

Lezione XIII-XIV

martedì 8-XI-2011

corso di genomica

Laurea Magistrale Biotecnologia Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

libro consigliato Zanichelli “Introduz. Alla genomica” di
Arthur M.Lesk

D. Frezza

Evidenze acquisite

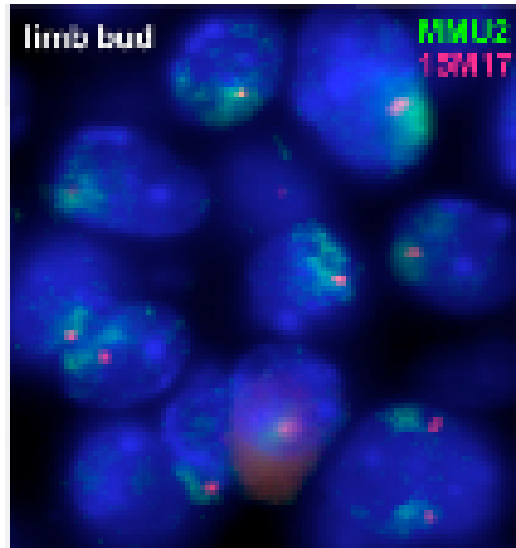
I esperimento: distanza relativa dei 3 markers (5'bac,Lnp,Hoxd) nei 3 tessuti (cntr., abbozzo coda, abbozzo arti) rispetto alla posizione del CT. Valori assegnati come percentuale dei segnali delle osservazioni fatte

PLOT delle distanze dei 3 markers nei 3 tessuti in cui si vede la media dei segnali rispetto all'interno, margine ed esterno del CT; nell'abbozzo della coda Hoxd e poi Lnp sono più esterni del 5'flank.

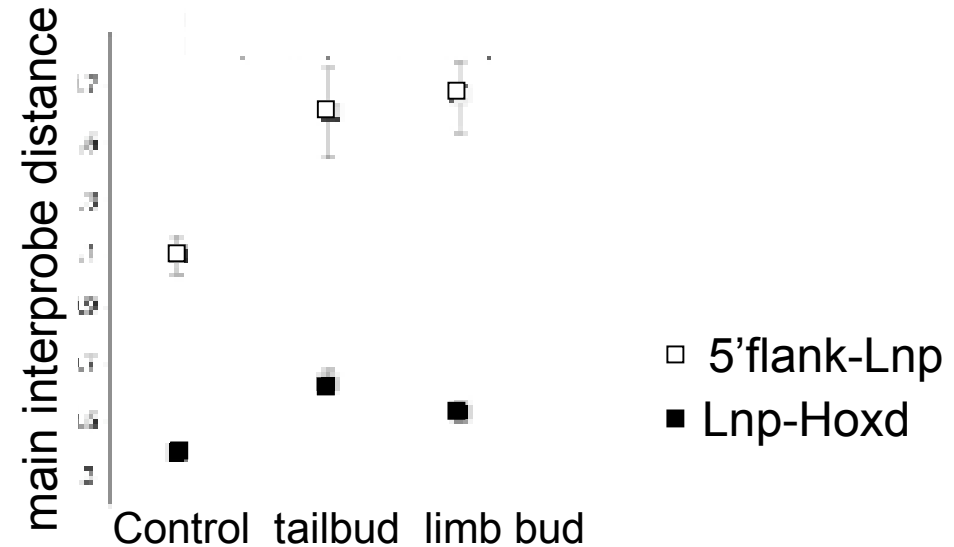
II esperimento: distanze relative tra due marcatori alla volta (Lnp-Hoxd e 5'flank-Lnp); la distanza dei segnali osservati tra Lnp-Hoxd è minore rispetto a 5'flank-Lnp soprattutto nell'abbozzo della coda e degli arti. La % delle osservazioni col posizionamento a breve distanza di L-H è molto maggiore di 5'-L nell'abbozzo di arto e di coda e rispetto a quella nel controllo.

