

lezione 27-28

venerdì 18 Dicembre 2009

corso di genomica

a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

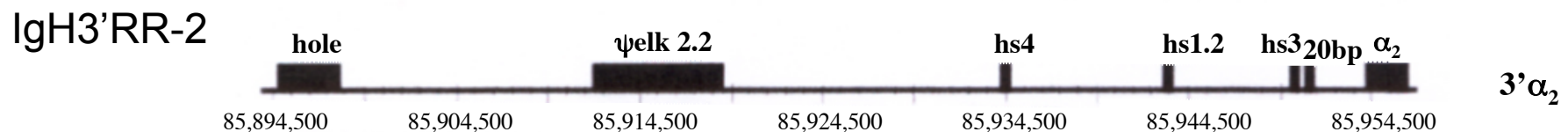
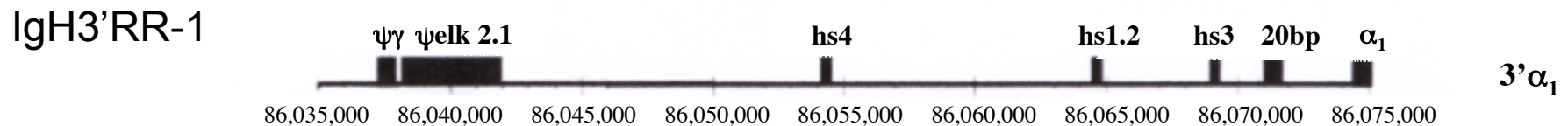
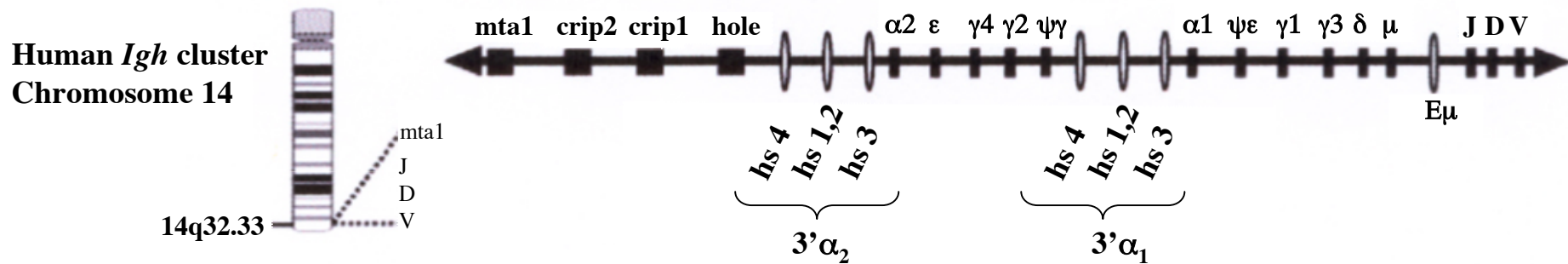
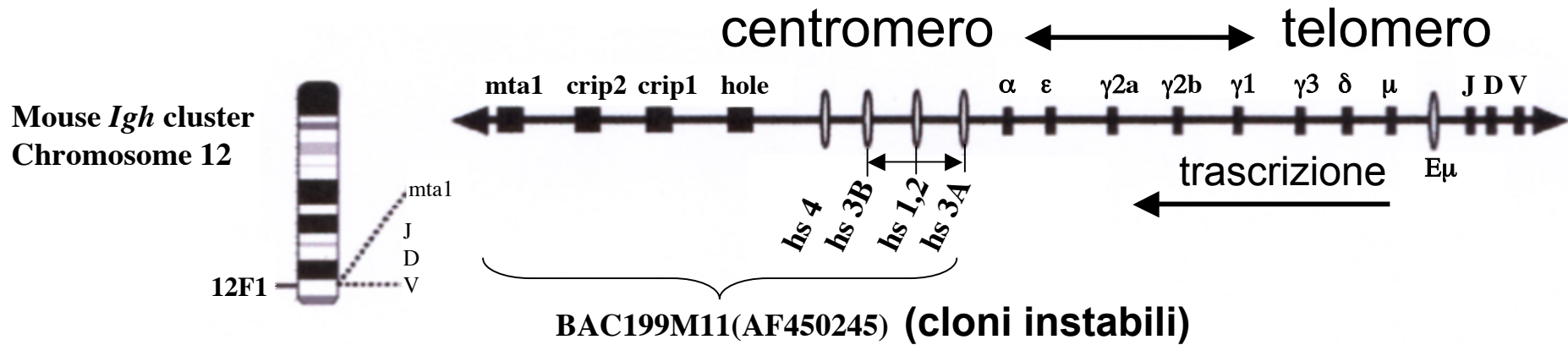
corso di laurea specialistica

magistrale Biotecnologia

esami: 1 febbraio

25 febbraio

cluster Ig topo-uomo (duplicazione)





perchè due 3'RR ? sono ridondanti ?

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

3 domande + 1:

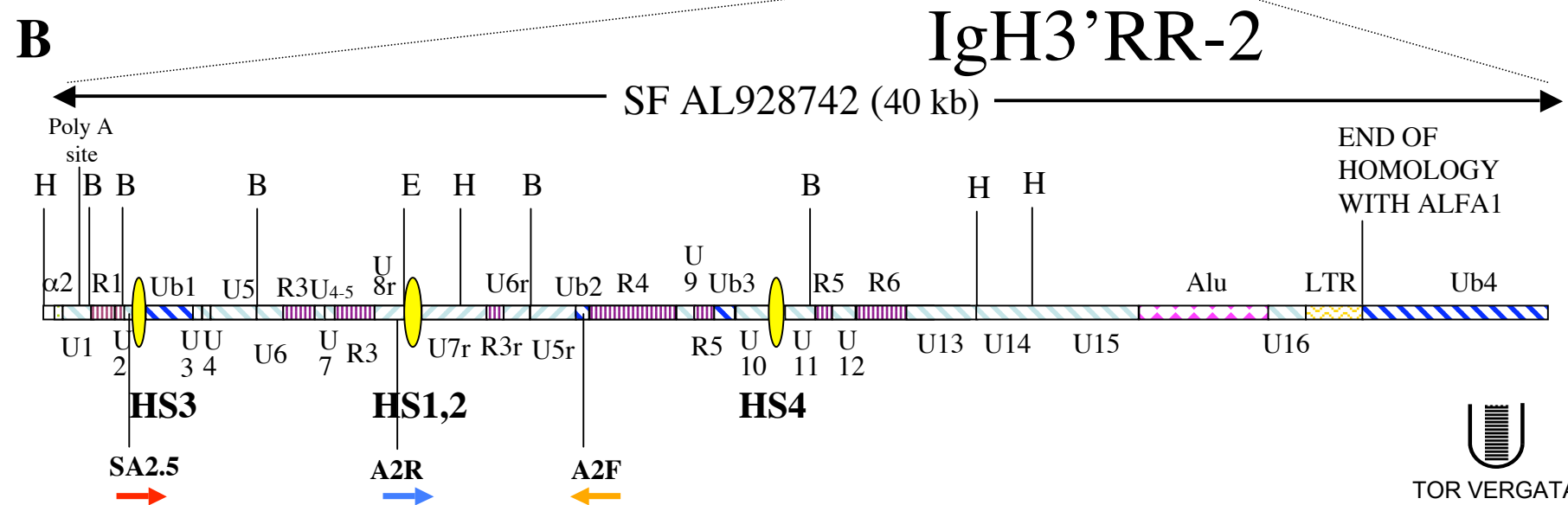
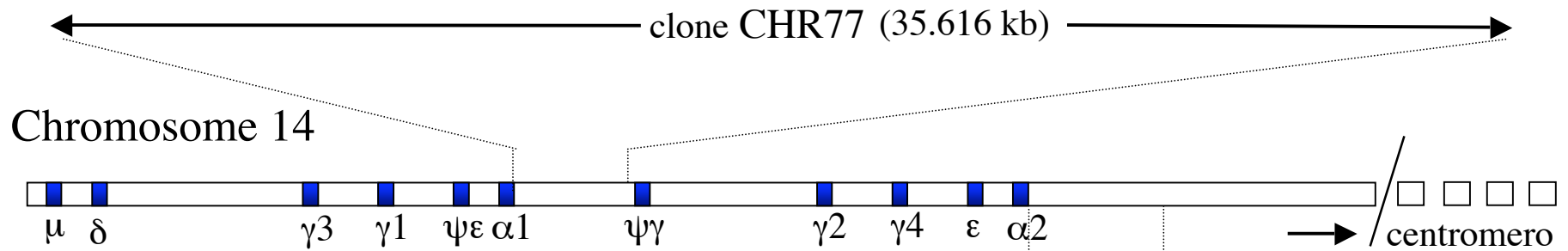
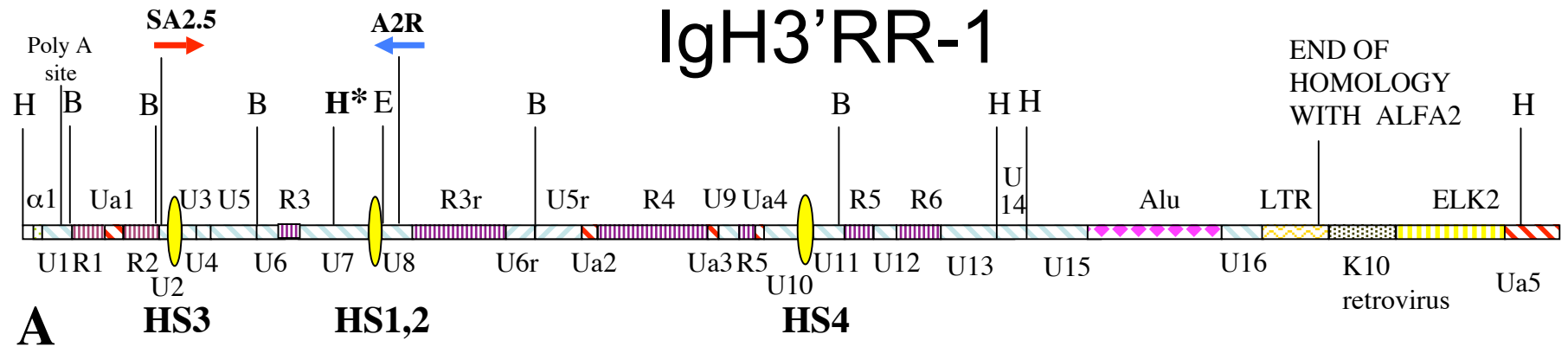
è cambiato il sistema di regolazione rispetto al topo ?

