

Lezione 9-10 10 Novembre 2009

corso di genomica
a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

corso di laurea specialistica
magistrale Biotecnologia

lezione 11 Dicembre sequenziamento shot-gun metodo
pyrofosfato 454 e 480 Roche. Dr.Rodriguez

lezione 15 Dicembre Programmi informatici per confronti
genomici. Dr.P. Daddabbo

la prospettiva nel restante 95% del
genoma

genoma si ricomincia da capo

nell'interattoma va inserito il genoma e si
allargano le prospettive

nuove tecniche, metodi, strumenti

P.Fraser & W.Bickmore

Nature vol.447, 24 May 2007; 413-417

Nuclear organization of the genome and the potential for gene
regulation

cercare le altre strutture

cis regulatory elements for local control

biochemistry of transcript. factors & DNA

chromatine - histone modifying complex

many
structural
studies

few studies

?

localization within three-dimensional
space in the nucleus

studi dell'organizzazione del genoma

classic methods { FISH fluorescence in situ hybridization
3C chromosome conformation capture

Fish probes hybridization on nuclei fixed on glass slides, visualized by fluorescence microscopy

3C chromatine fragment fixation, restr.enz. digested, ligation, PCR amplification, only known seq.

fixation



localizzazioni non casuali

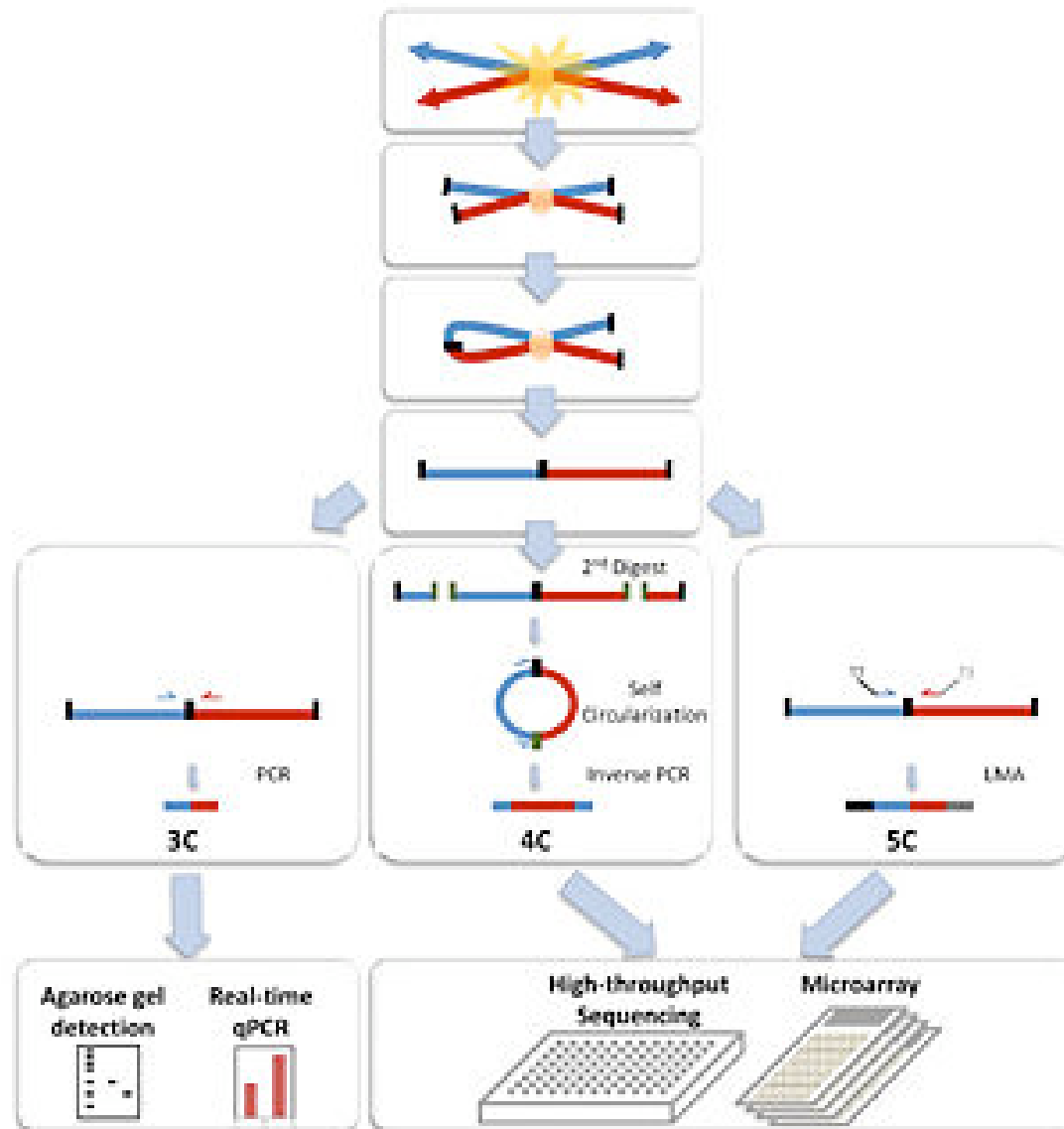
step 1 Cross-link DNA

step 2 Restriction Digest

step 3 Intramolecular Ligation

step 4 Reverse Cross-link

step 5 Method Specific Processing



metodologia

- 1) fissazione regioni con formaldeide “cross-linked” tra DNA e proteine; legami cis trans tra promotori ed enhancers