Nuclear reorganization (fig.2)

C



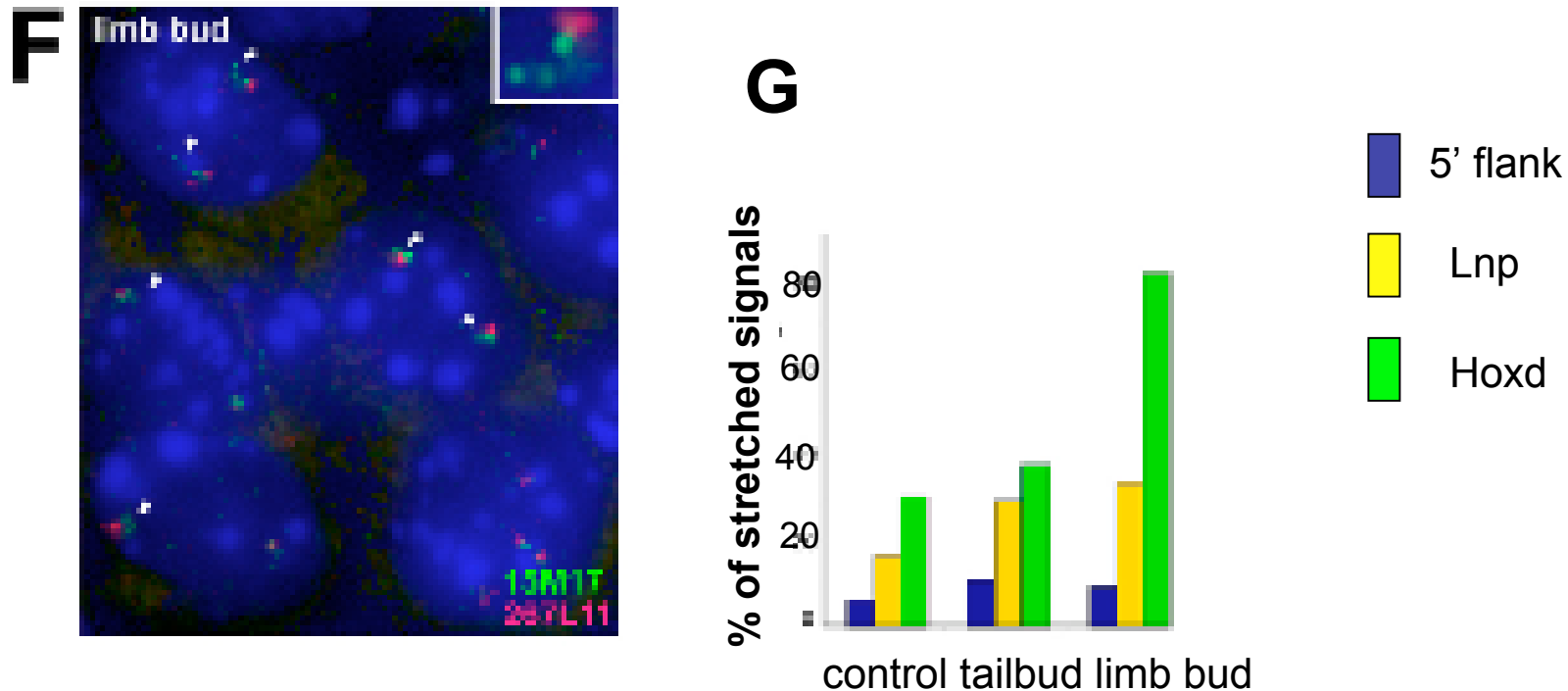
E



C) three dimensional DNA fish using the Hoxd probe (red) hybridised together with a MMU2 chromosome paint (green) on DAPI counterstained nuclei of a 4μm limb bud section from E9.5 embryos. Raw image before deconvolution.

E) means $\pm$ s.e.m. interphase separation μ m measured between Lnp and Hoxd BACs (black square), between 5'flank and Lnp BAC (white square)

Fig nuclear reorganisation



F Three dimensional DNA-FISH with Lnp (red) and Hoxd Bacs on Dapi counterstained nuclei of E9.5 limb bud.

