

lezione 23-24

venerdì 11 Dicembre 2009

corso di genomica

a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

corso di laurea specialistica
magistrale Biotecnologia

lezione 15 Dicembre Programmi informatici per confronti
genomici. Dr.P. D'addabbo

verso l'epigenetica

metodi di analisi genomica

cercare sul genoma le funzioni

cercare i meccanismi che attivano le funzioni

cercare le strutture che attivano i meccanismi per esprimere le diverse funzioni

cercare come variano le strutture che attivano i meccanismi per esprimere le diverse funzioni

regolazione è una definizione troppo generica?
chi è che regola i regolatori? il sistema è ciclico

dagli enhancers alle Regulatory Regions

complessi regolativi = strutture che contengono più enhancers ma anche gli insulators e modulators (inibitori)

effetto sinergico : più facile da stabilire perchè funziona su geni reporter anche su cellule in vitro

abbiamo visto che le RR o enhancer complex possono distare fino a megabasi dai geni che controllano

come si possono studiare?

come sono regolate?

regolazione dei regolatori

regolazione trans e regolazione cis

il terzo livello è quello della regolazione epigenetica

ma anche questa può essere cis regolata e trans regolata

la regolazione cis funziona tramite regioni di DNA a cui si legano complessi proteici e permettono il rimodellamento della cromatina con l'avvicinamento del complesso al promotore

la regolazione trans funziona tramite proteine che interagiscono ad uno dei tanti possibili livelli direttamente o indirettamente

il livello epigenetico

il livello epigenetico è quello che precede la fase in cui si attivano le regioni regolative

però essendo anch'esso un sistema a base enzimatica funziona con una regolazione analoga alle altre, ma che produce effetti sulla cromatina e sul suo funzionamento

come già abbiamo detto in un sistema circolare in cui la cellula riceve stimoli dall'esterno e li trasmette all'interno e viceversa

- difficile definire quale sia il livello superiore
- sicuramente esiste un presente ed un poi
- si tratta di vedere quale è il punto presente e da quello discendono gli altri ma solo temporalmente

una Regione Regolativa

deve avere dei confini “boundaries” “insulators” (CTCF)

e poi ha le regioni interne con gli enhancers (DNase I)

al momento attuale si conoscono gli enhancers con i siti di consensus per i fattori di trascrizione

esistono altre informazioni sui siti di metilazione (epigenetici)