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?



solo HS1.2 è polimorfica

gli enhancer HS3 ed HS4 non sono polimorfici

HS1.2 è centrale e sta all'interno di una duplicazione

non si conosce molto delle funzioni al di là delle regioni conservate contenenti gli enhancers

le regioni intermedie sono poco conservate nelle specie anche all'interno dei mammiferi

è possibile studiare le associazioni nell'uomo tra polimorfismi, funzioni e patologie

se regola la risposta immunitaria

sul topo molti lavori indicano i meccanismi in cui la 3'RR si inserisce: BCR expression, Ig germline transcription, class switch, B cell maturation (molec e cell biol, topi transgenici)

nell'uomo lavori di biologia cellulare-molecolare confermano il ruolo importante delle 3'RR, ma sono due invece di una

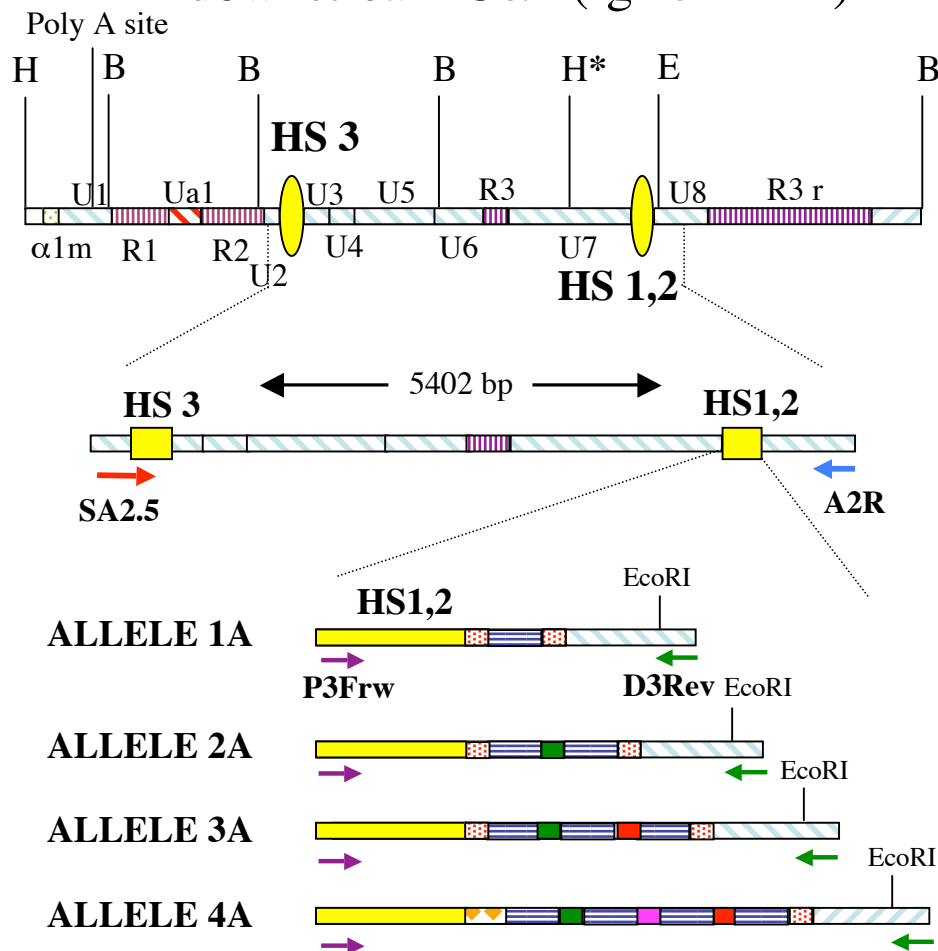
possibili differenze

sull'uomo si studiano i polimorfismi non possibili su topo

cosa sono i polimorfismi di HS1.2

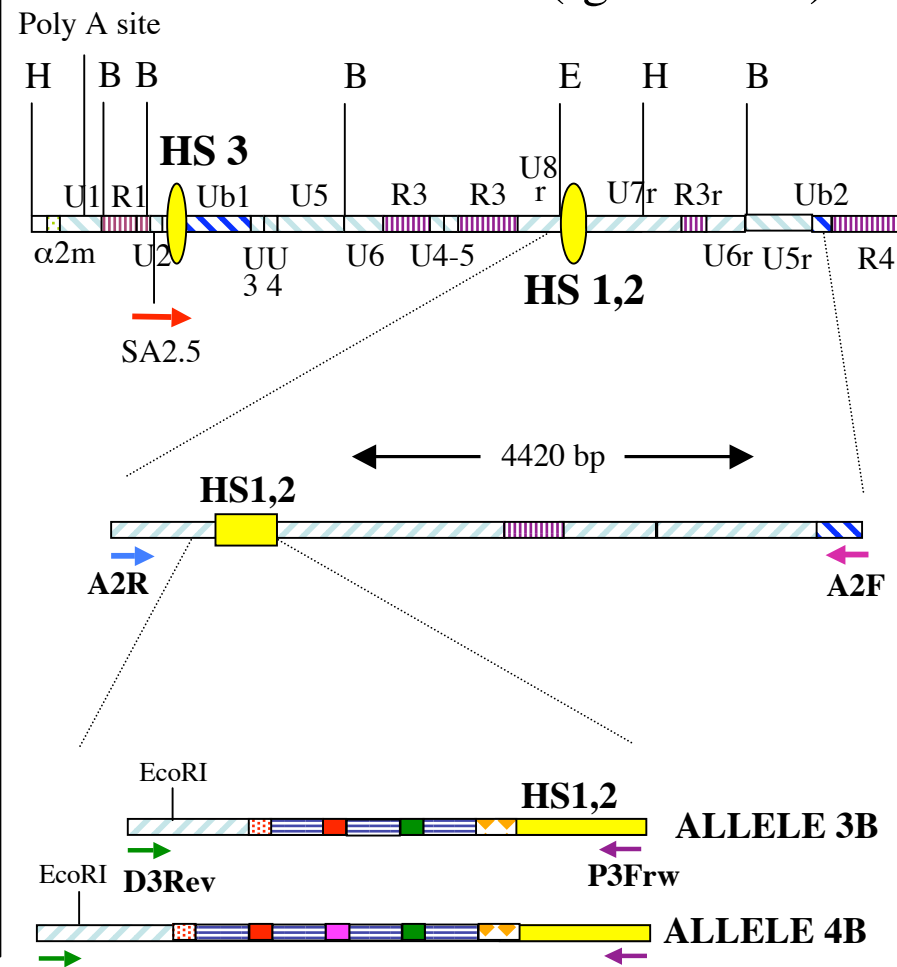
A

Selective amplification of HS1,2-A downstream Cα1 (IgH3'RR-1)

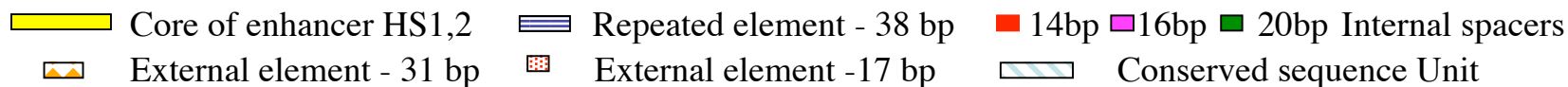


B

Selective amplification of HS1,2-B downstream Cα2 (IgH3'RR-2)



i polimorfismi

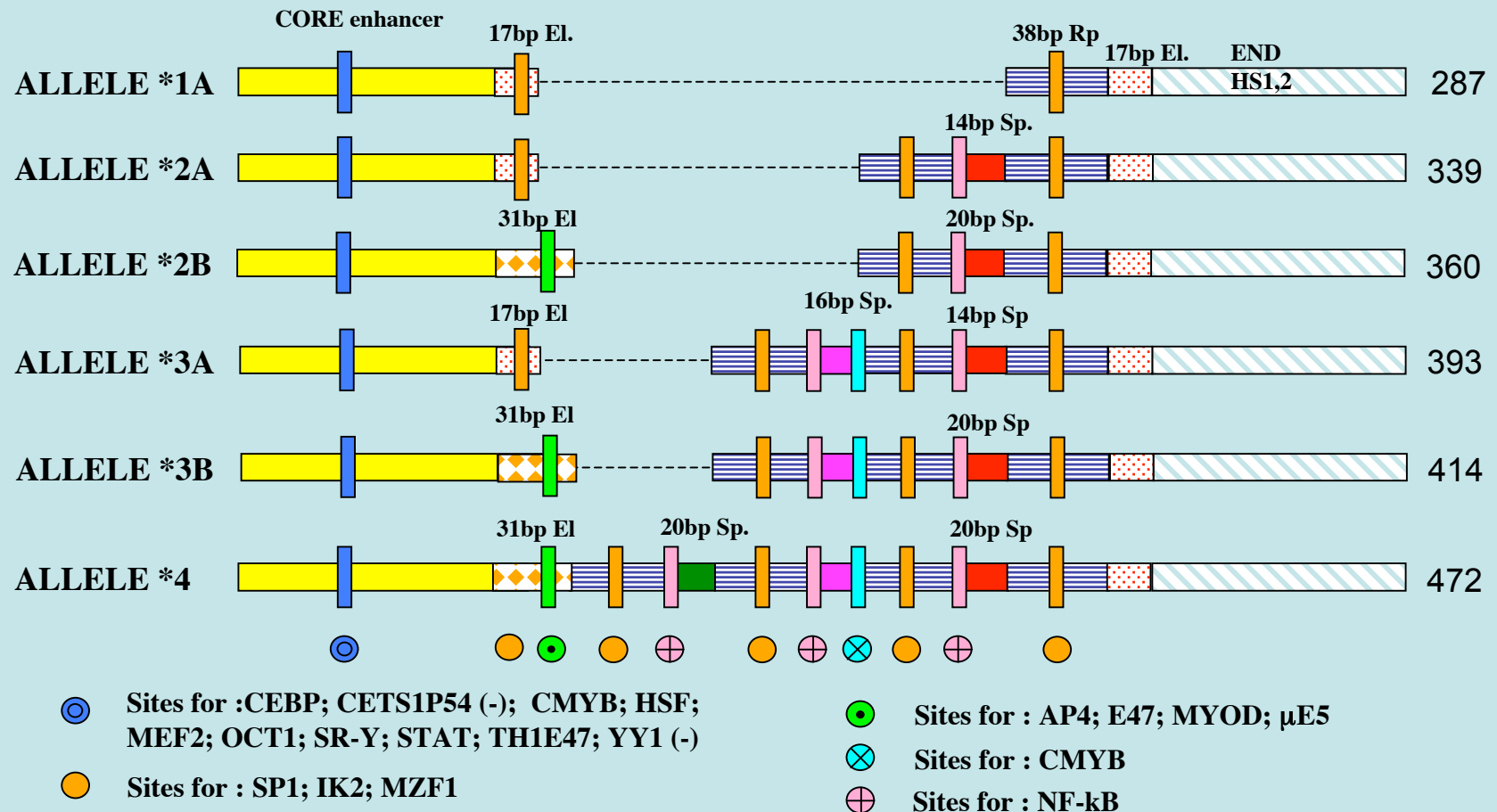




TOR VERGATA

6 alleli

Figure 3 polymorphism of HS1,2A





TOR VERGATA

Polymorphism of the human $\alpha 1$ immunoglobulin gene 3' enhancer HS1,2 and its relation to gene expression