G histogram showing the % of stretched 3D FISH signals detected with the Hoxd, Lnp and 5'flank BAC probes in control, tailbud and limb bud

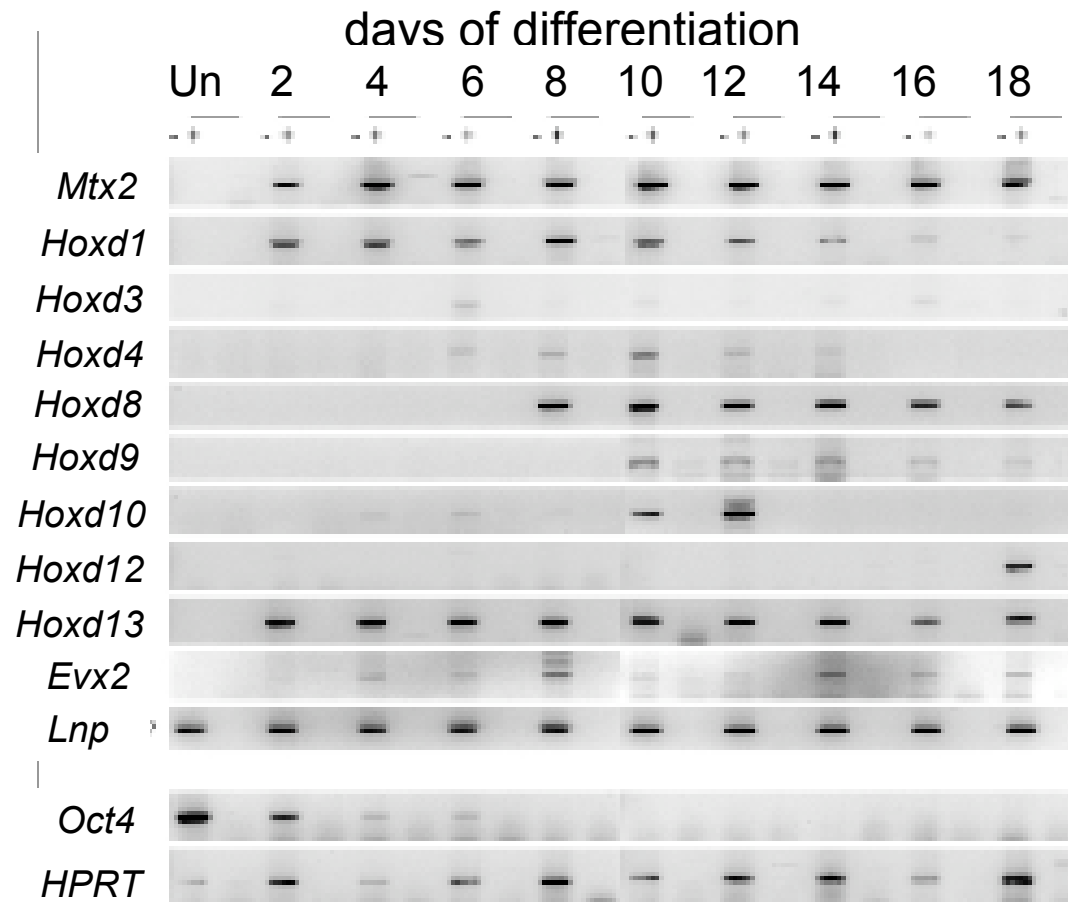
cambiamenti di espressione nel tempo

dopo l'analisi allo stadio E9.5 delle differenze di localizzazione dei crms 2 e dei loci del cluster Hoxd nei TC in embrioni di topo