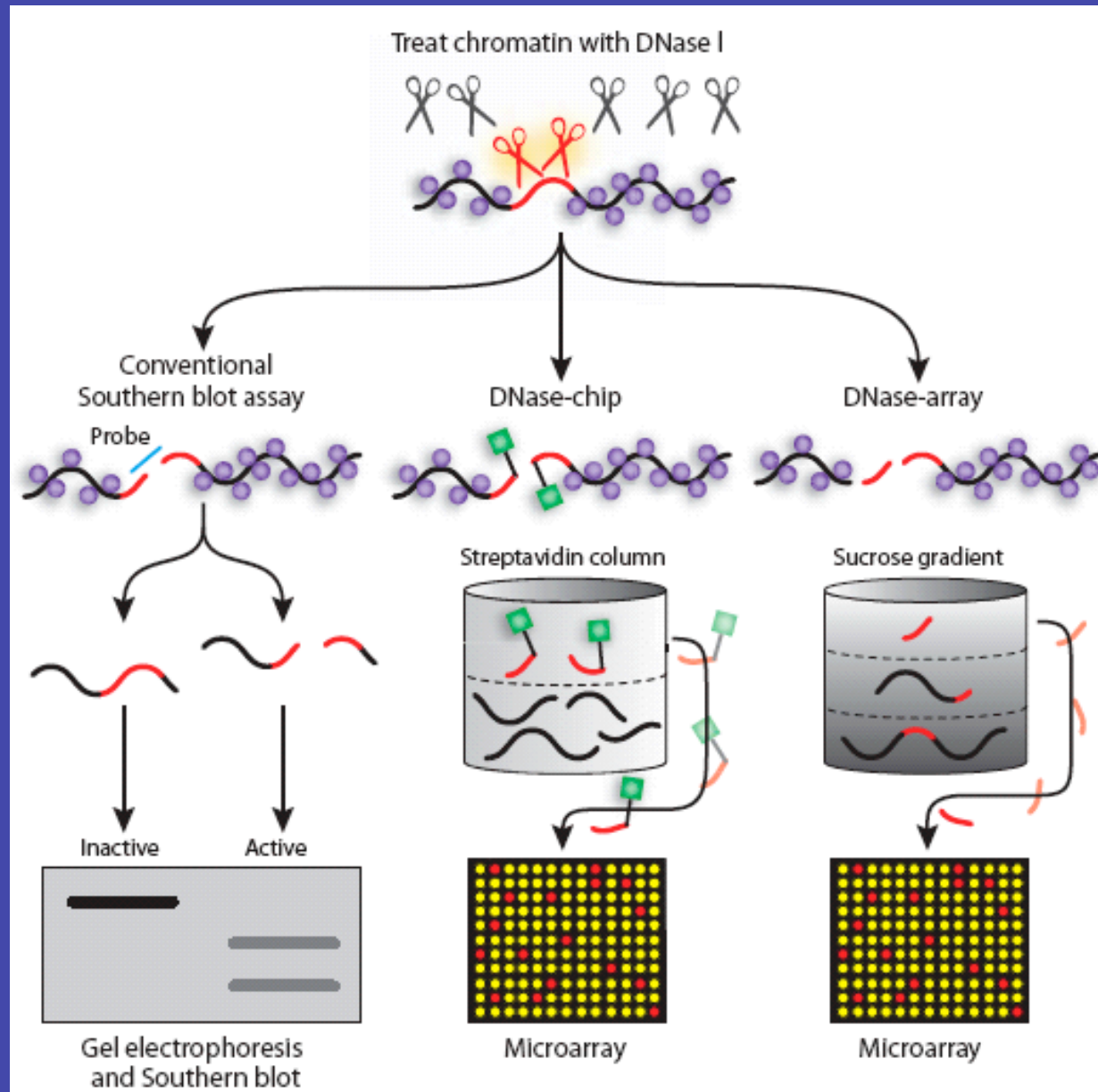
si potrebbero individuare i siti di binding o di avvolgimento ai nucleosomi

dal DNase assay

per individuare una regione con possibile attività di enhancer
si incomincia a fare i test di sensibilità alla DNase I

si stabilisce un pattern della regione : una mappa

strategia DNase I assay



throughput analysis of DNase

Historically, the simplest method to robustly identify active gene regulatory elements has been enzymatic digestion of nuclear DNA by nucleases such as DNaseI. Regions of extreme chromatin accessibility to DNaseI, commonly known as DNaseI hypersensitive sites, have been repeatedly shown to be markers for all types of active cis-acting regulatory elements, including promoters, enhancers, silencers, insulators, and locus control regions. However, the original classical method, which for over 25 years relied on Southern blot, was limited to studying only small regions of the genome. Here we describe the detailed protocol for DNase-chip, a high-throughput method that allows for a targeted or genome-wide identification of cis-acting gene regulatory elements.

Methods Mol Biol. 2009;556:177-90. Mapping regulatory elements by DNaseI hypersensitivity chip (DNase-Chip). Shibata Y, Crawford GE.

