

Lezione XXI-XXII

martedì 22-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

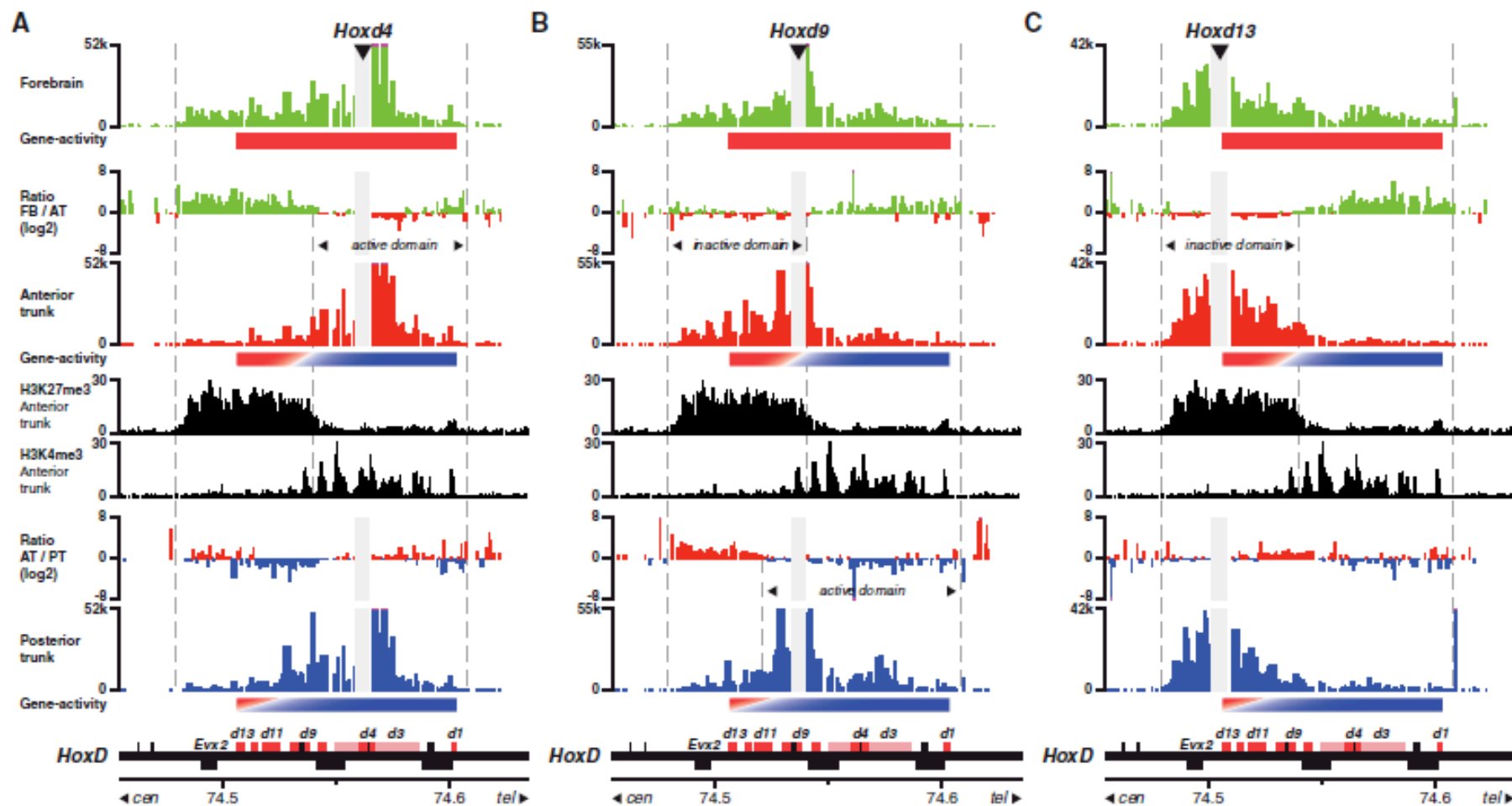
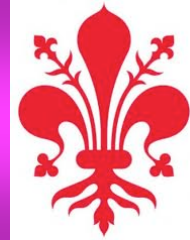
D. Frezza

modelli metilazione H3 e interazioni

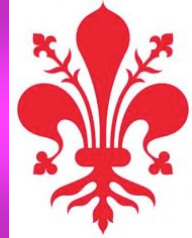


così come nel cervello anche nei campioni prelevati dal tronco nelle regioni inattive c'è coincidenza con i livelli di metilazione H3K27me3 mentre le regioni attive corrispondono a siti di metilazione H3K4me3 (fig 2, S9,S11)

Fig 2 Organizzazione ed espressione



leggenda fig S9



Interazioni dei marcatori alle estremità dei 4 clusters

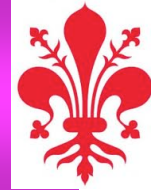
I patterns della organizzazione locale 3D coincidono con i domini condivisi dei marcatori di cromatina.