- 2) digestione con enz. di restrizione che separa i frammenti cross-linked da quelli liberi (scelta della lunghezza del frgm.)
- 3) ligasi intramolecolare a basse concentrazioni di DNA tra frammenti cross-linked
(evitare frammenti random meno abbondanti)
legami spuri per digestione incompleta 20-30%,
legami delle estremità dello stesso frammento 20-30%
- 4) liberazione del cross-link proteico, resta il frgm. ligato
1 sito di restriz. al centro e due liberi agli estremi = library 3C
- 5) PCR con primers esterni al sito di ligasi (quantificazione)

invenzione della 4C

combined large scale sequencing

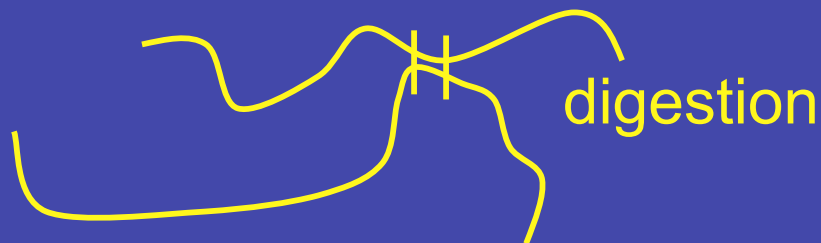
hybridization to microarrays

} captured fragments

unbiased search of interaction in cis & trans

genome spatial organization → key contribution to its function

fixation



purification → hybridization micro-arrays or sequencing

esistenza dei territori cromosomici

i cromosomi stanno nel volume nucleare in posizioni preferenziali rispetto al centro o periferia del nucleo

alcuni geni per funzionare devono cambiare posizione ed uscire dalla posizione nel nucleo e dal territorio regolare ?

analisi di interazioni a largo raggio :

multi-mega-base cis e trans

interazioni geniche con le “transcription factories”

esistenza delle interazioni tra territori genici

analisi di questa organizzazione per spiegare la regolazione
genica a partire dall'epigenomica

quali evidenze suggeriscono le interazioni tra territori
genomici?

ricorrenza di traslocazioni specifiche non casuali

interpretazione:

collocazioni specifiche preferenziali

chromosome territories

la corsa all'oro del west



new and old territories



the golden rush



modern golden rush



modern tools



la tecnologia
avanza
a volte lascia tracce

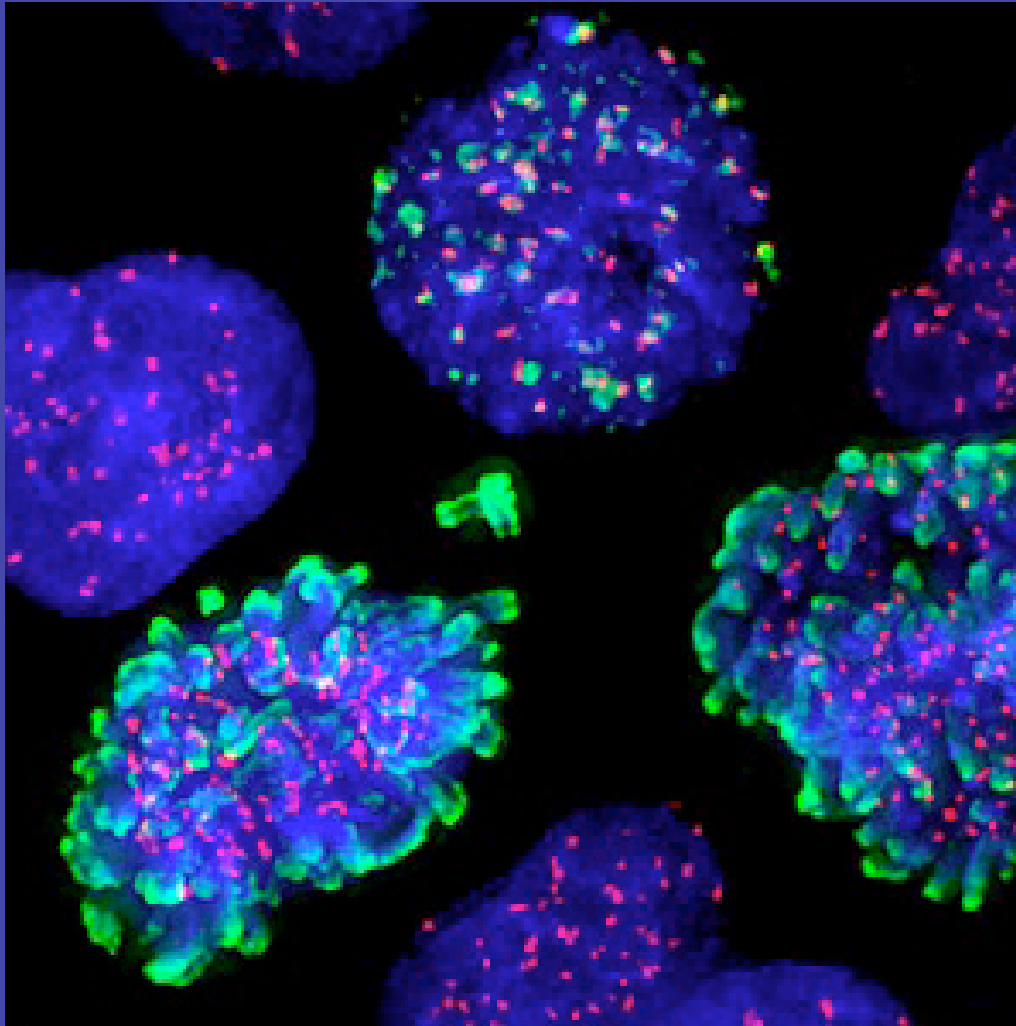


le novità del 3C - 4C

si possono studiare attività cis e trans



tridimensionale



novità nella FISH

microscopi a
scansione

le tecniche

dal 3C a nuove possibilità

la strategia 4C = 3C con 1 passaggio in più al n.5

2) si preferisce restrict. enz. a 6bp

5a) seconda digestione con enz. a 4bp

5b) ligasi su se stesso per circularizzare il frgm. favorita
per assenza di link a proteine, il pool = library 4C

5c) PCR inversa su DNA circolari e quantificazione,
primers scelti sulla sequenza esca “bait” che
amplificano la regione sconosciuta

- sequenziamento della library
- ibridazione su microarrays con regioni
genomiche limitrofe ai siti di restrizione usati al 2)

cerchiamo delle estremità ad un frammento di PCR intersperso all'interno di una sequenza ignota:

- se ho trovato da Southern un frammento di DNA a sequenza ignota,
- una inserzione di un frammento noto in un genoma,
- un vettore che si è integrato in una regione ignota,
- un virus integrato non sito specifico,
- una ricerca "gene trapping",
- la ricerca delle estremità genomiche di un gene noto solo come cDNA

analisi Southern del frgm

deve essere scelto il frammento da amplificare

sequenza genomica o di Bac o da cui si vuole recuperare la sequenza nota inserita o integrata