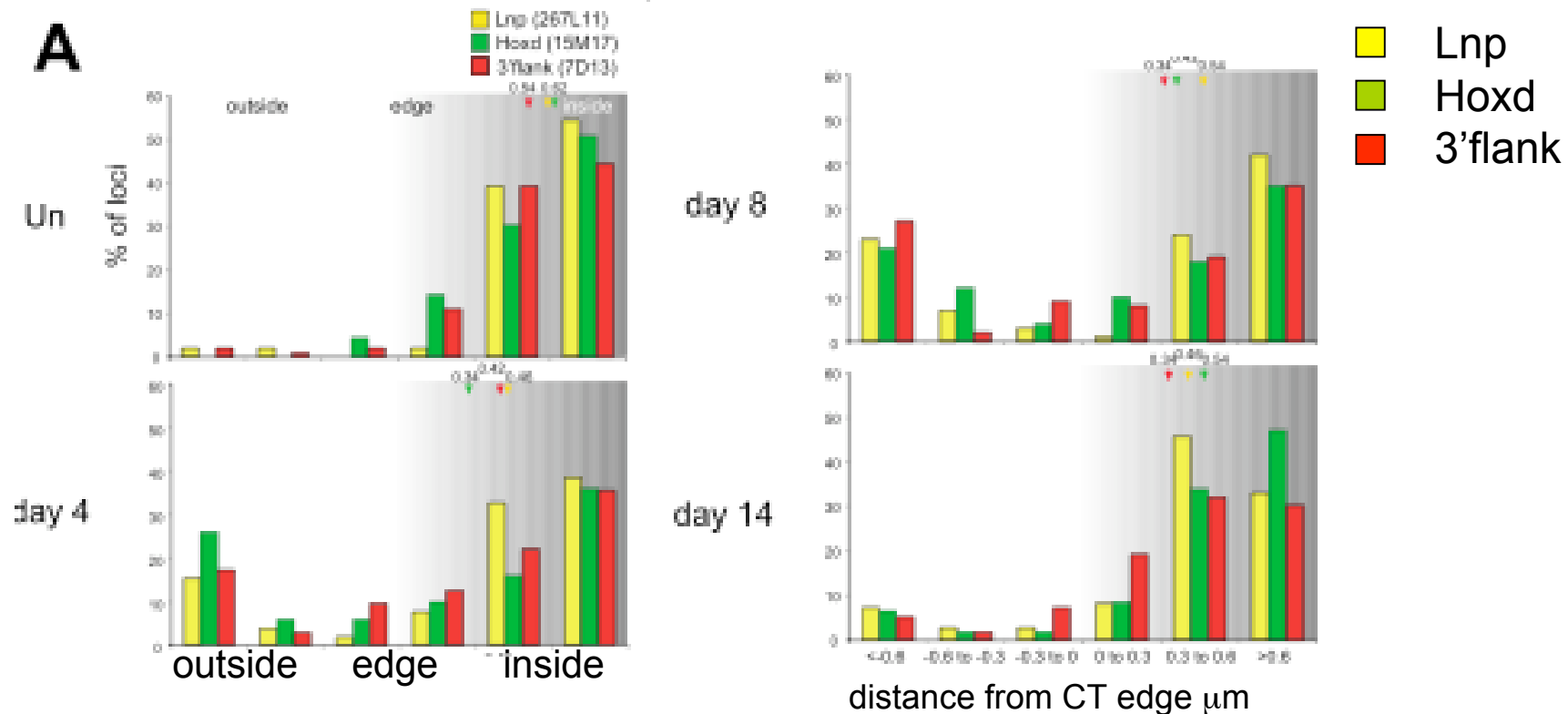
- analisi dell'espressione dei geni Hoxd con l'esperimento classico su cellule ES indotte *in vitro* con acido retinoico RA
- analisi della localizzazione dei loci del cluster a fasi diverse del differenziamento di ES indotte con RA

expression of Hoxd and flanking genes during ES cells differentiation

RT-PCR analysis of Hoxd and flank genes (*Mtx2*, *Evx2*, *LNP*) in undiff. OS25 ES cells in 18 days of differentiation with induced by RA. Loss of *Oct4* expression was used to monitor differentiation and HPRT serves as positive constitutively control with RT + or wo - RT