YVES DENIZOT, ERIC PINAUD, CORINNE AUPETIT, CAROLINE LE MORVAN, EMMANUELLE MAGNOUX, JEAN CLAUDE ALDIGIER & MICHEL COGNÉ *Laboratoire d'Immunologie-UMR CNRS 6101, Faculté de Médecine, Limoges, France*

Immunology 2001, 103: 35-40

Genotypes	AA	BB	AB	AC	BC
Total number: 513	71/513	177/513	255/513	7/513	3/513
%	13.8	34.5	49.7	1.3	0.58

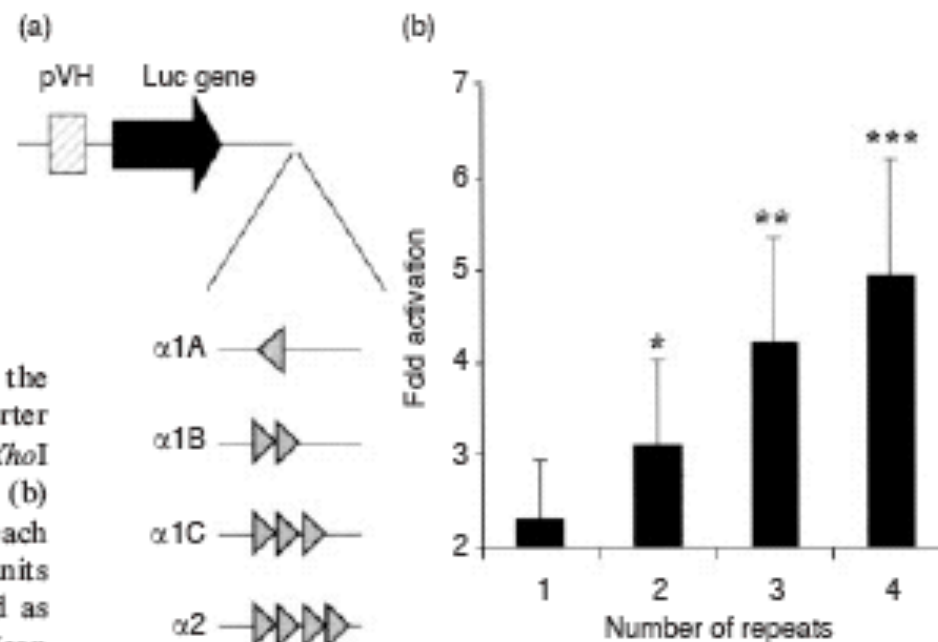
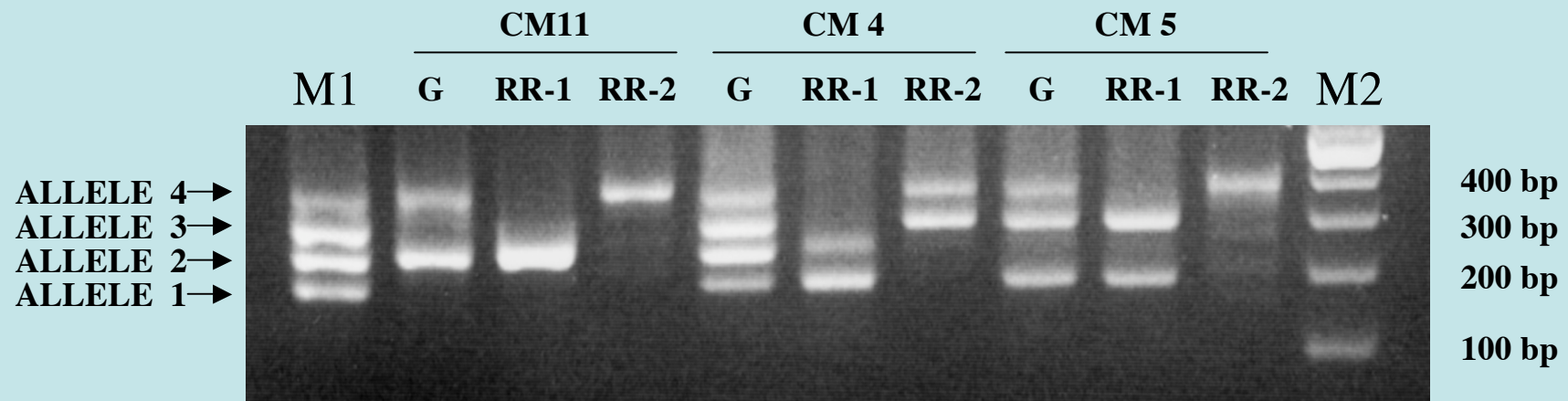


Figure 4. Transcriptional strength of the three PCR alleles of the $\alpha 1$ h1,2 enhancer and the $\alpha 2$ h1,2 allele in a luciferase gene reporter assay. (a) Construction: hs1,2 elements were cloned as *Bam*HI-*Xho*I fragments in *Bam*HI-*Sal*I sites of the pGL3-pVH vector. (b) Estimation of luciferase activity for the four fragments. For each assay, luciferase light units were divided by β galactosidase light units to normalise the cell transfection efficiency. Results are reported as fold-activation as compared to the pVH promoter basal activity. Mean $\pm$ SEM of four independent experiments with six assays in parallel. * $P=0.005$, ** $P=0.024$ and *** $P=0.019$ as compared to $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ and $\alpha 1C$, respectively (*t*-test for paired samples).

gel genomico e selettivo degli alleli

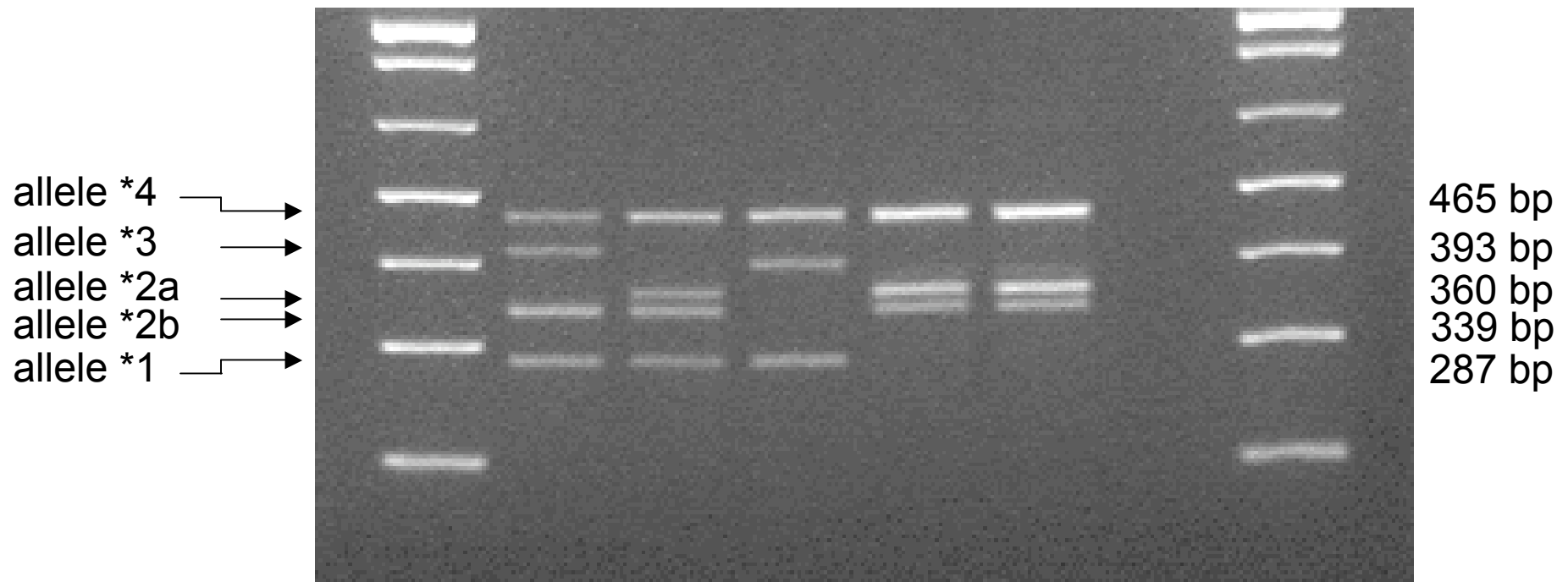


amplificazione G=genomica o selettiva RR-1; RR-2

nell'amplificazione genomica si vedono gli alleli delle 2 regioni senza PCR selettiva applicata invece per amplificare selettivamente A o B.

i due alleli *2a, *2b e *3a, *3B

amplificazioni da DNA genomico dalle due 3'RR senza selezione



avevamo visto che nel locus 3'RR-B l'allele *3 aveva l'elemento 31mer rispetto al 17mer del locus 3'RR-A adesso abbiamo (ho) visto che anche l'allele *2 esiste nelle due forme con il 17mer ed il 31mer, cambiano le consensus!