digestione con enzimi di restrizione

verde : no buono

bleu : no buono

giallo: no buono

viola: troppo lungo

marrò: buono

rosso: buono

grigio + viola: buono

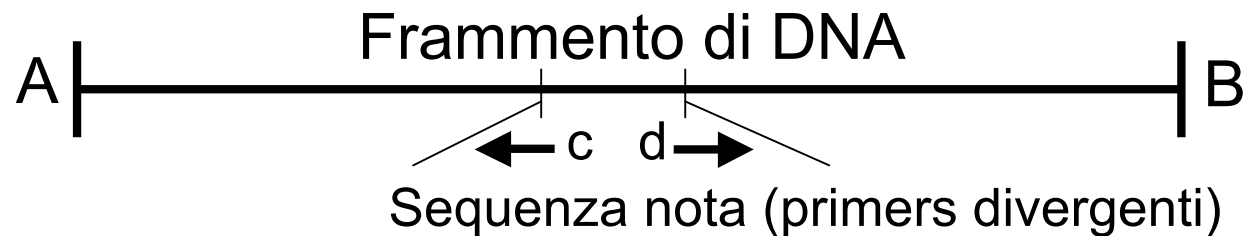
- tra due buoni si sceglie quello con estremità coesive per la ligasi più efficiente

- si evita l'enzima che taglia all'interno del frgm, si otterrebbe solo una estremità

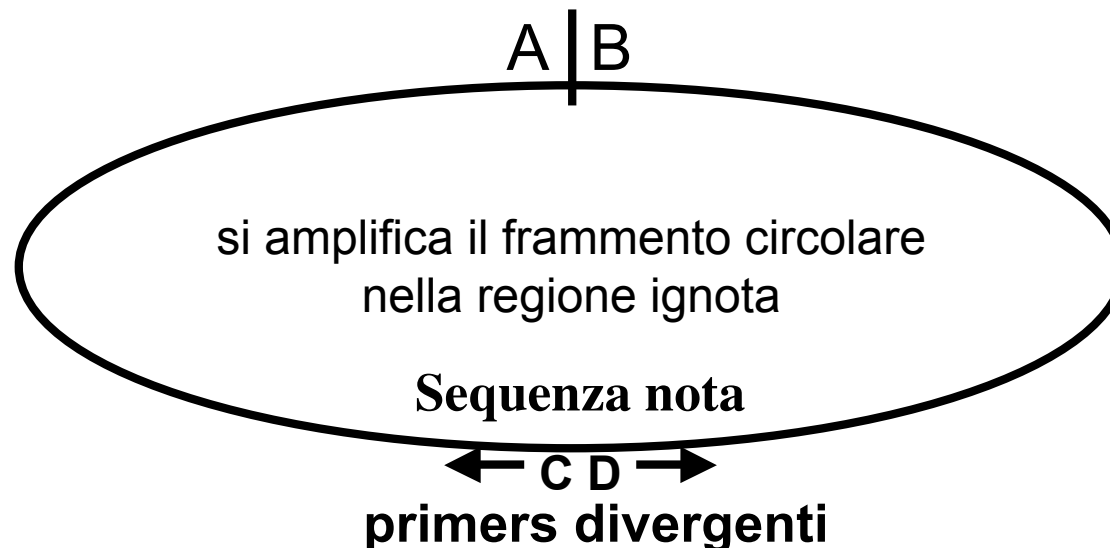
grigio + viola se dx troppo lungo, estremità compatibili

PCR inversa

Il nome deriva dal fatto che si usano primers disegnati su una sequenza con direzione divergente, direzione di sequenza dei primers apparentemente non convergente. Analisi Southern