I patterns cumulativi di associazione locale 4C (verde cervello, rosso tronco anteriore) e distribuzione dei marcatori della cromatina (rosso H3K27, blu H3K4) nelle cellule del cervello e del tronco anteriore.

Lo stato di espressione di un dato gene è mostrato dal colore della barra sotto ogni pattern (rosso inact., blu active). Nel cervello l'associazione 4C ha una distribuzione simile ai domini H3K27. La variazione introdotta è per lo più mostrata dalla diversa collocazione dei viewpoints.

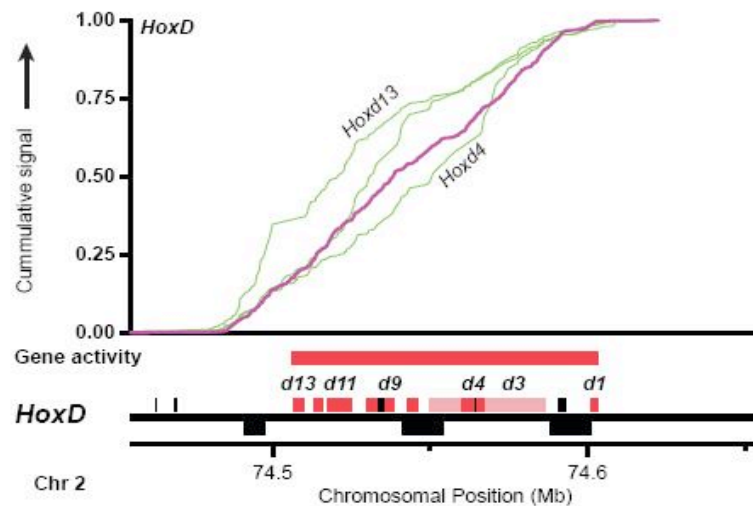
Nel tronco anteriore l'organizzazione 3D dei geni inattivi (gruppo 13) condividono simile distribuzione con i domini H3K27, invece i geni attivi (gruppo 4) ed un po' meno i geni che stanno cambiando verso lo stato attivo (gruppo 9) prendono una conformazione 3D che somiglia al dominio H3K4. I geni Hox marcati in rosso, altri trascritti in nero.

fig S9a: 4C seq association & metylation



coincidenza o separazione nella regione attiva o inattiva, livelli di associazione

