frammenta il DNA e si incubano i frammenti con un anticorpo contro un istone modificato. L'anticorpo immunoprecipiterà i frammenti di DNA associati a istoni contenenti quella particolare modificazione dell'amminoacido. Quindi si sequenziano i frammenti precipitati e si confrontano le sequenze con quelle di una banca dati genomica.

19.13 a. Presumibilmente, la tetraciclina allontana tutte le proteine TetR dal DNA dopo la prima divisione cellulare. Le colonie non appaiono bianche ($Ade6^-$) immediatamente: sono necessarie 10 divisioni cellulari. Questo risultato probabilmente significa che i marchi H3K9me si autopropagano solo in modo inefficiente.

b. Questi risultati sono direttamente analoghi ai segnali H3K27me del gene *Hox PRE*; i segnali

H3K27 si autoperpetuano in modo inefficiente, quindi senza il reclutamento continuo di un'istone metiltransferasi (HMT) da parte di una proteina repressore legata a PRE, e il silenziamento del gene *Hox* non viene perpetuato. Allo stesso modo, il mantenimento dei segnali H3K9me nel transgene reporter richiede il reclutamento continuo dell'HMT da parte di TetR legato vicino al promotore del transgene reporter.

c. La demetilasi Epe1 deve normalmente contribuire all'instabilità dei segnali H3K9me. Il lievito potrebbe aver evoluto Epe1 perché la risultante instabilità delle modificazioni istoniche che influenzano la trascrizione consente all'organismo di cambiare più rapidamente lo stato di trascrizione dei suoi geni.

19.14 a. Una delle proteine SIR è una deacetilasi istonica.

b. Il complesso SIR è portato sul DNA da una proteina che lega il DNA con specificità di sequenza e una proteina del complesso SIR deacetila H4K16ac; quella proteina SIR può quindi legare l'H4K16 deacetilato, consentendo al complesso SIR di diffondere la deacetilazione. Il legame SIR/H4K16 consente inoltre al complesso SIR di legare gli istoni non acetilati assemblati dopo che la forcella di replicazione è passata. Subito dopo la replicazione del DNA, una miscela di vecchi e nuovi istoni H4 si riassume sulle eliche figlie del DNA. I nuovi istoni H4 non sono acetilati su K16 e molti di quelli vecchi nemmeno sono acetilati poiché l'acetilazione è instabile. Pertanto, il legame del complesso SIR all'H4K16 non acetilato nel DNA appena replicato aiuta a mantenere la deacetilazione della regione.

c. Questi risultati sono del tutto analoghi ai segnali H3K27me del gene *Hox* PRE. Come descritto nella parte (b) del Problema 13, i segnali H3K27 sui geni *Hox* si autoperpetuano in modo inefficiente, quindi senza il reclutamento continuo di una HMT da parte di una proteina repressore legata a PRE, il silenziamento del gene *Hox* non viene mantenuto. Allo stesso modo, il legame SIR a H4K16 è inefficiente, quindi la repressione a lungo termine (silenziamento) di un locus del mating type dipende dal reclutamento continuo del complesso SIR in questo locus da parte di una proteina di legame al DNA.

19.15 Analogamente al meccanismo riportato in Figura 19.9b, le citosine metilate reclutano proteine che producono segnali H3K9me; i segnali H3K9me, a loro volta, legano le DNMT che metilano le C.

19.16 No; *RLIM* non svolge necessariamente un ruolo nell'attivazione del cromosoma X. Una possibilità alternativa è che *RLIM* sia un gene essenziale; le cellule che inattivano il cromosoma con *RLIM*⁺ muoiono e le cellule che hanno inattivato il cromosoma *RLIM*⁻ (con *RLIM*⁺ attivo) le sostituiscono. In effetti, questo fenomeno è stato osservato per molti geni legati all'X. Probabilmente nessuno o solo alcuni di questi geni hanno qualcosa a che fare direttamente con il meccanismo di inattivazione del cromosoma X, sebbene la loro espressione ovviamente sia influenzata dall'inattivazione dell'X.