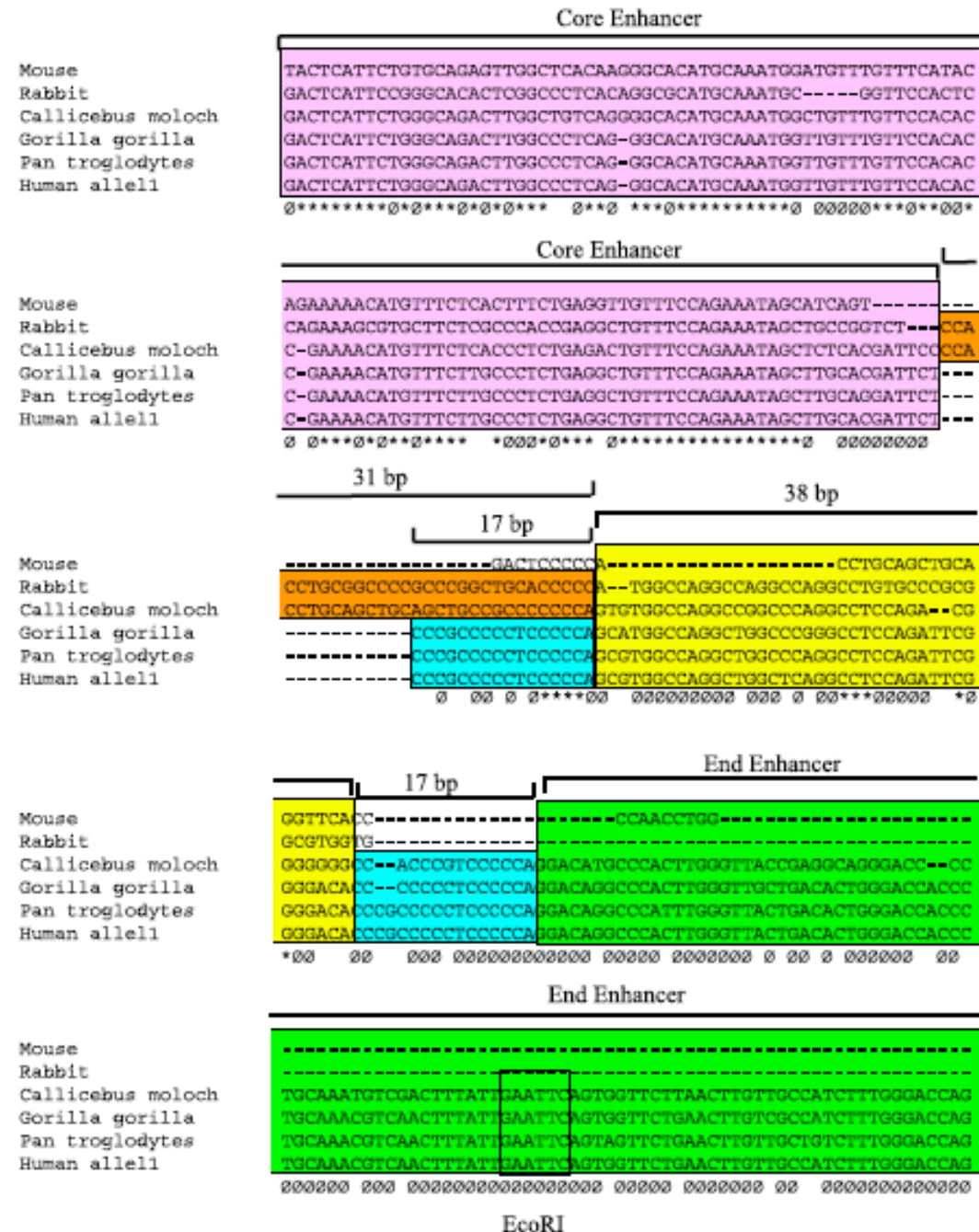
TOR VERGATA

allineamenti

Evoluzione di HS1,2
in diverse specie di
mammifero e di primati

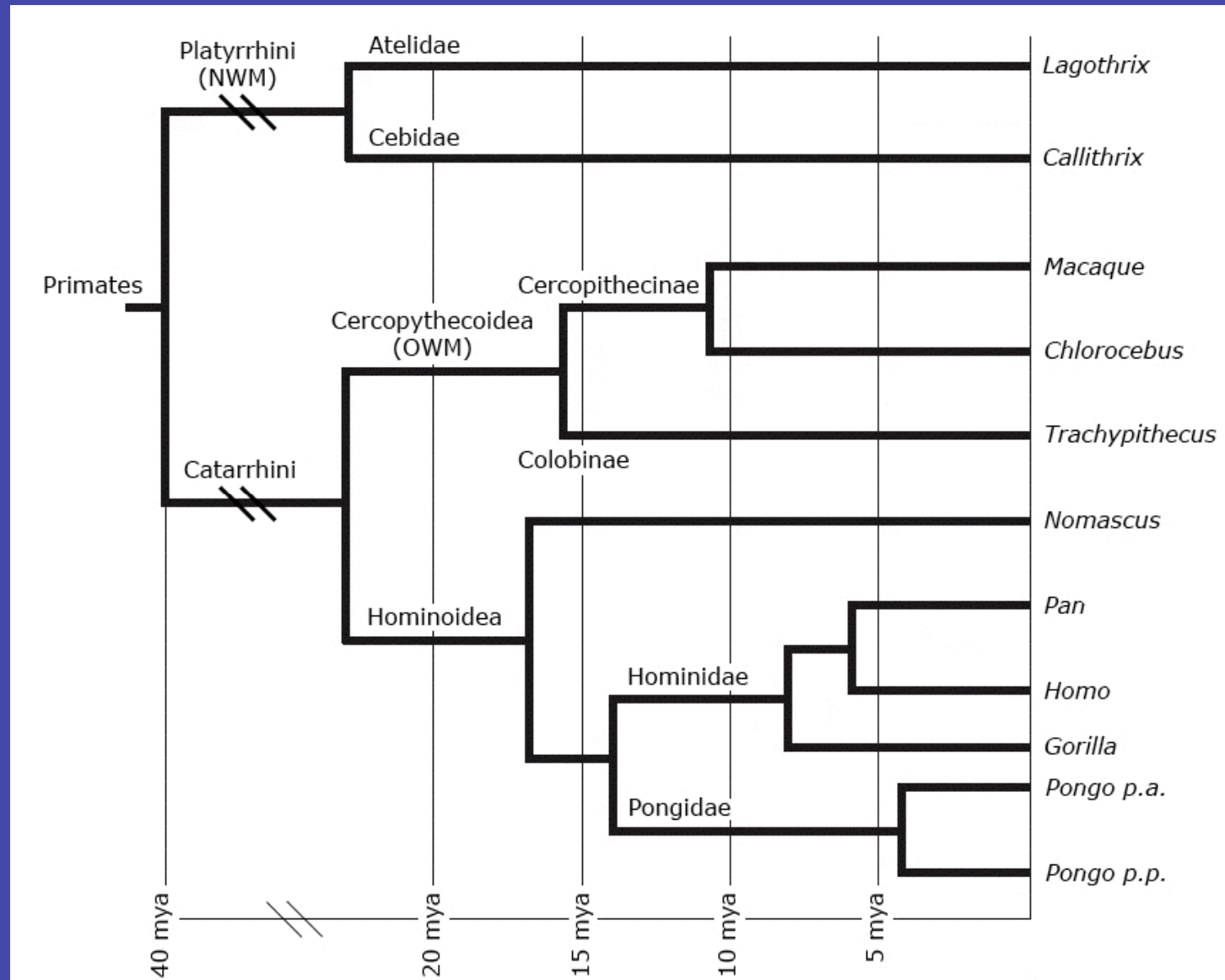
il core dell'enhancer è più
conservata (rosa) ed il
31mer (arancio) potrebbe
essere la forma ancestrale

stiamo cercando di clonare
le forme polimorfiche di
altre specie (topo macaco,
scimpanzè) per confrontare
la funzionalità in cellule di
topo e uomo

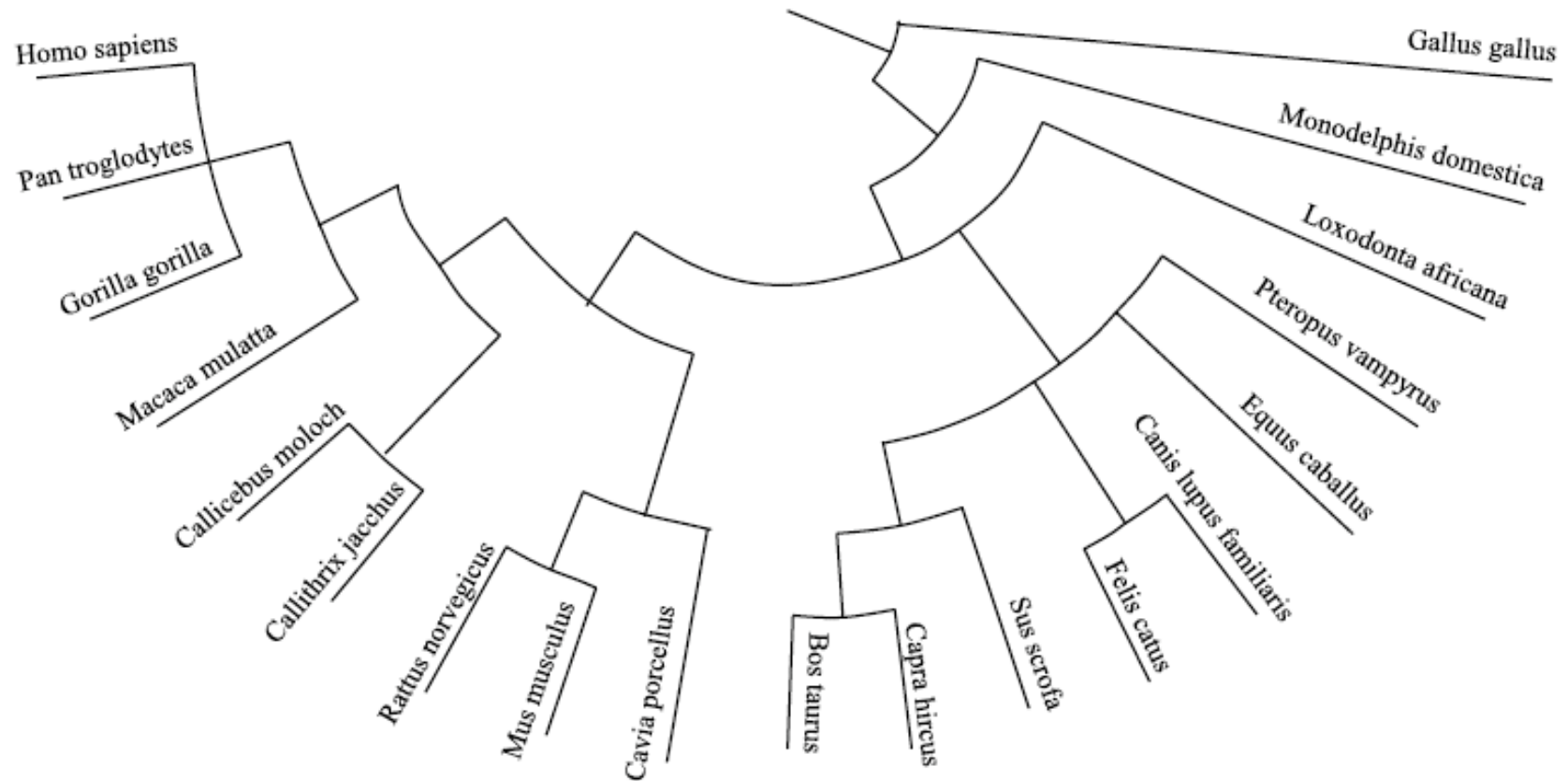


[illegible]