Forebrain



Anterior trunk

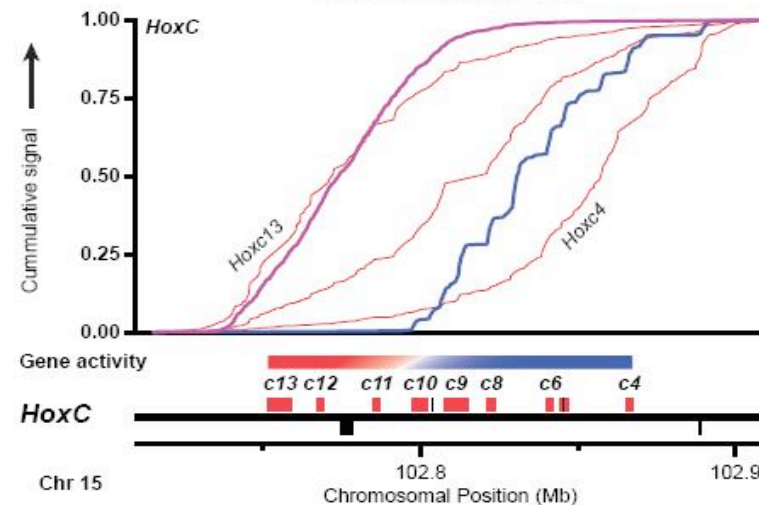
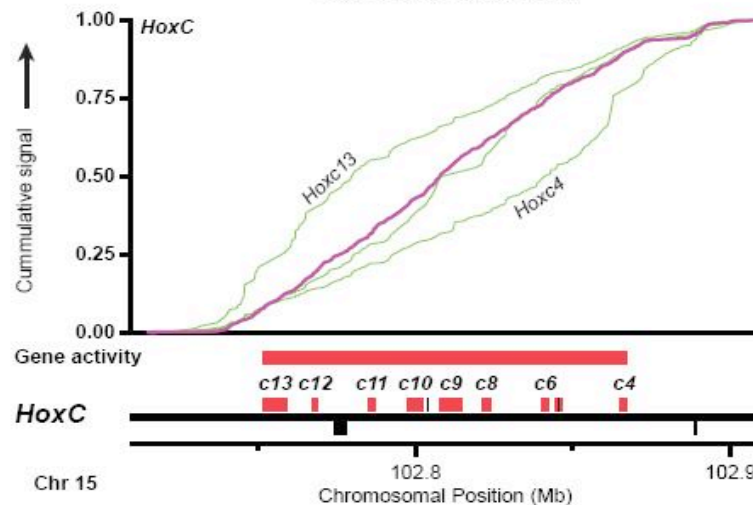
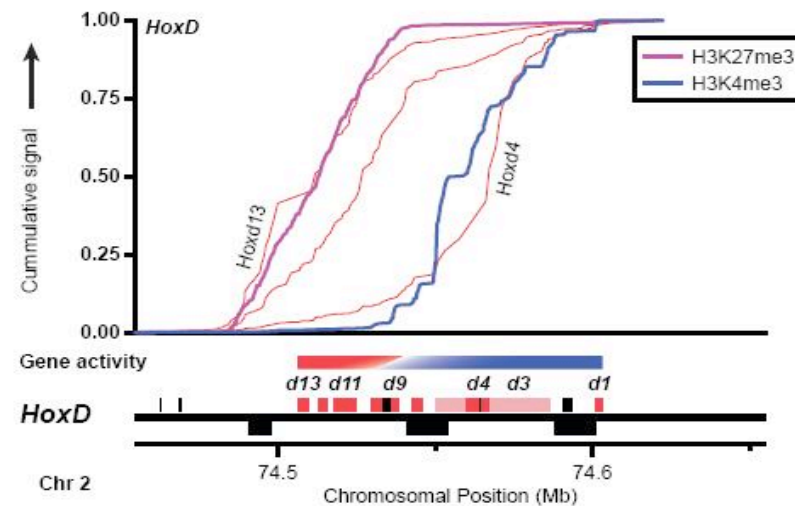
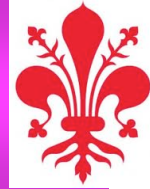