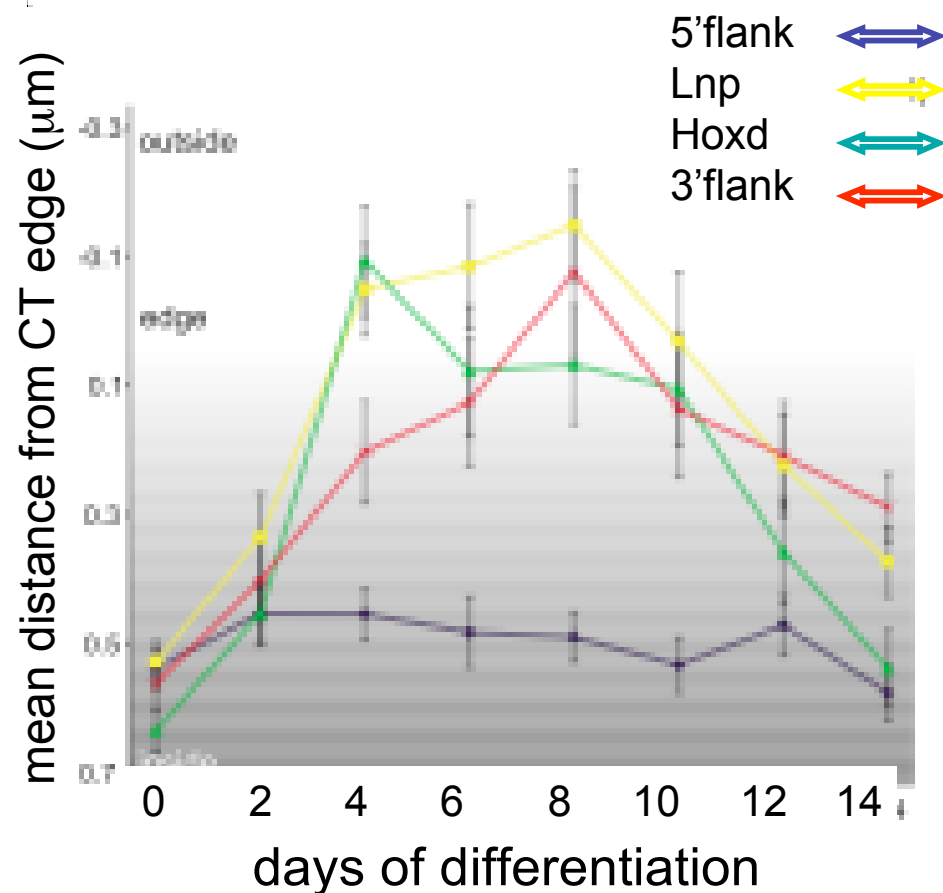
nuclear distribution and differentiation



distance relative to the MMU2 edge CT during differentiation

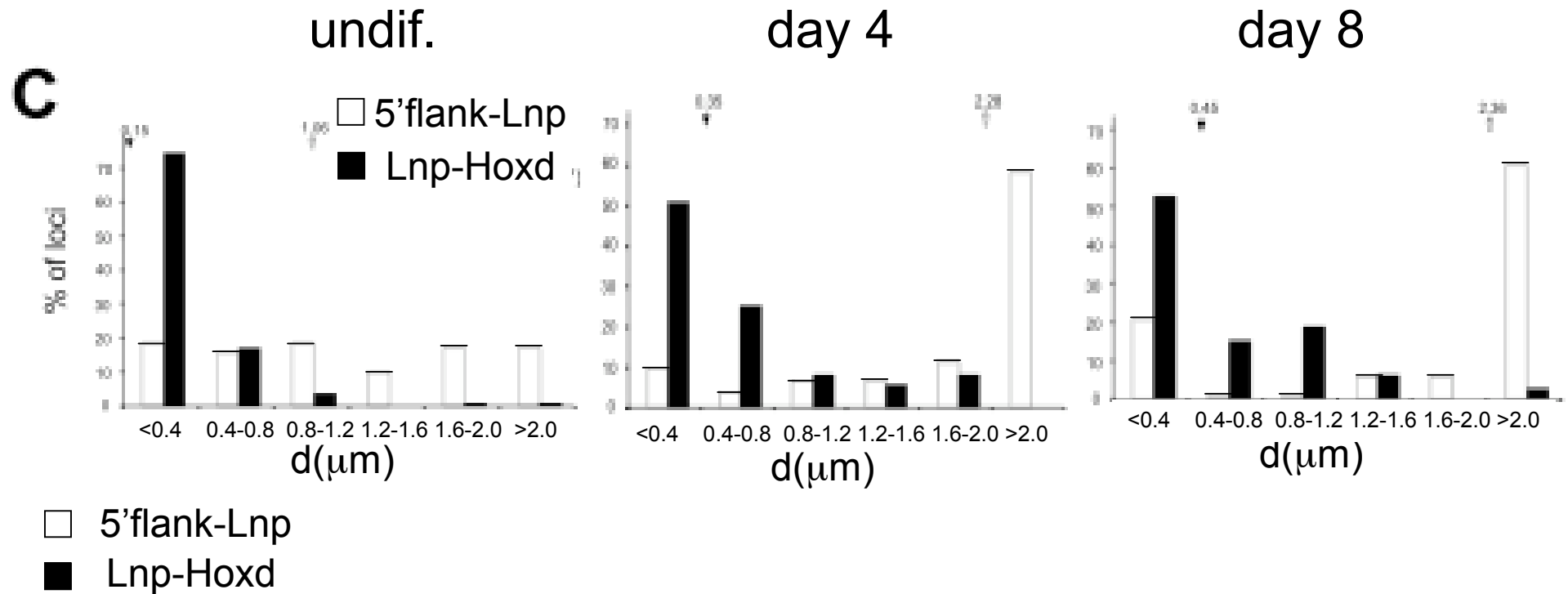
% dei loci asse y (ordinate); a distanze diverse dal crms2 "edge" asse x (ascisse)