platirrine - catarrhine 40 Mya



evoluzione della IgH 3'RR



strutture conservate di HS1.2

manca la sequenza di Panda uscita il 13 Dicembre 2009

species	core	17bp (5')	31bp (5')	38 bp	17bp (3')	low similarity (wrong sequence)
allele 1 (Homo sapiens)	x	x		x	x	
Cavia porcellus	x	x		x	x	
Monodelphis domestica				x	x	x
Macaca mulatta	x		x	x	x	
Bos taurus	x					x
Callicebus moloch	x					x
Callithrix jacchus	x		x	x	x	
Canis familiaris	x		x	x	x	
Capra hircus		x		x		x
Equus caballus	x		x	x	x	
Felis catus	x		x	x	x	
Gallus gallus	x	x				x
Gorilla gorilla	x	x		x	x	
Mus musculus	x					
Pan troglodytes	x	x		x	x	
Pteropus vampyrus	x					
Rattus norvegicus	x					
Sus scrofa	x					x

quali altre analisi ?

il polimorfismo si può studiare dal punto di vista funzionale

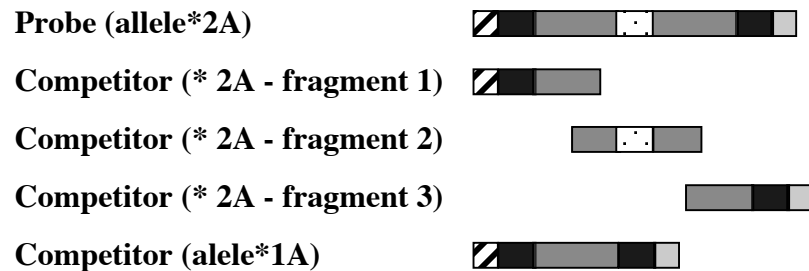
struttura e modelli in “silicio” (transcr. fact.; 3D models)

CHIP chromosome immuno-precipitation

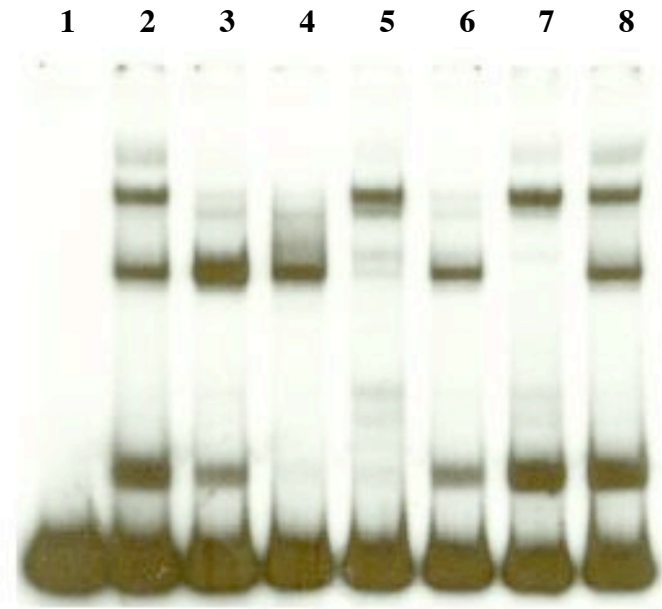
EMSA electrophoretic mobility shift assay:

- incubazione della sonda con le consensus con estratti nucleari
- corsa elettroforetica
- competizione con anticorpi o con consensus che sottraggono la formazione del complesso e fanno sparire il segnale

mappatura tramite competizione con “gel shift” EMSA



a →
b →
c →
d →



SP1 compete banda B *

NF-kB “ banda C *

frgm 1 ≈ allele *1A comp B (+D) *

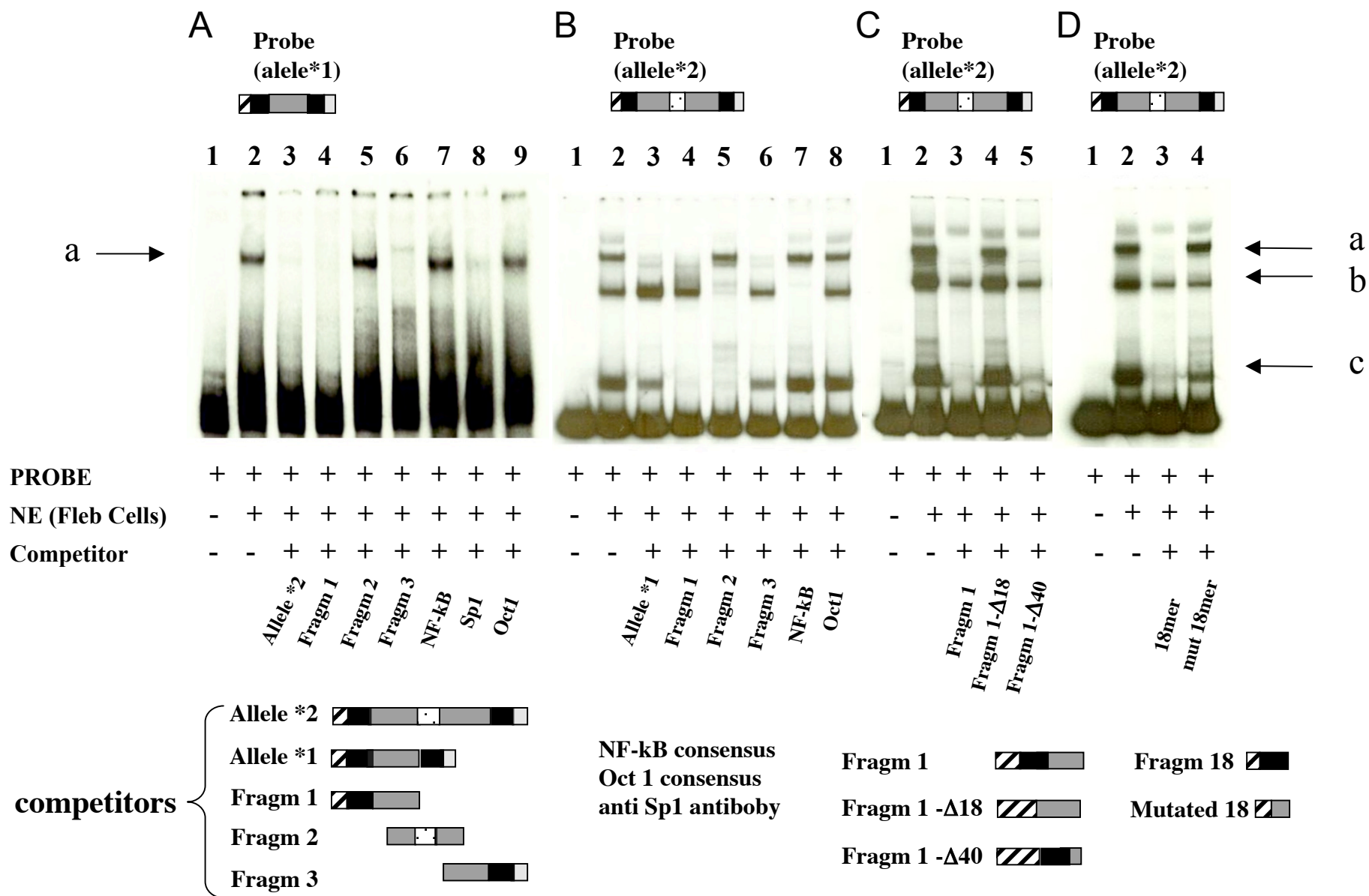
frgm 2 comp C (+D) ≈ NF-kB *

frgm 3 “ B (-D) *

Probe (allele *2A)	+	+	+	+	+	+	+	+
NE (Fleb cells)	-	+	+	+	+	+	+	+
Competitor	-	-	+	+	+	+	+	+
			Allele *1A	*2A frg 1	*2A-frg2	*2A-frg3	NF-kB	Oct
			*	*	*	*	*	
					*	*	*	

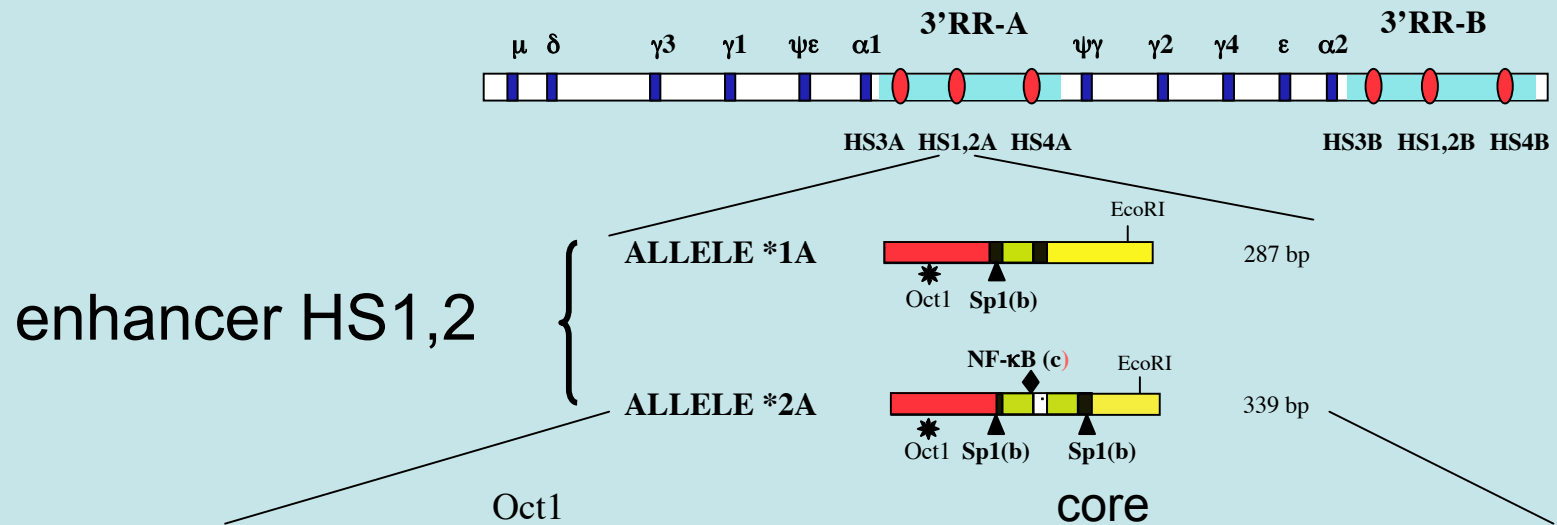
EMSA electrophoresis mobility shift assay with allele *1 and *2