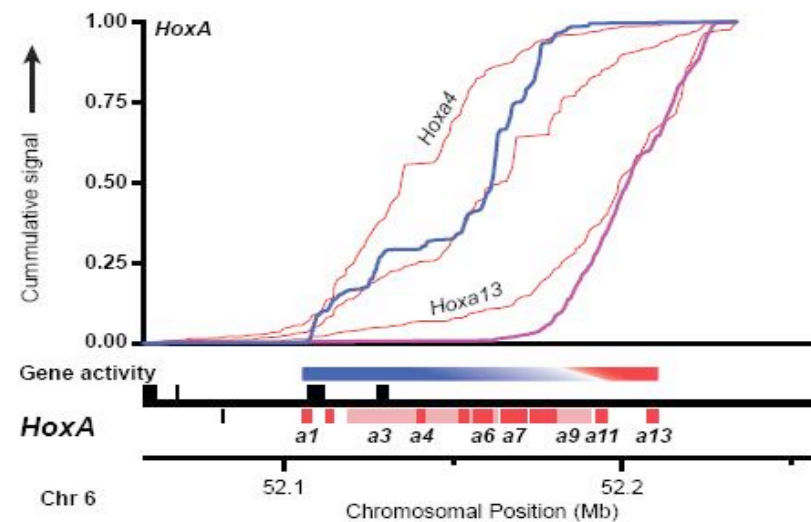
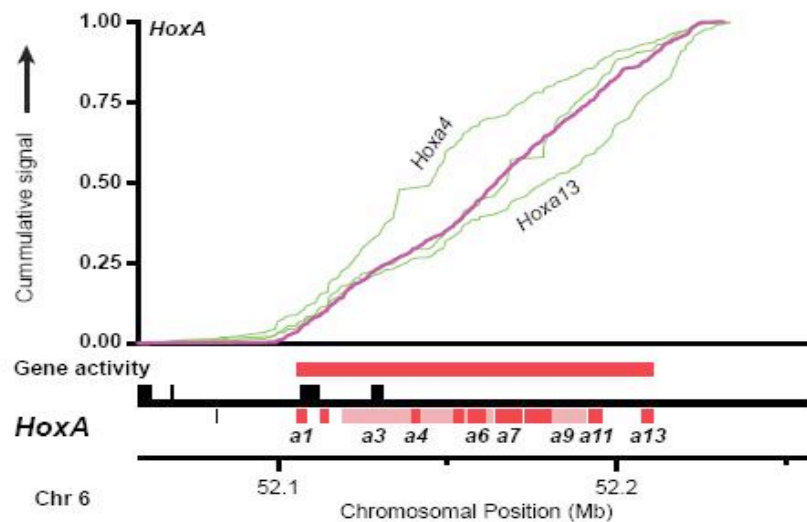
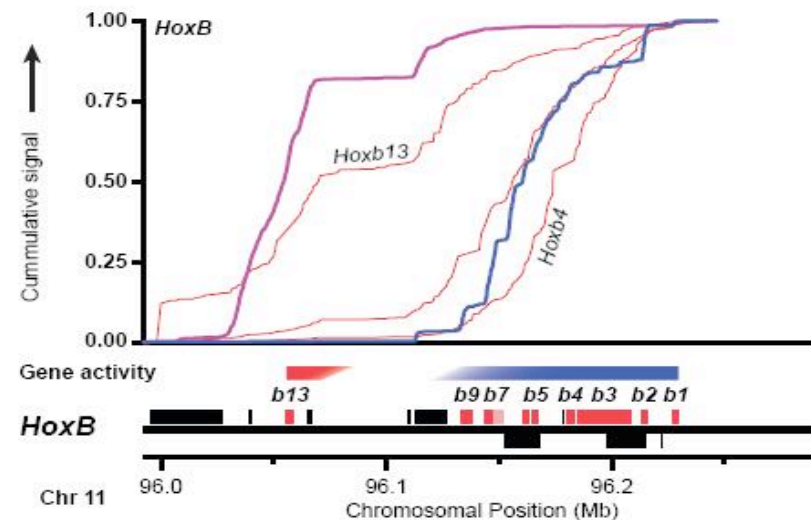
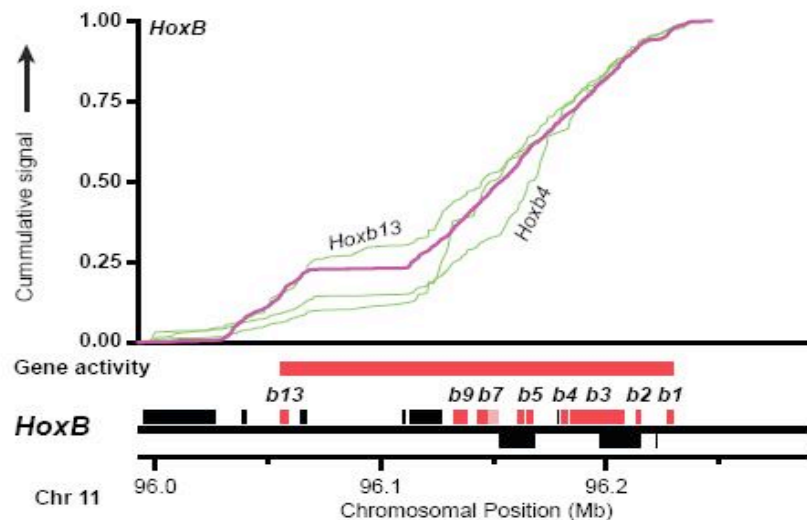