19.17 a. L'incrocio è:

$$\begin{aligned} &SNP^{pel} SNP^{pel} (\text{peloria}) \times SNP^{wt} SNP^{wt} (\text{tipo selvaggio}) \\ &\quad \rightarrow F_1 SNP^{pel} SNP^{wt} \\ &\rightarrow F_2 1 SNP^{pel} SNP^{pel}: 2 SNP^{pel} SNP^{wt}: 1 SNP^{wt} SNP^{wt} \end{aligned}$$

b. Se l'ipotesi 1 è vera e la metilazione degli alleli *Lcyc* viene trasmessa attraverso i gameti, allora ci si aspetta di osservare nella F₂ un rapporto di 3 tipi selvatici (*SNP*^{pel} *SNP*^{wt} e *SNP*^{wt} *SNP*^{wt}): 1 peloria (*SNP*^{pel} *SNP*^{pel}). Se l'ipotesi 2 è vera, cioè se la metilazione di *Lcyc* viene cancellata nei gameti e ristabilita qualche tempo dopo la fecondazione, allora ci si aspetta di non osservare alcuna correlazione tra i fenotipi e i genotipi *SNP*; i fenotipi si distribuirebbero casualmente rispetto ai genotipi *SNP* 1:2:1. Non è quindi possibile prevedere i rapporti fenotipici tra le piante F₂; infatti, come si vedrà nella risposta alla parte (c), è probabile che fiori diversi della stessa pianta F₂ differiscano nella loro peloria rispetto ai fenotipi selvatici.

c. Nella F₂ si potrebbero osservare settori in cui i fiori sono peloria (completamente metilati), settori di tipo selvatico (non metilati) e settori in cui i fiori si collocano a metà (parzialmente metilati).

19.18 Gli alleli *clark kent* sono epialleli metilati. La metilazione viene persa clonando il gene *SUPERMAN* dai ceppi Clark Kent per produrre i transgeni.

19.19 Le piante non cancellano la metilazione del DNA come fanno le cellule della linea germinale negli animali; nel DNA dei mammiferi i segnali di metilazione devono essere reinstaurati. Questa reintegrazione si verifica in A^{VY} e altri epialleli. Non è chiaro il motivo per cui piante e animali differiscono in questo modo, ma questa differenza nel processo di metilazione può essere in parte correlata al fatto che la linea germinale negli animali si differenzia all'inizio dello sviluppo embrionale, mentre quella delle piante si differenzia più tardivamente durante lo sviluppo (poco prima della formazione del fiore).

Negli animali, lo stato epigenetico viene ripristinato nelle cellule della linea germinale; per esempio, nei mammiferi i segnali di metilazione sui geni imprintati vengono cancellati e poi reinstaurati a seconda del sesso. Nelle piante, i segnali epigenetici sembrano essere conservati nelle cellule della linea germinale. Uno dei motivi per cui le piante possono essersi evolute in modo da mantenere nelle loro linee germinali i segnali epigenetici presenti nelle loro cellule somatiche è che i genomi vegetali hanno più elementi trasponibili (TE) rispetto ai genomi animali e i TE vegetali sono più attivi nel regolare la trascrizione genica rispetto a quelli animali. L'eredità epigenetica relativamente stabile degli stati trascrizionali nelle piante potrebbe quindi essersi evoluta per tenere sotto controllo i TE e impedire loro di influenzare la trascrizione genica.

19.20 a. I risultati confutano l'ipotesi che l'ambiente dell'utero delle femmine gialle influenzi il colore della progenie. Se l'ambiente dell'utero giallo fosse il motivo per cui la progenie risulta in media più chiara quando le madri sono più chiare, allora gli embrioni $A^{VY}a$ trasferiti nell'utero di madri surrogate nere (aa) dovrebbero essere più scuri che non se rimanessero nel grembo di femmine gialle; quindi, alcuni degli embrioni trasferiti dovrebbero svilupparsi in adulti grigi, ma questo risultato non è stato osservato.

b. I topi che ereditano il loro allele A^{VY} dalle femmine gialle non si sviluppano mai come grigi [vedi l'incrocio in alto a sinistra (rosa) nel diagramma che accompagna questo problema nel testo]. Il colore dei maschi A^{VY} non influenza quello della progenie che eredita il loro allele A^{VY} , e ci si aspetterebbe che alcuni individui della progenie fossero grigi [vedi il lato destro (blu) del diagramma]. Pertanto, l'allele A^{VY} nella progenie dell'incrocio di maschi $A^{VY}a$ e femmine $A^{VY}a$ deve provenire dal maschio. L'osservazione che tale progenie $A^{VY}a$ grigia potrebbe essere ottenuta da madri gialle significa che né il citoplasma degli ovociti né l'ambiente dell'utero delle madri gialle impediscono ai topi grigi di svilupparsi dopo la fecondazione.