DNA binding experiment with nuclear proteic extracts

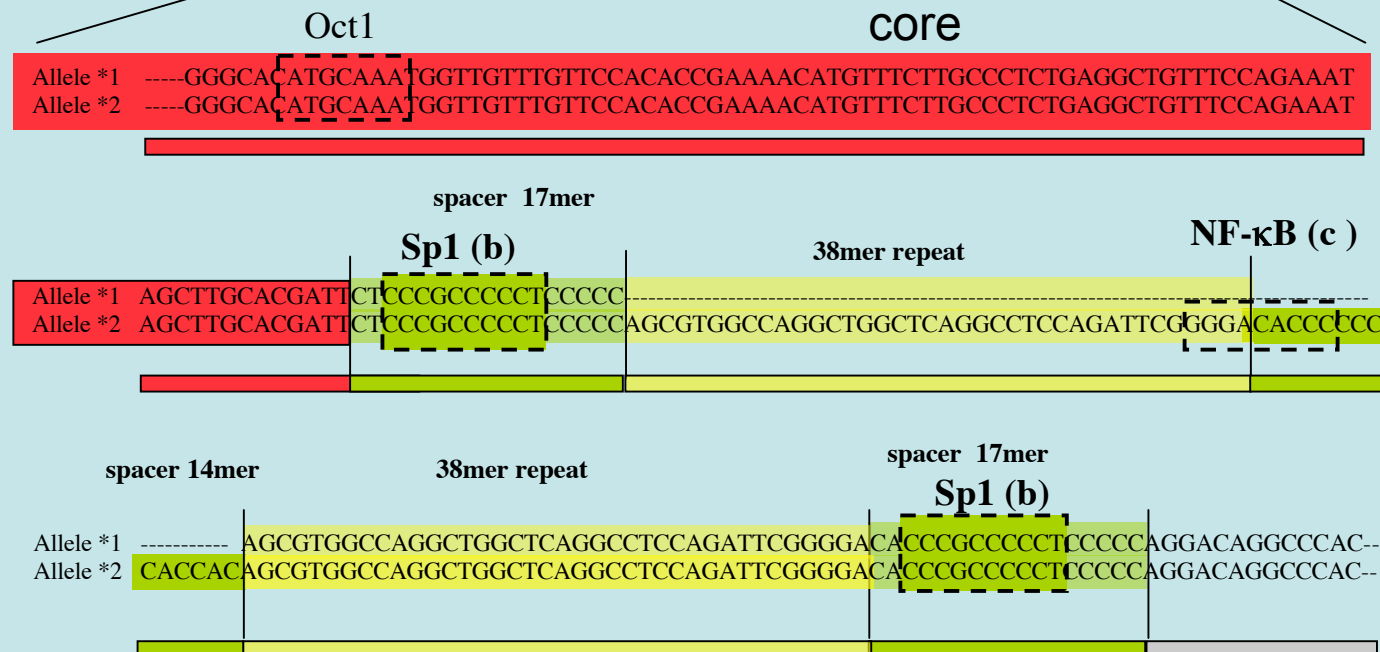


Consensus for Sp1 and NF-κB in HS1,2-A allele*1 and *2

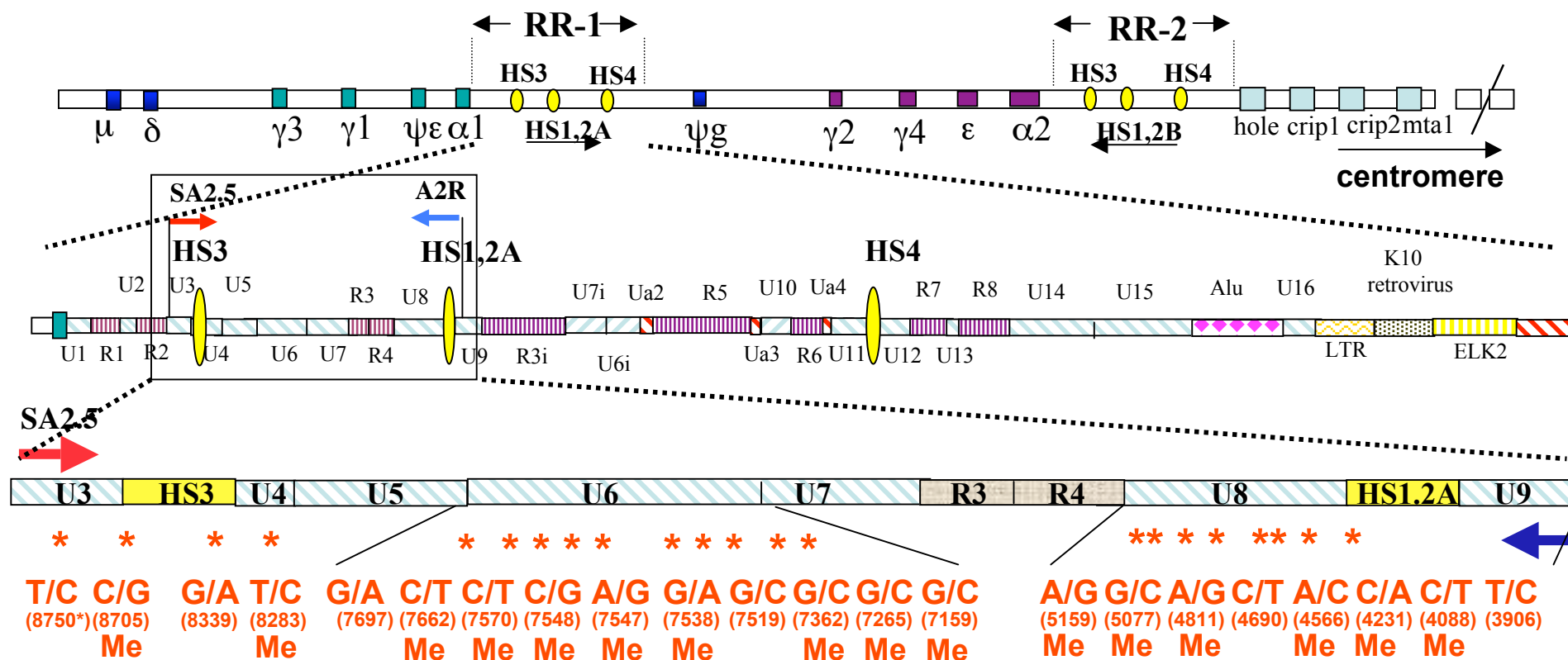
A



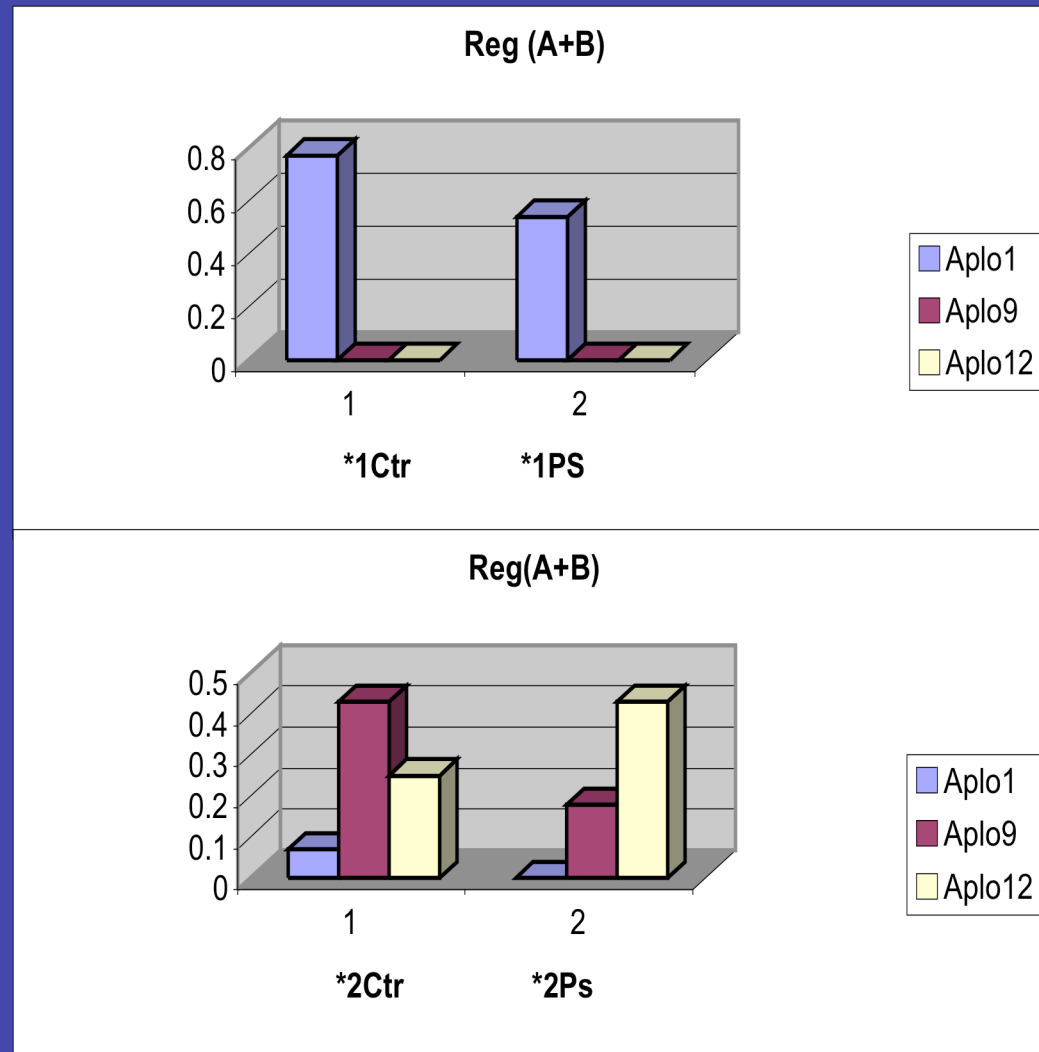
B



SNPs haplotype map



le frequenze degli aplotipi



le frequenze degli aplotipi più frequenti

per l'allele *1 sono uguali nel contrl. e nella Psoriasi
 $\chi^2 P = 0.65$

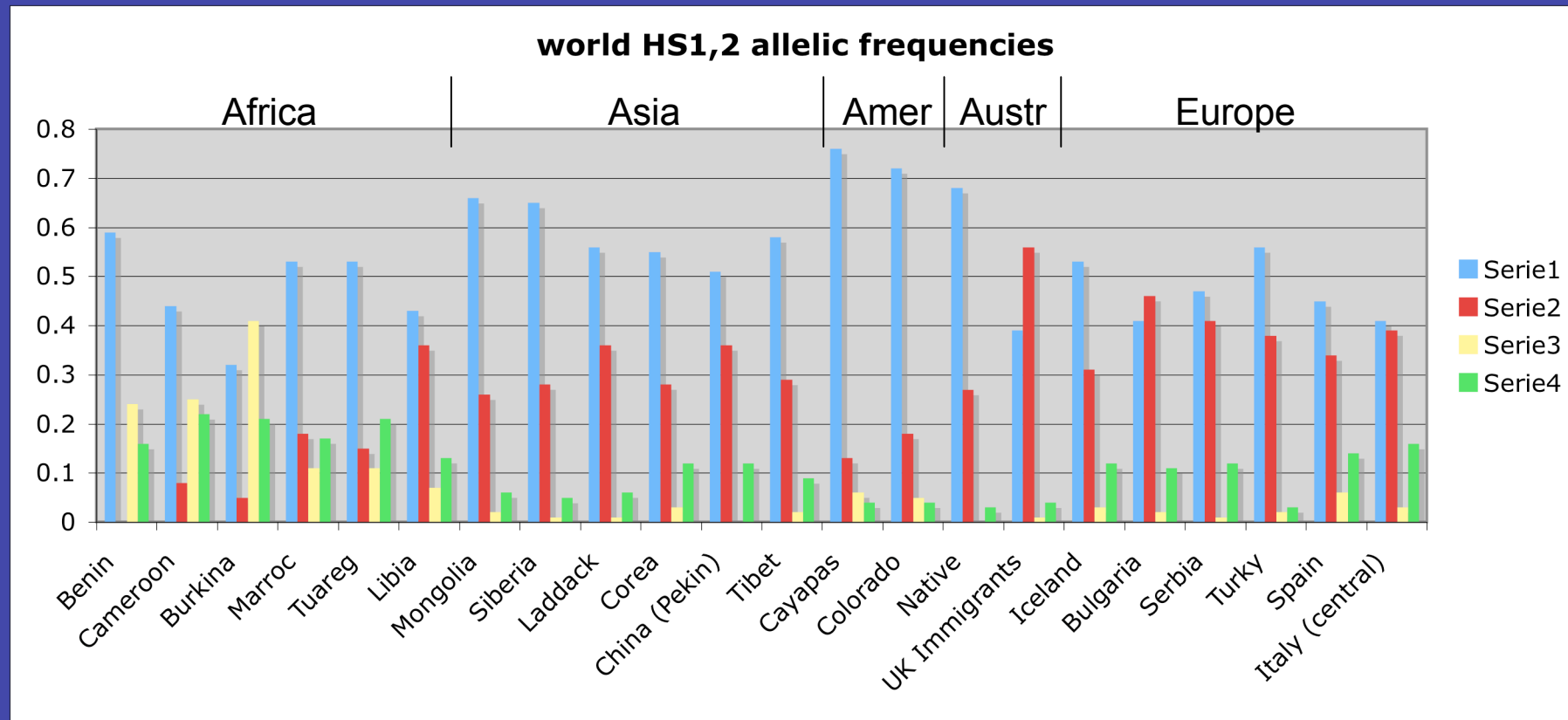
per l'allele *2 sono diverse nei contrl e nella psoriasi
 $\chi^2 P = 0.028$
campione piccolo n.30



TOR VERGATA

frequenze alleliche ed epidemiologia

un regolatore delle Ig polimorfo che frequenze ha nelle popolazioni



frequenze in 11 località italiane

CITTA'	N° CAMPIONE	fr. ALLELE 1	fr. ALLELE 2	fr. ALLELE 3	fr. ALLELE 4
Udine	100	0,340 ± 0,033	0,580 ± 0,035	0,035 ± 0,013	0,045 ± 0,015
Padova	94	0,314 ± 0,034	0,425 ± 0,036	0,085 ± 0,020	0,176 ± 0,028
Brescia	71	0,338 ± 0,040	0,535 ± 0,042	0,014 ± 0,010	0,113 ± 0,027
valle d'Aosta	116	0,397 ± 0,032	0,495 ± 0,033	0,065 ± 0,016	0,043 ± 0,013
Massa Carrara	59	0,356 ± 0,044	0,474 ± 0,046	0,051 ± 0,020	0,119 ± 0,030
Perugia	62	0,298 ± 0,041	0,572 ± 0,044	0,016 ± 0,011	0,113 ± 0,028
Roma	133	0,410 ± 0,030	0,399 ± 0,030	0,026 ± 0,009	0,165 ± 0,023
Bari	114	0,399 ± 0,032	0,517 ± 0,033	0,009 ± 0,006	0,075 ± 0,017
Cosenza	108	0,343 ± 0,032	0,528 ± 0,034	0,055 ± 0,015	0,074 ± 0,018
Sicilia	100	0,500 ± 0,035	0,365 ± 0,034	0,070 ± 0,018	0,065 ± 0,017
Oristano	60	0,267 ± 0,040	0,591 ± 0,045	0,017 ± 0,012	0,125 ± 0,030
Tot Sardi	116	0,284 ± 0,030	0,595 ± 0,032	0,009 ± 0,006	0,112 ± 0,021

I livelli delle Ig nel plasma

Table II. Number and % of subjects with normal or altered values of Ig. General population compared to the Schizophrenic patients (*two tails X²)						
	Normal	Ig +	Ig -	Ig+/Ig-	Tot altered	Subjects
General population (%)	41 (30.8)	44 (33.1)	41 (30.8)	7 (5.3)	92 (68)	133
Schizophrenic (%)	17 (19.3)	30 (34.1)	25 (28.4)	16 (18.2)	71 (80)	88
<i>p</i> *	0.187	0.978	0.889	0.012	0.528	