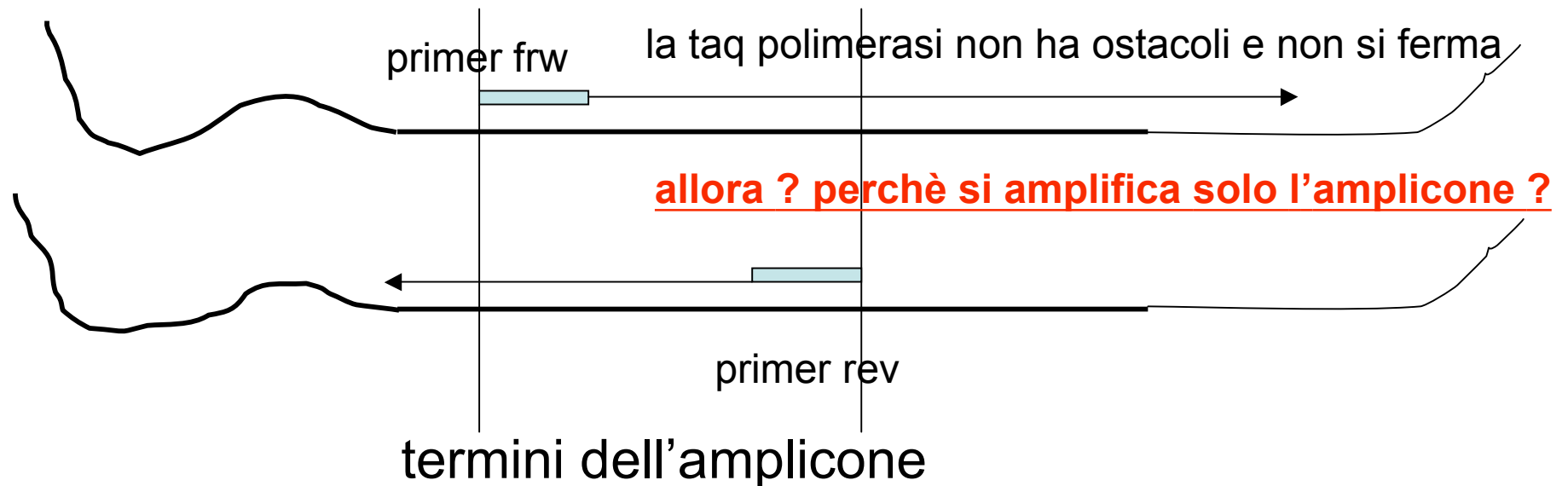
Ligasi per circularizzare il frammento



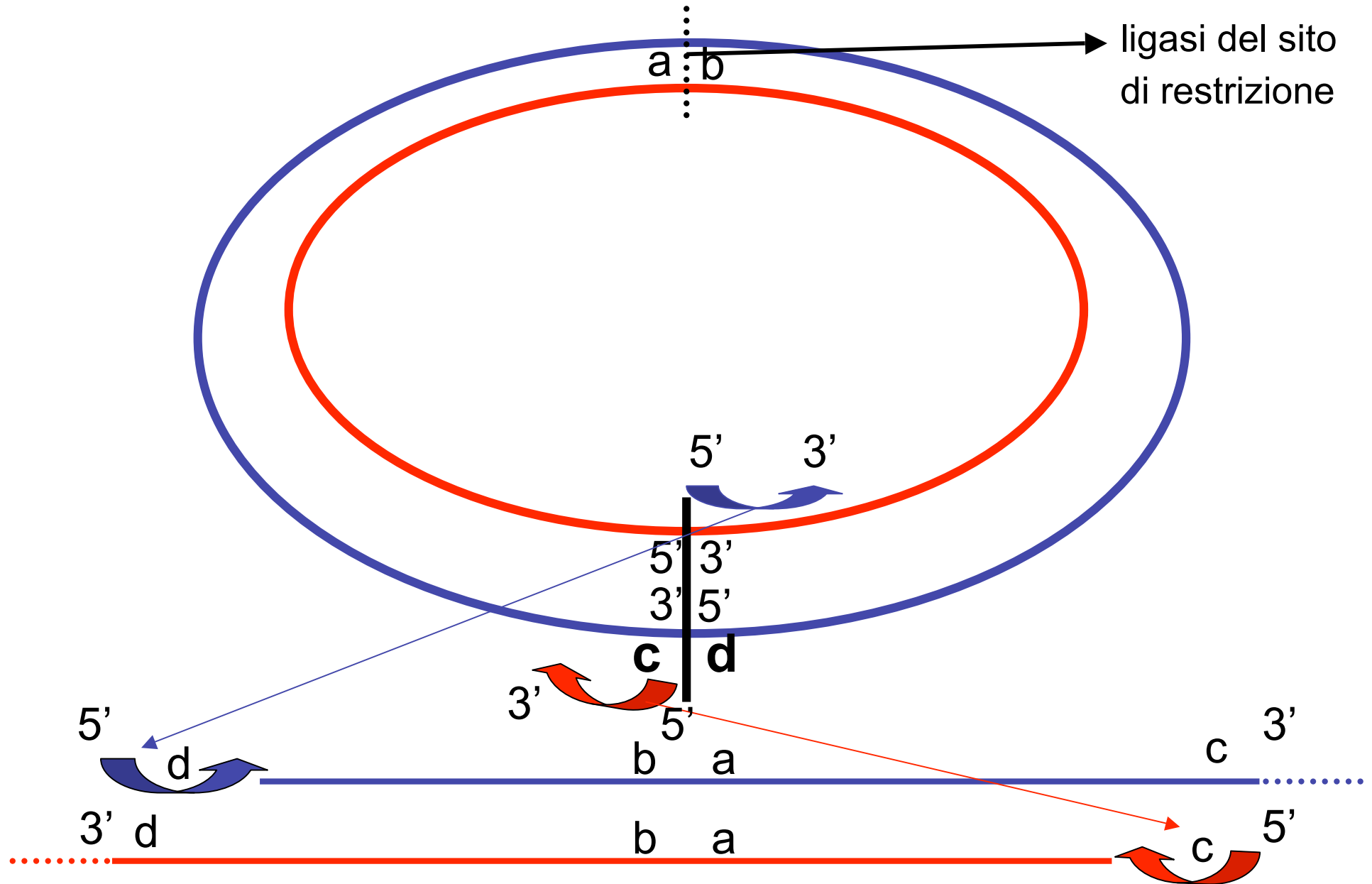
amplificazione di DNA genomico o clonato