le RR inserite in un contesto

il contesto in cui stanno inserite è tutto da scoprire

è tanto se si sa che svolgono il ruolo di regione regolativa

il meccanismo di azione si comprende tramite analisi 3D

la tridimensionalità  dinamica spazio/temporale

metodi ChIP e fluorescenza microscopi confocali

un esempio : la 3'RR delle IgH

la regolazione delle immunoglobuline

contemporaneità della maturazione del linfocita B e delle immunoglobuline

le immunoglobuline sono costituite da una catena pesante ed una leggera e la produzione deve essere coordinata

la produzione è regolata nelle cellule della memoria dopo lo switch isotipico e poi riattivata quando sono stimulate

all'esterno i linfociti B partecipano con i T e tutti gli altri alla risposta immunitaria umorale / cellulo mediata
quindi la regolazione deve tenere conto di tutte queste interazioni

la struttura della RR della catena pesante

studiata nel topo e ritrovata nell'uomo e in tutti i mammiferi
è altamente conservata

i meccanismi della sincronizzazione non sono ancora noti

è supposto che la soluzione stia nella compartimentazione
nucleare

ritorna l'ipotesi dell'



TOR VERGATA

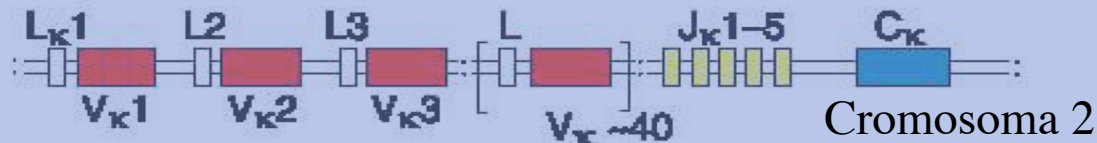
mappe dei loci IgH e IgL

LOCI DELLE CATENE PESANTI E LEGGERE DELL'Ig

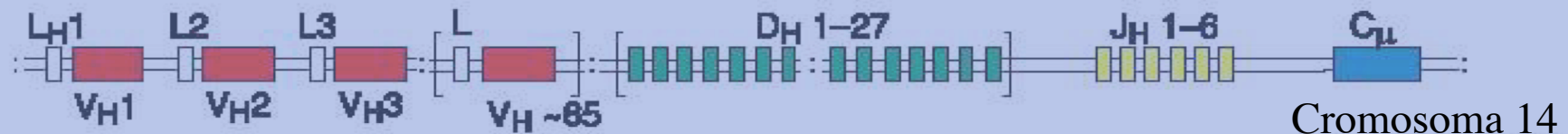
Locus catena leggera λ



Locus catena leggera κ



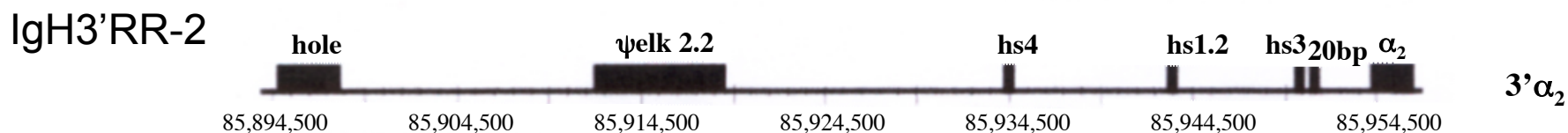
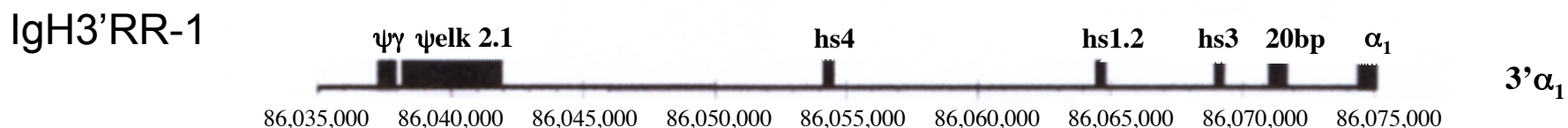
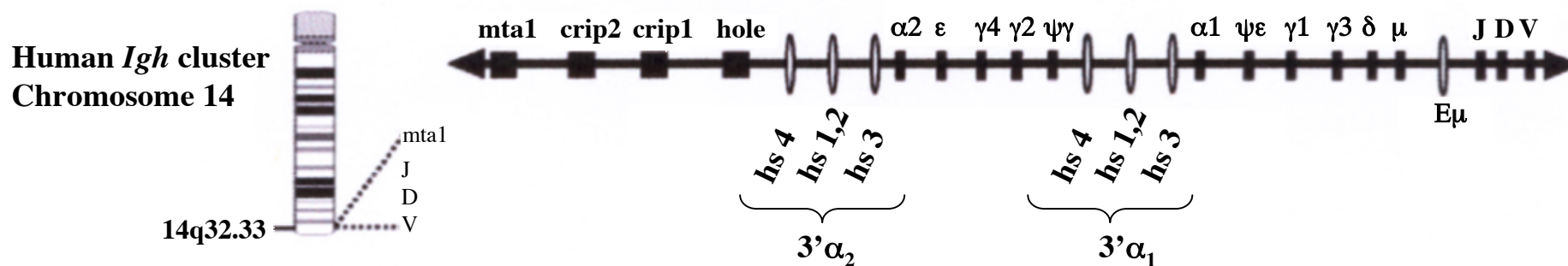
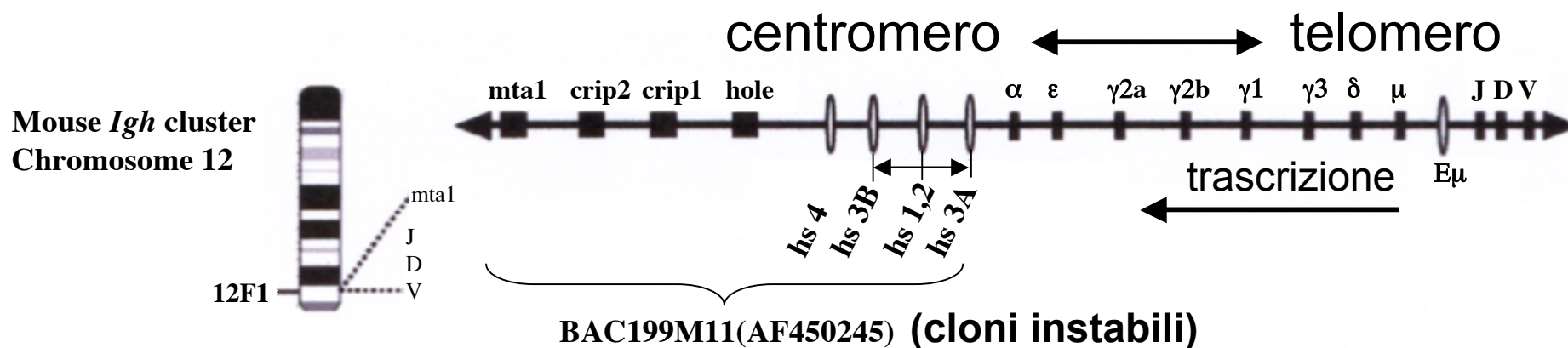
Locus catena pesante