(%)

Note - Ig+ or Ig- refer to Ig plasma levels increase or decrease above/below the standard values

alterazione delle Ig

Table III. HS1,2-A allelic frequencies in general population and schizofrenia						
		Allele*				N
		*1	*2	*3	*4	
General population	Normal	0.512±0,055	0.268±0,049	0.049±0,024	0.171±0,041	41
	Ig+	0.295±0,048	0.546±0,053	0.023±0,016	0.136±0,036	44
	Ig-	0.463±0,055	0.342±0,052	0.012±0,012	0.183±0,043	41
	Tot	0.410±0,030	0.399±0,030	0.026±0,009	0.165±0,023	133
Schizophrenia	Normal	0.382±0.083	0.560±0.085	0.029±0.029	0.029±0.029	17
	Ig+	0.333±0,061	0.450±0,064	0	0.217±0,053	30
	Ig-	0.660±0,067	0.300±0,065	0	0.040±0,028	25
	Tot	0.437±0,037	0.443±0,037	0.006±0.006	0.114±0,024	88

alterazione e frequenze alleliche

Table IV. Statistical testing of the variation of allele *1/*2 frequencies among Ig+ and Ig- subjects

	Groups						95% C.I.	O.R.**
	Ig+		Ig-		χ^2 *	<i>p</i>		
	*1	*2	*1	*2				
General population	26	48	38	28	6.204	.013	1.27-4.96	2.50
Schizophrenia	20	27	33	15	5.588	.018	1.28-6.89	2.97
General population + Schizophrenia	46	75	71	43	12.870	.0003	1.59-4.56	2.69

difetto di IgA

TABLE I. HS1.2 allelic frequencies of the IGAD patients and control population.

A	Genotypes	Controls			IgA defect			P value
		Observed	%	Expected	Observed	%	Expected	
	1/1	15	14.85	12	34	38.64	22.5	0.0004
	2/2	25	24.75	26	24	27.27	14.7	NS
	3/3	-	-	-	-	-	0.02	NS
	4/4	-	-	2	-	-	0.4	NS
	1/2	33	32.67	35	15	17.05	36	0.0218
	1/3	1	0.99	0.7	2	2.27	1.5	NS
	1/4	6	5.94	9	4	4.54	6	NS
	2/3	-	-	1	1	1.14	1.2	NS
	2/4	20	19.80	14	8	9.09	4.8	NS
	3/4	1	0.99	0.3	-	-	-	NS

B	Alleles	Frequencies	Observed	Frequencies	Observed	χ^2 TEST
	*1	0.346 ± 0.033	70	0.506 ± 0.037	89	$\chi^2 = 18.541$
	*2	0.509 ± 0.035	103	0.409 ± 0.037	72	d.f. 4
	*3	0.009 ± 0.006	2	0.017 ± 0.009	3	Pvalue = 0.001
	*4	0.133 ± 0.023	27	0.068 ± 0.018	12	

livelli di Ig nel difetto di IgA

TABLE II. HS1.2 frequencies in IGAD patients of the 30th percentile with low or high values of IgM and IgG in the serum.