al primo ciclo cosa si amplifica ?

la Taq polimerase si ferma sull'amplicone ?

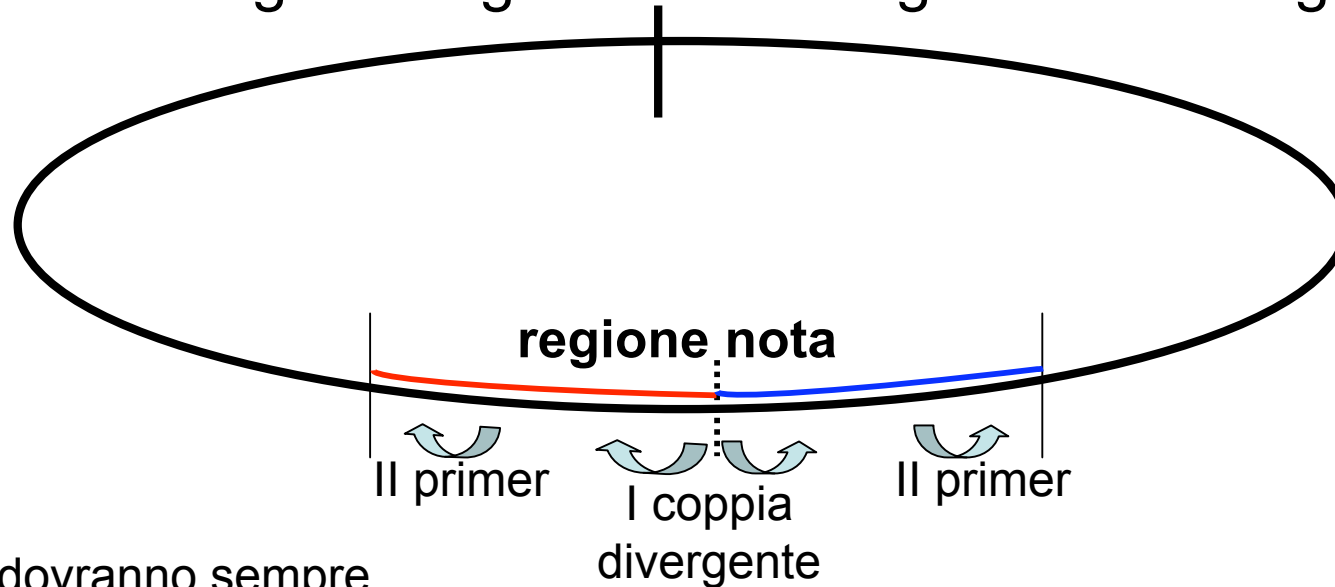


Orientamento primers PCR inversa



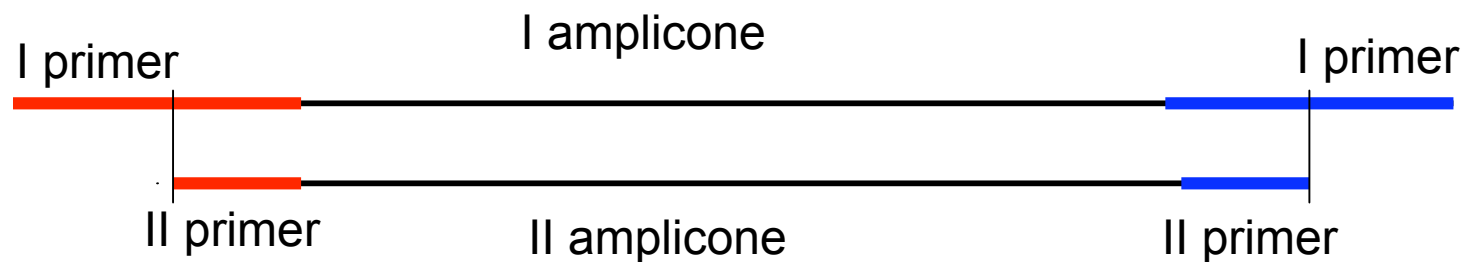
PCR nested per PCR inversa

estremità ignote digerite su DNA genomico e legate



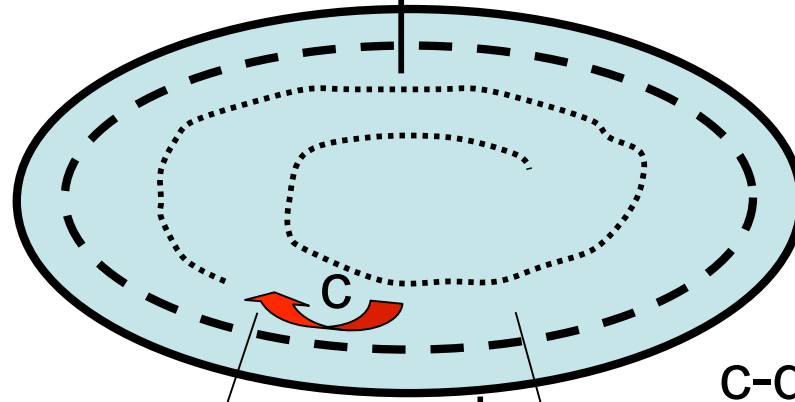
I primers dovranno sempre essere complementari ai due diversi filamenti