19.21 a. Perché l'ereditarietà dello stato "on"/"off" dell'epiallele A^{VY} è strettamente materna, mentre tali informazioni epigenetiche vengono trasmesse in modo biparentale nel caso di $Axin^{Fu}$? Forse i segnali di metilazione su A^{VY} sono più facilmente cancellabili nella linea germinale maschile che nella linea germinale femminile. In alternativa, la differenza potrebbe risiedere nel background

genetico dei due ceppi di topi. Nel background genetico del ceppo A^{VY} , lo stato di metilazione di tutti gli epialleli è più stabile nella linea germinale femminile rispetto a quella maschile, ma questa differenza non si verifica nel background genetico del ceppo $Axin^{Fu}$.

b. Il fatto che le informazioni sullo stato "on"/"off" di $Axin^{Fu}$ possano essere trasmesse paternamente suggerisce che nelle femmine gialle l'utero o l'ooplasma non destabilizzino automaticamente tutti i segnali di metilazione nel genoma. Pertanto, ciò che viene osservato per A^{VY} è quasi certamente la trasmissione di informazioni epigenetiche; è improbabile che l'utero o l'ooplasma nei topi gialli facciano diventare più gialla la loro progenie A^{VY} .

19.22 a. I segnali di metilazione del DNA in A^{VY} sono correlati al fenotipo ed esiste un meccanismo (DNMT, la metilasi di mantenimento) per copiare tali segnali durante la divisione cellulare. Ha senso presumere, quindi, che i segnali di metilazione siano i determinanti diretti dello stato "on/off". Il fatto che i segnali di metilazione scompaiano nella blastocisti, per essere reintegrati successivamente, significa che la memoria cellulare dello stato "on"/"off" – almeno nella embriogenesi precoce – è veicolata da qualche altro segnale epigenetico.

Questo risultato fornisce ulteriori prove del fatto che la memoria cellulare dello stato "on"/"off" di A^{VY} può effettivamente essere veicolata da qualcosa di diverso dalla metilazione del DNA e suggerisce che i segnali cruciali sono probabilmente le modificazioni istoniche. La metilazione del DNA, quindi, è una conseguenza dei segnali istonici.

b. Quando uno zigote di topo ha la metà della quantità normale di proteina Mel-18 ($Mel-18^-/Mel-18^+$), le informazioni sullo stato "on"/"off" di un allele A^{VY} paterno possono essere ereditate. Pertanto, la proteina Mel-18 deve normalmente impedire la trasmissione paterna dello stato "on"/"off" di A^{VY} . Come affermato nel problema, Mel-18 non è fornito dalla madre nell'ovocita, ma è prodotto dal genoma zigotico, che viene espresso nella blastocisti solo dopo che tutti i segnali di metilazione su A^{VY} sono stati cancellati. Data la sua funzione nota (Mel-18 è un componente di un complesso di modificazione degli istoni che chiude la cromatina), il ruolo normale di Mel-18 potrebbe essere quello di cancellare i segnali istonici dagli alleli A^{VY} ereditati paternamente che costituiscono la memoria dello stato "on"/"off".

Non è noto come Mel-18 rimuova questi segnali solo dall'allele paterno A^{VY} .

Ci si potrebbe quindi chiedere: se la metilazione non è il segnale epigenetico ereditario di A^{VY} , perché la progenie che ha ereditato l'allele A^{VY} da madri che hanno ingerito cibo particolarmente

ricco di gruppi di donatori metilici è più leggera (minore espressione di A^{VY}) rispetto a quella delle madri che hanno assunto cibo normale? Una spiegazione è che esiste un crosstalk tra la metilazione del DNA e i segnali delle modificazioni istoniche che vengono ereditati (vedi Figura 19.9b).