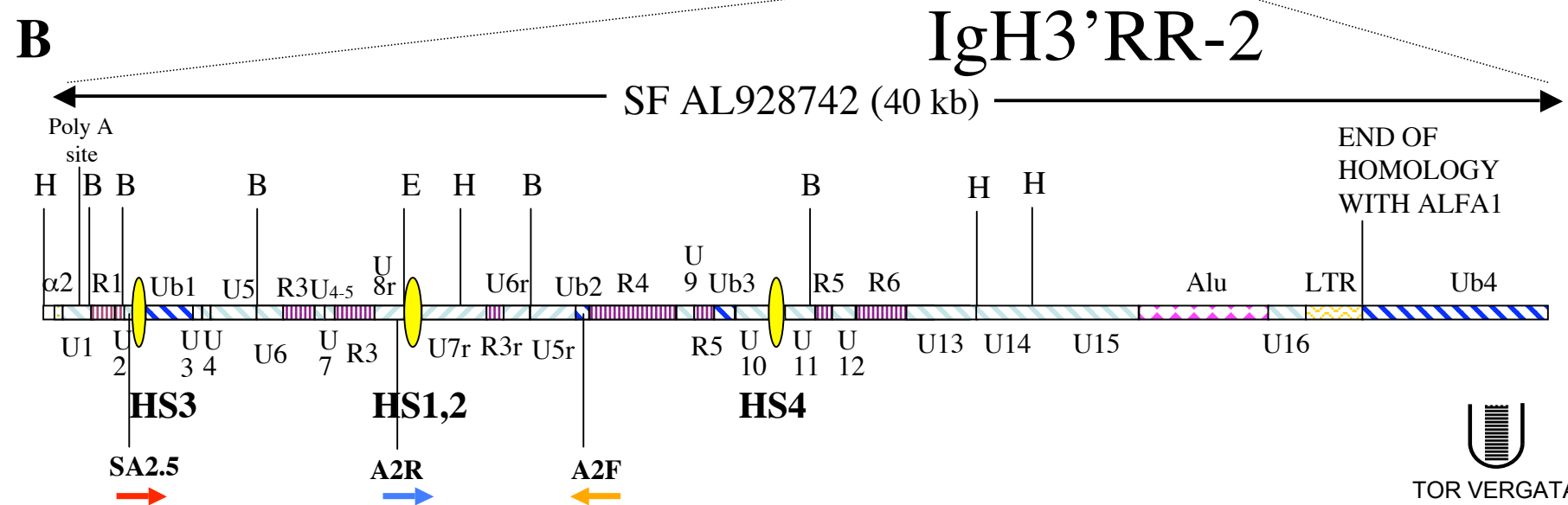
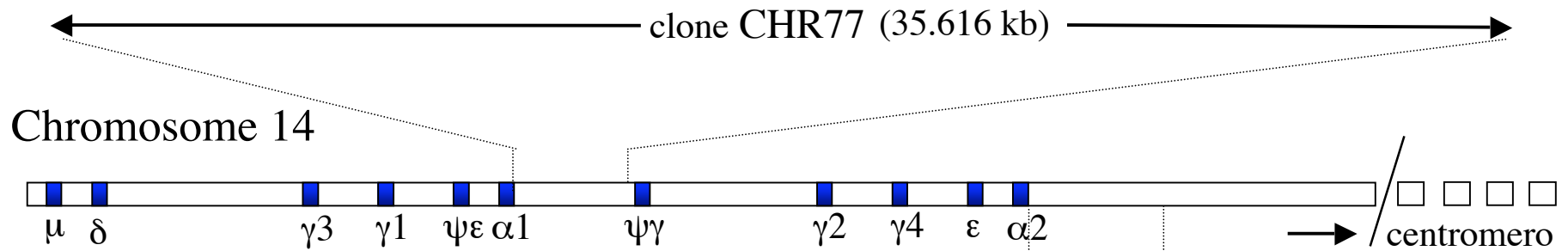
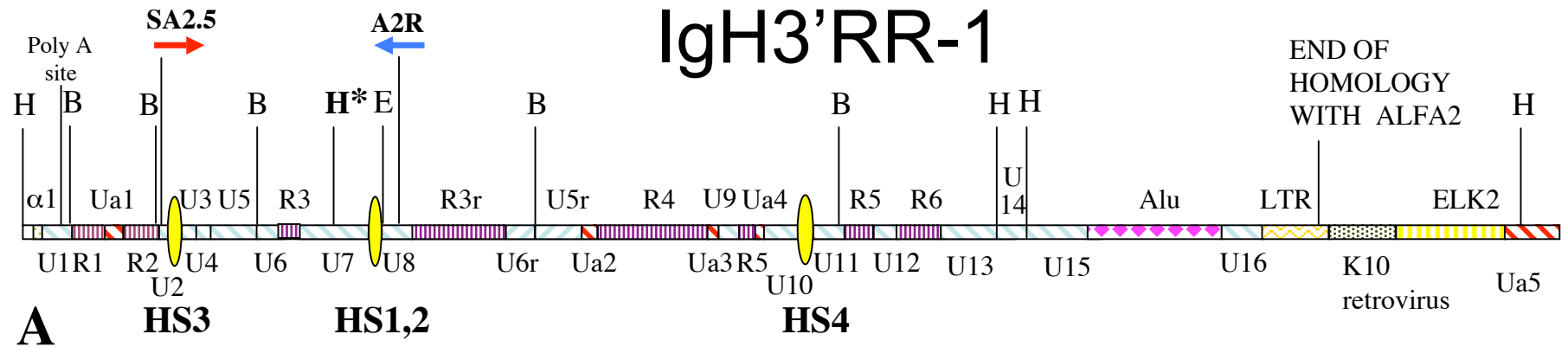