A	Genotypes	IgM IGAD						IgG IGAD					
		Low values (30%)			High values (30%)			Low values (30%)			High values (30%)		
		Obs	%	Exp	Obs	%	Exp	Obs	%	Exp	Obs	%	Exp
	1/1	27	45.8	18.4	7	25	4	13	45	7.7	12	41.3	9.3
	2/2	15	25.5	7.8	9	32.1	7	8	27.6	4.5	7	24.1	4.2
	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	8	13.6	24	7	25	10.6	3	10.3	12	7	24.1	12.5
	1/3	2	3.5	1.7	-	-	-	-	-	-	1	3.5	0.6
	1/4	2	3.5	3.3	1	3.6	1.5	1	3.4	2	1	3.5	1.2
	2/3	1	1.8	1	-	-	-	1	3.4	0.4	-	-	-
	2/4	4	7	2	4	14.3	2	3	10.3	1.5	1	3.5	0.7
	3/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B	Alleles	Frequencies		Obs	Frequencies		Obs	Frequencies		Obs	Frequencies		Obs
	*1	0.559 ± 0.045		66	0.379 ± 0.063		22	0.517 ± 0.065		30	0.568 ± 0.065		33
	*2	0.364 ± 0.044		43	0.500 ± 0.065		29	0.396 ± 0.064		23	0.379 ± 0.063		22
	*3	0.025 ± 0.014		3	0.001 ± 0.001		0	0.017 ± 0.016		1	0.017 ± 0.016		1
	*4	0.050 ± 0.020		6	0.068 ± 0.033		4	0.068 ± 0.033		4	0.034 ± 0.023		2

IgM: $\chi^2 = 4.257$; Pvalue (two sided) = 0.0391; OR (95% CI) = 2.023 (1.031-3.971)

IgG: χ^2 test is not significative

come stanno i CD19

TABLE III. HS1.2 frequencies in IgAD patients with low or high levels of CD19⁺ cells, normal range 15-25%

B	CD19+			
	low values (<15%)	observed	high values (>25%)	observed
alleles				
*1	0,527 ± 0,081	20	0,200 ± 0,089	4
*2	0,395 ± 0,079	15	0,650 ± 0,106	13
*4	-	0	0,050 ± 0,009	1
*4	0,078 ± 0,014	3	0,100 ± 0,046	2
tot		38		20

$$\chi^2 = 7,090; \quad P \text{ value} = 0,0289; \quad OR = 3,604$$

troppo pochi

se il polimorfismo condiziona

nella macchina interattiva del linfocita B quale può essere il ruolo del polimorfismo di HS1,2

per ora sappiamo che interagisce in modo diverso con i complessi di SP1 ed NF-kB

nella risposta immunitaria e nelle patologie immunologiche svolge un ruolo che condiziona le normali funzioni

ma ci possono essere altri polimorfismi associati

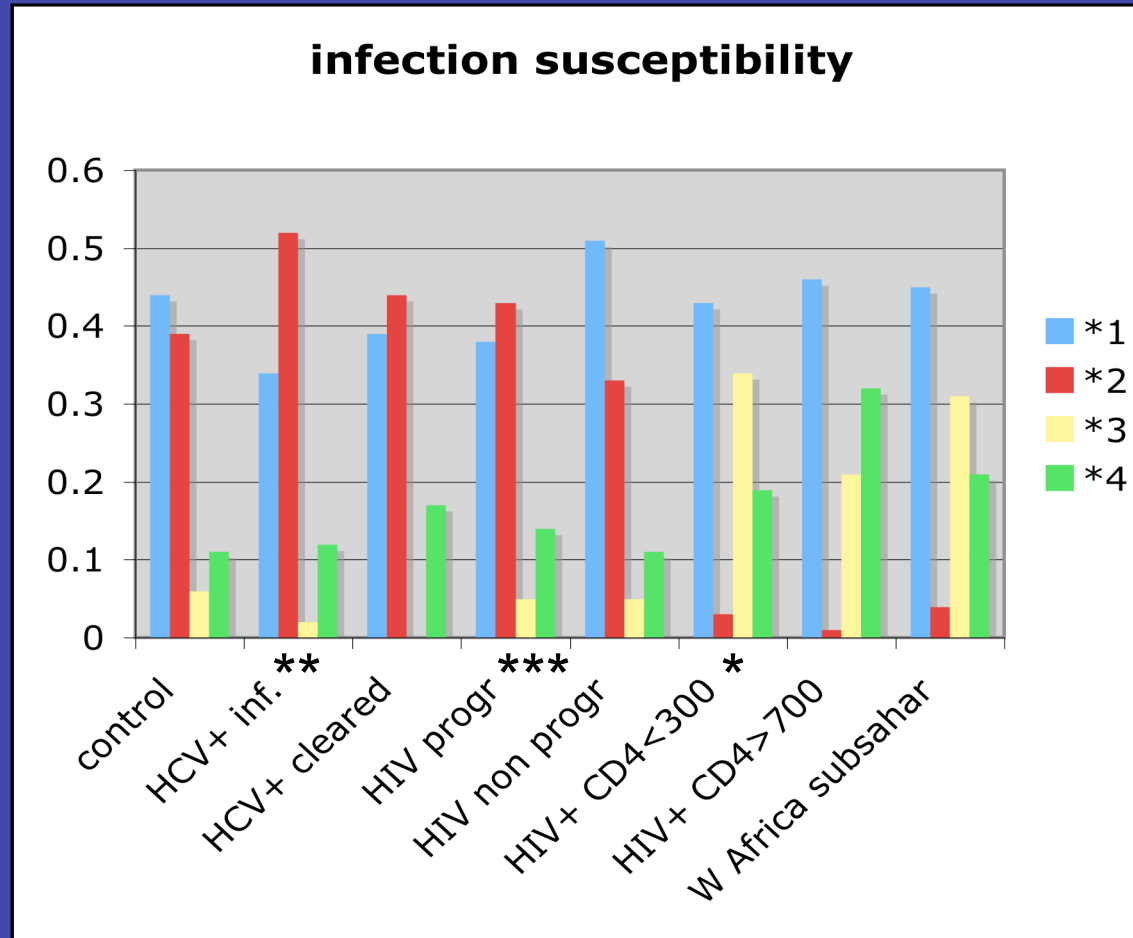
la 3'RR sta ad un incrocio della regolazione non più soltanto del linfocita B

CLL chronic B-lymphocytic leukemia

Allele frequency	Controls N=248	Chronic Lymphocytic Leukemia <i>N=101</i>	P
Allele*1	0.440	0.277	<0.001
Allele*2	0.395	0.549	<0.001
Allele*3	0.061	0.035	<i>0.17</i>
Allele*4	0.105	0.139	<i>0.20</i>

	Controls N=248	Chronic Lymphocytic Leukemia <i>N=101</i>	<i>P</i>
HS1,2A, n(%)			
1/1	52 (21.0)	5 (5.0)	<0.001
2/2	37 (14.9)	24 (23.8)	0.05
3/3	2 (0.8)	1 (1.0)	<i>1.00</i>
4/4	4 (1.6)	1 (1.0)	<i>1.00</i>
1/2	84 (33.9)	40 (39.6)	<i>0.31</i>
1/3	12 (4.8)	2 (2.0)	<i>0.37</i>
1/4	18 (7.3)	4 (4.0)	<i>0.33</i>
2/3	13 (5.2)	2 (2.0)	<i>0.25</i>
2/4	25 (10.1)	21 (20.8)	0.01
3/4	1 (0.8)	1 (1.0)	<i>1.00</i>

nella risposta immune



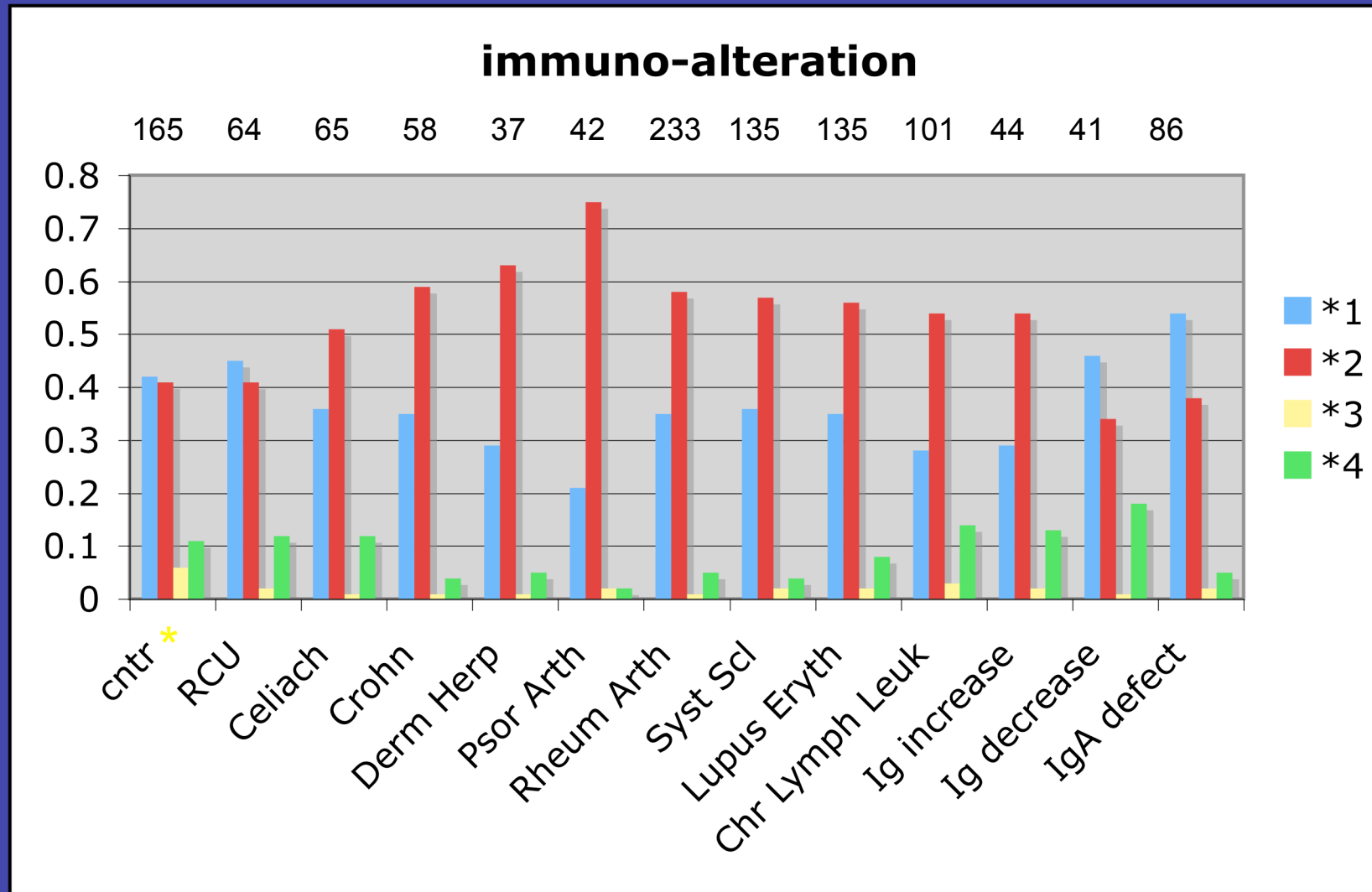
esiste una diversa
risposta a seconda
delle freq. alleliche

* Swaziland

** Roma

*** Bengasi

cosa succede nelle patologie ?



come cambiano le frequenze alleliche di HS1,2 (* Roma)

SNPs haplotype map