grafico dei risultati del differenziamento



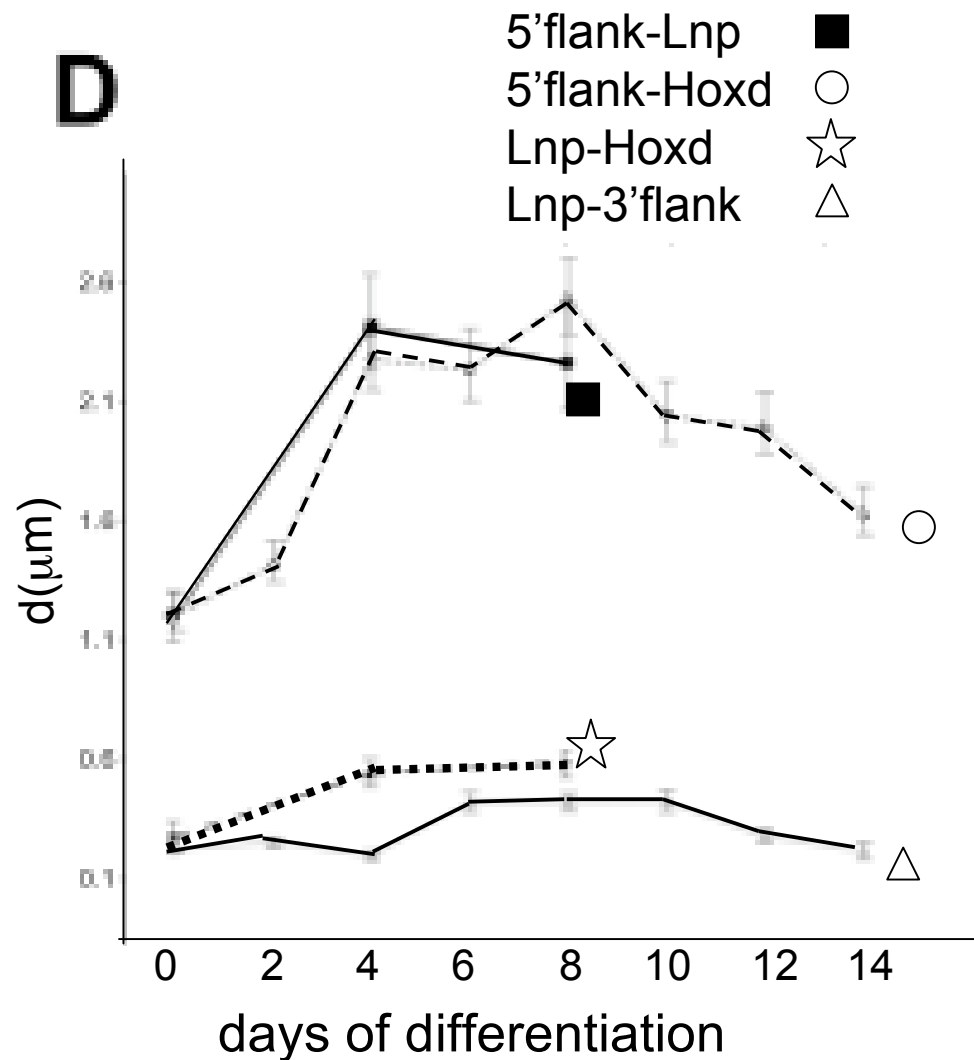
andamento degli spostamenti delle regioni cromosomiche nel nucleo durante il differenziamento

distribution during differentiation



% dei loci osservati in ordinate, in ascisse distanze dei loci;
misure delle distanze relative a tempi diversi, analisi della
vicinanza delle coppie di marcatori