© 2000 Garland Publishing/Elsevier Science

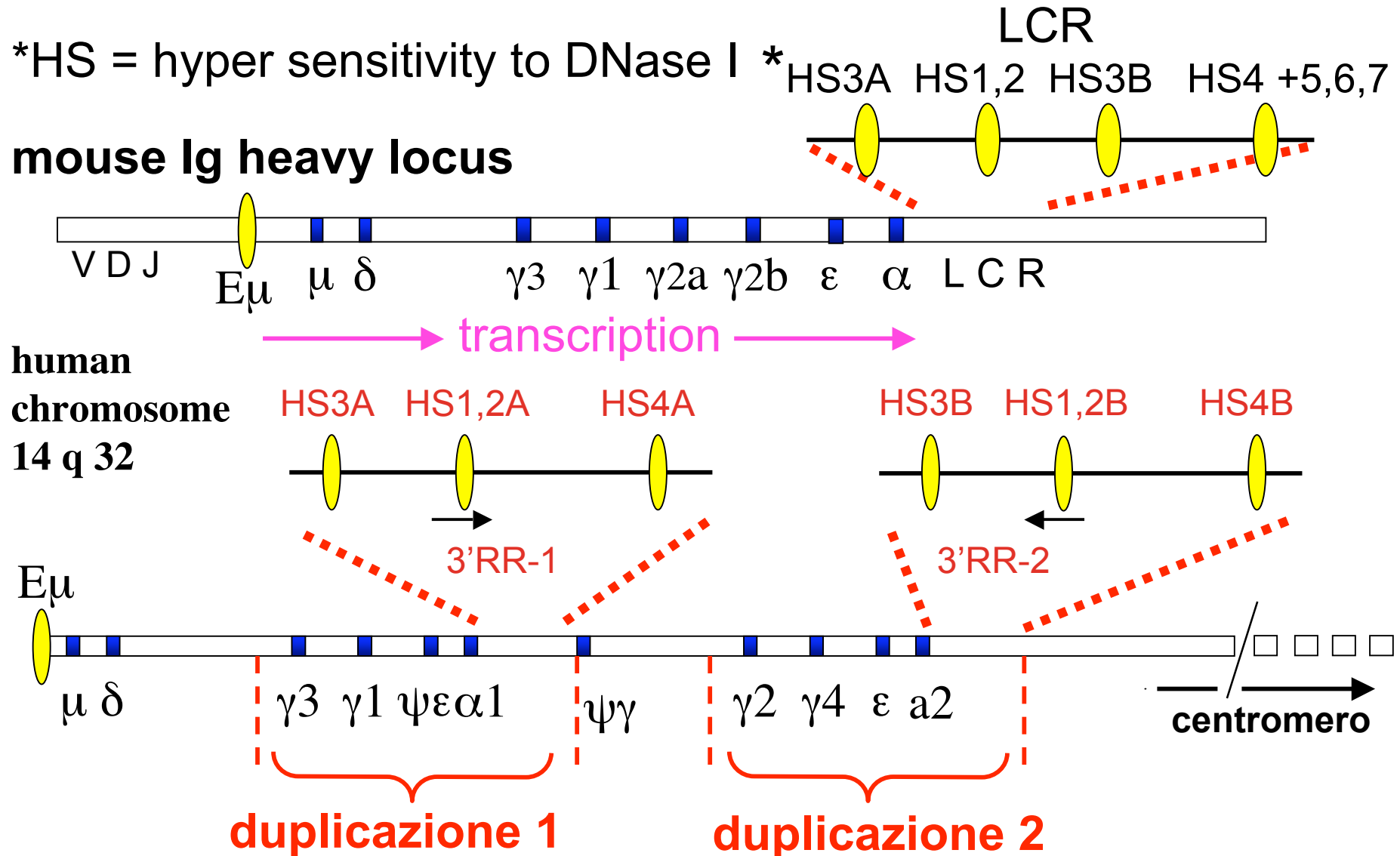
attivazione selettiva e coordinata dei fenomeni maturativi
(i siti di attacco alla matrice nucleare, colocalizzazione ?)