PCR nested quando si vuole ottenere maggiore specificità

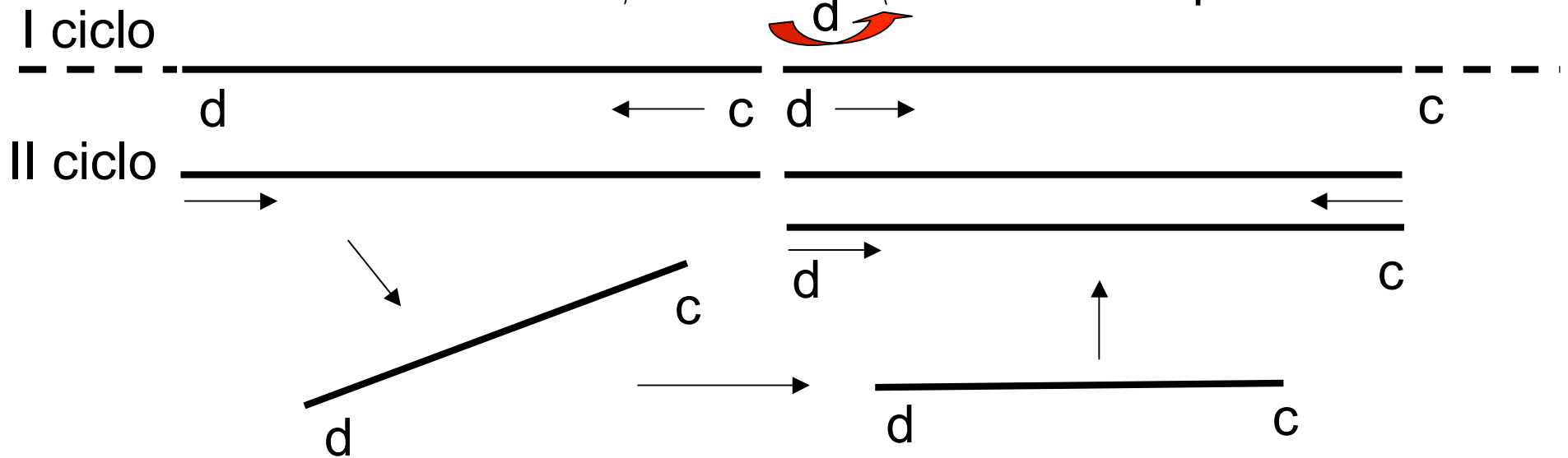


Primo ciclo frgm + lungo

frammento di restriz legato

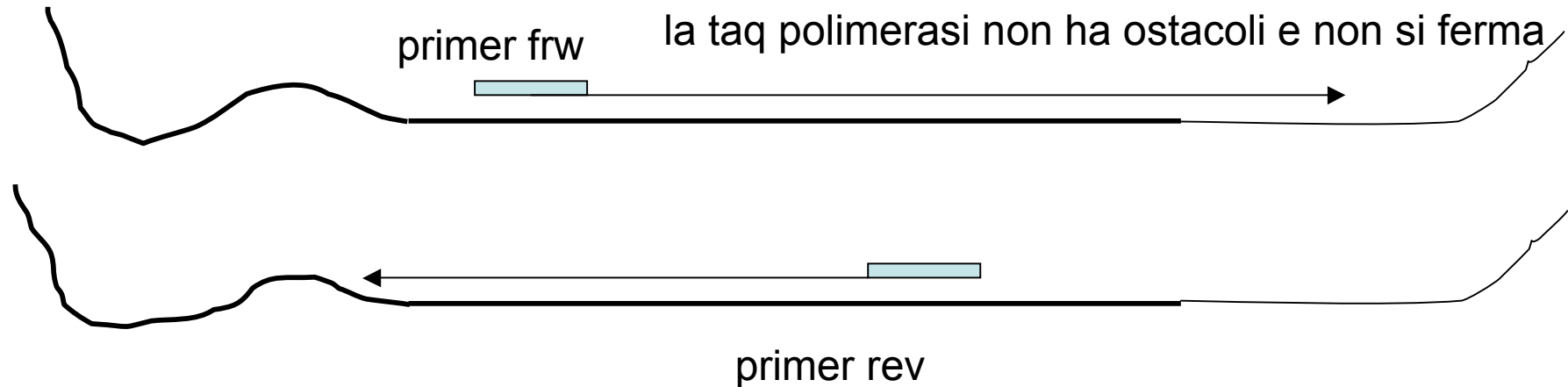


c-d sequenza nota

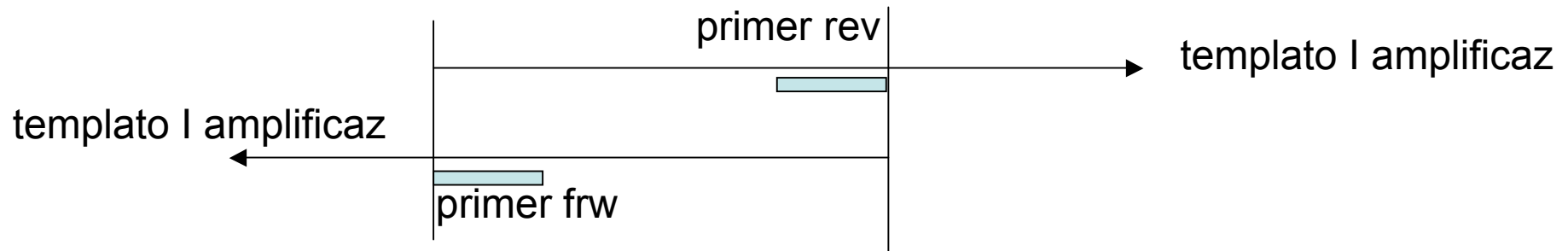


possibilità di concatenamento se la taq prosegue

si amplifica solo l'amplicone



dal II ciclo compare il frammento con le estremità corrispondenti al 5' dei due primers:



evoluzione del 3C

5C = Carbon-copy chromosome conformation capture

5) amplificazione con primers multipli dopo la ligasi con adattatori con seq. di primers universali T7 e T3 utilizzabili per sequenziamento e microarrays

(a causa di possibili interazioni spurie, si confermano solo le interazioni ad alta frequenza)

chromosome immunoprecipitation utile per interazioni distanti

5C non è utile per l'alto numero di primers su screenings di genoma intero.

4C si può fare su microarray senza conoscere il sito di interazione

da chi è diretto il movimento della cromatina

cercare di capire come si muove (attiva o passiva)

analisi in vivo con microscopia

i movimenti fuori dal territorio cromosomico controllati da actina-miosina in topi transgenici [Curr Biol. 2006 Apr 18;16(8):825-31.]

effetto “looping out” dal territorio cromosomico dipendente dal tipo cellulare: Hoxd di topo ha il “looping” sull’asse antero-posteriore ma non negli abbozzi degli arti,

effetto di ricollocamento nel territorio nucleare del crms X dopo inattivazione di Xist, ma i territori crms non sono barriere per la trascrizione da parte della pol. II