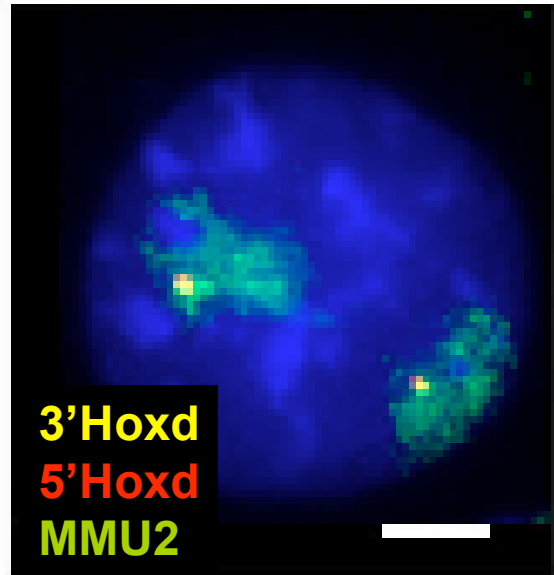
distanze relative nel differenziamento



Cellule ES embrionali
staminali di topo

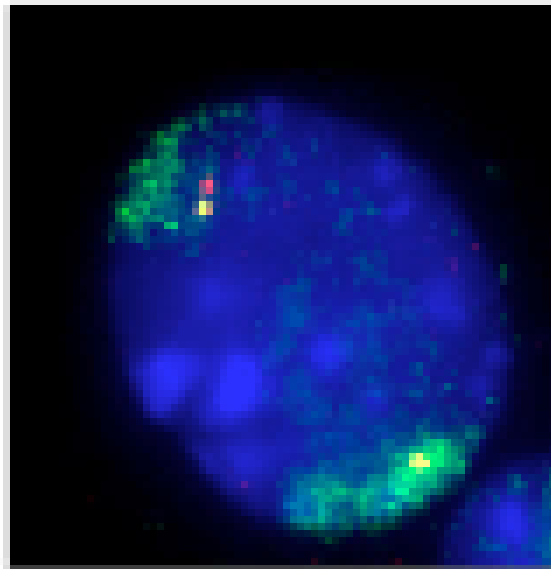
Analisi della distanza tra le
coppie di marcatori durante
il differenziamento

DAPI FISH a 4 colori

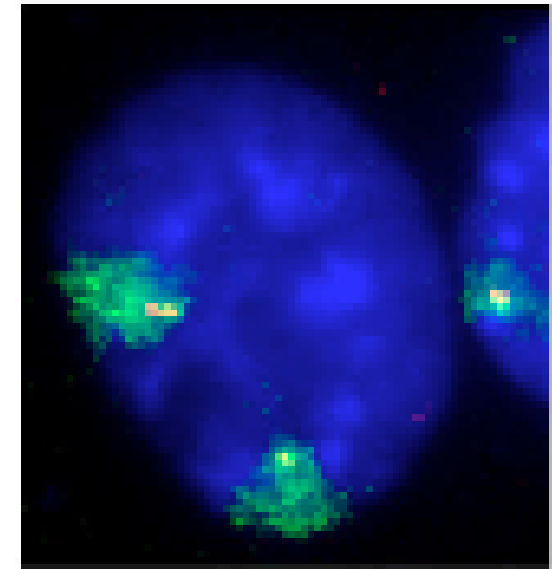


undifferentiated

white bar 5 μ m



day 4



day 14

four color DNA FISH using fosmid probes 3'Hoxd(yellow), 5'Hoxd(red), MMU2 paint(green) on DAPI blue counterstained nuclei of ES cells