cluster Ig topo-uomo (duplicazione)





LCR locus control region (nel topo 4 enhancers) IgH3'RR-1/-2 (nell'uomo 3 enhancers/locus)



cosa ci dicono i confronti genomici

confronti nelle specie delle varie strutture conservate

- analisi della conservazione e variazione interspecifica

- analisi della variabilità intraspecifica (polimorfismi)

- individuazione delle regioni rilevanti

- metodi di analisi dei confronti genomici (lezione 15 Dic)

- ipotesi sui meccanismi

quali studi sono stati fatti sulle 3'RR IgH

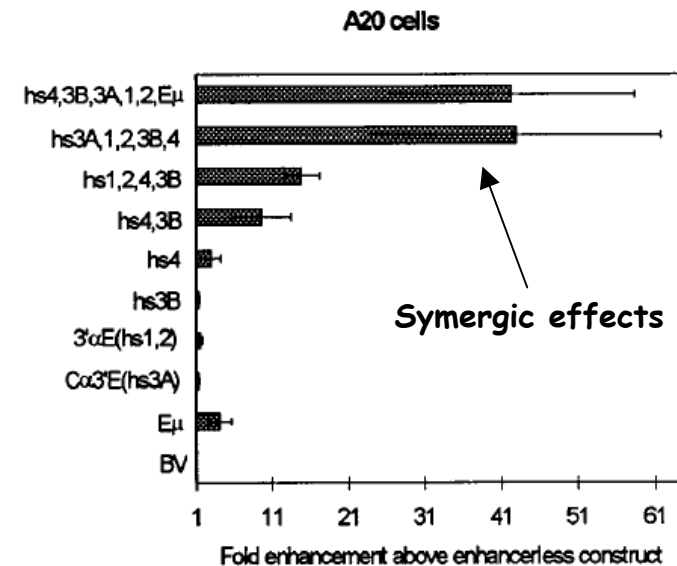
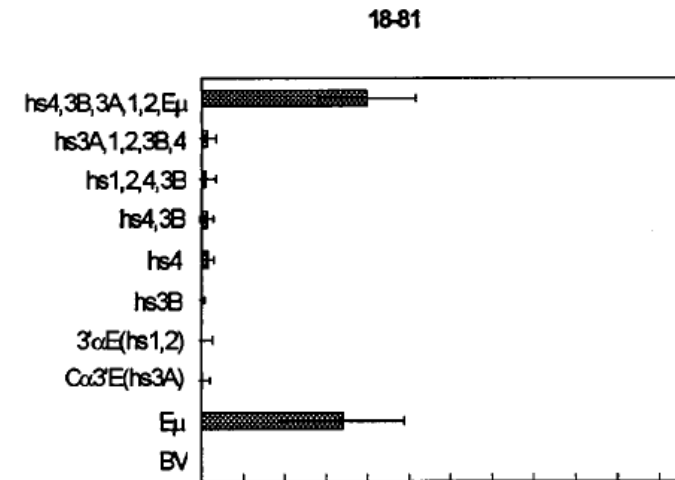
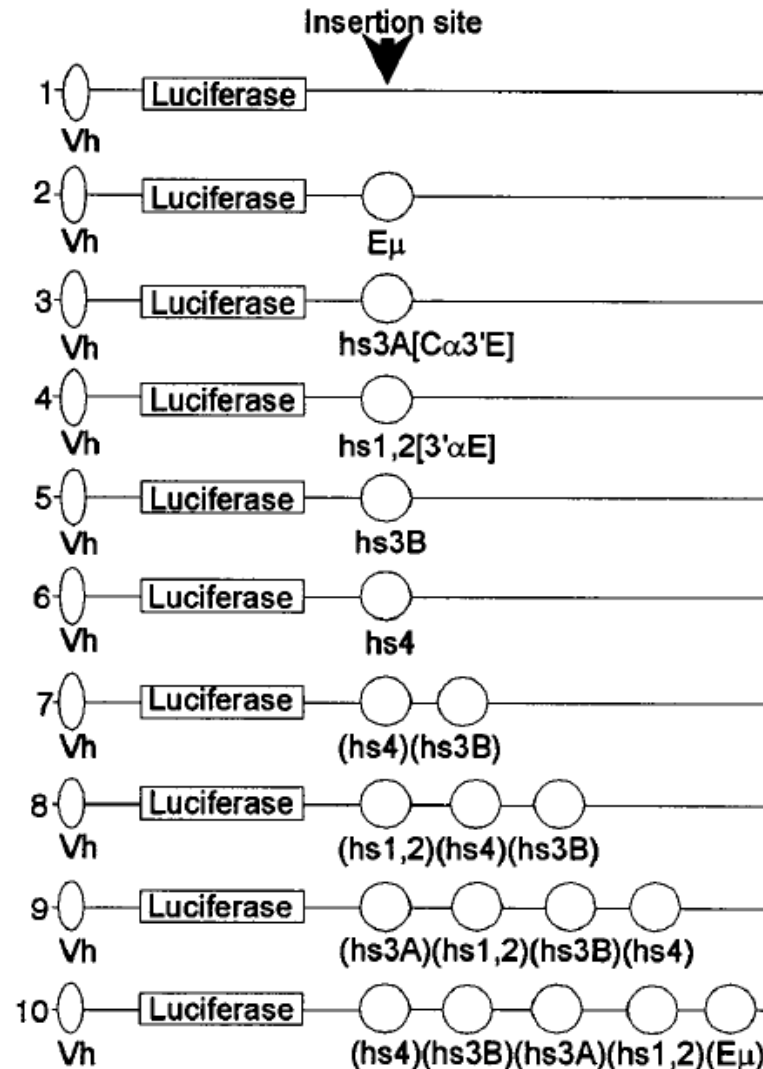
gli enhancers funzionano come un complesso?

il sistema è ridondante e le funzioni possono sopperire e sostituirsi alle altre per mantenere il sistema funzionante

per questo ci possono essere risultati discordanti tramite la disattivazione o delezione di parti del complesso

a volte dei topi transgenici per la mancanza di un enhancer non hanno dato fenotipo

synergism of HS3A-B-HS1,2-HS4



HS fragments are able to synergize with V_k, V_H, IgH germline promoters ($\gamma 2b$, $\gamma 3$, α , ϵ) and non Ig-promoters (c-myc) so as to enhance the transcription activity in a tissue and stage specific manner. (Ong *et al*, 1998)



perchè due 3'RR ? sono ridondanti ?

se nell'uomo ci sono due 3'RR ci sarà un motivo ?

3 domande + 1:

è cambiato il sistema di regolazione rispetto al topo ?

nell'uomo si possono studiare i polimorfismi (i topi di campagna si allevano male)

- dalle diverse forme alleliche si può capire il funzionamento delle due 3'RR ?

- hanno tempi di attivazione diversi?

- si attivano e disattivano in fasi diverse della vita del linfocita B?