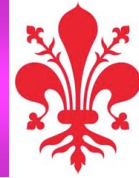
fig S9b: 4C seq association & metylation



coincidenza o separazione nella regione attiva o inattiva, livelli di associazione
forebrain
anterior trunk



Analisi della figura S12



I marcatori (viewpoints) tra HoxB13 ed HoxB9 hanno debole interazione/associazione col resto del cluster HoxB (fig S12). Ciò suggerisce che la regione si estrude con un loop-out dalla architettura bimodale (né con uno né con l'altro).

Analoga interruzione rilevata dalla metilazione (mancano HoxB 10/11/12) tra B13 e B9 per il marcatore H3K27me3 che illustra la precisa corrispondenza dei marcatori della cromatina con l'architettura 3D.

Ciò dimostra che per questi domini 3D non è obbligatoria una fibra di cromatina lineare ininterrotta (discontinuità).

Questo è ulteriormente provato dal forte aumento di associazione mirata tra il dominio inattivo di *HoxD13* ed il locus *Dlx1* che sono separati da una distanza di 3Mb e tutti e due metilati con H3K27me3 (fig S13). Invece non c'è interruzione tra le regioni attive del cluster HoxD.

figura S12a forebrain

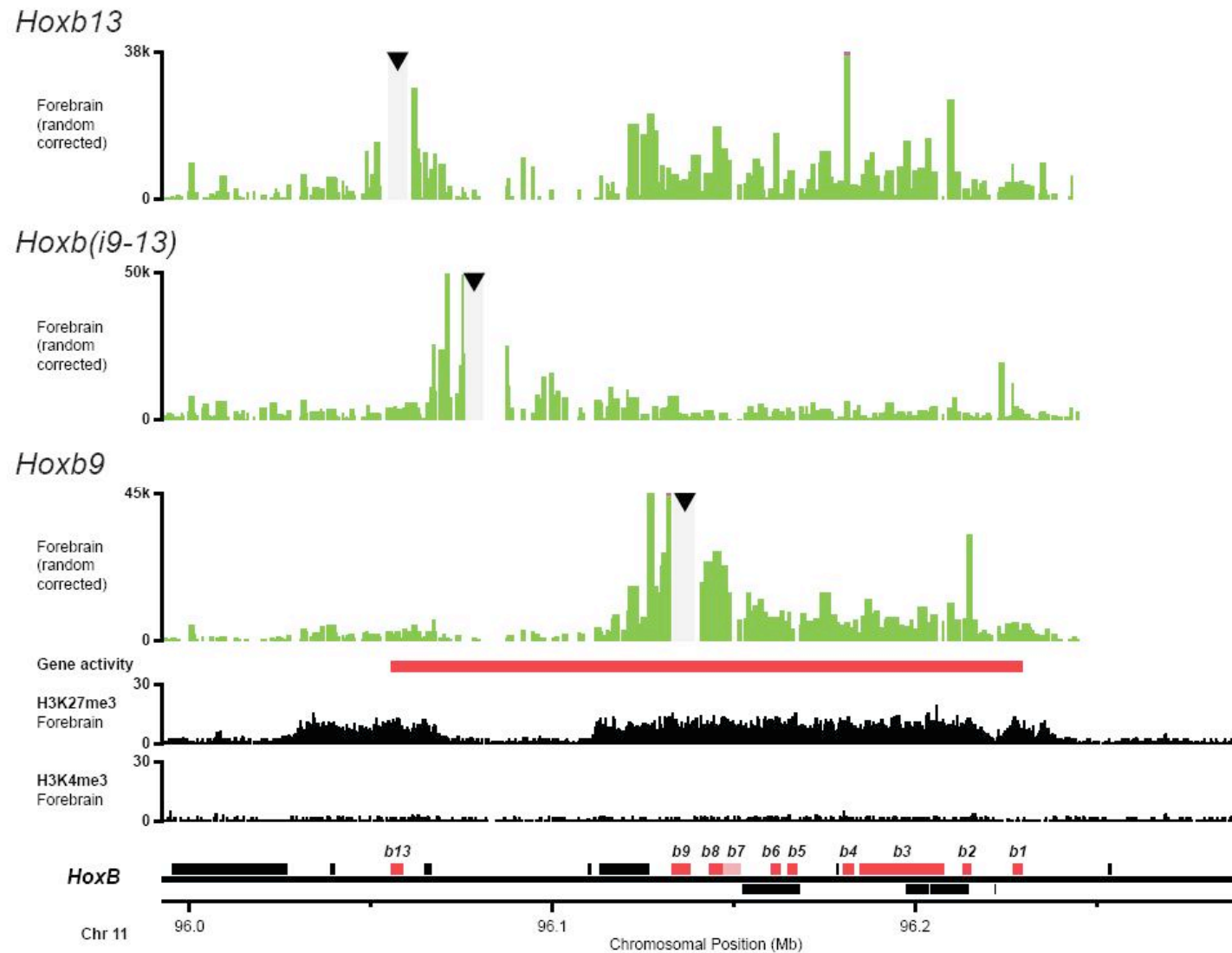
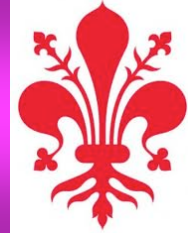


Figura S12 b tronco anteriore

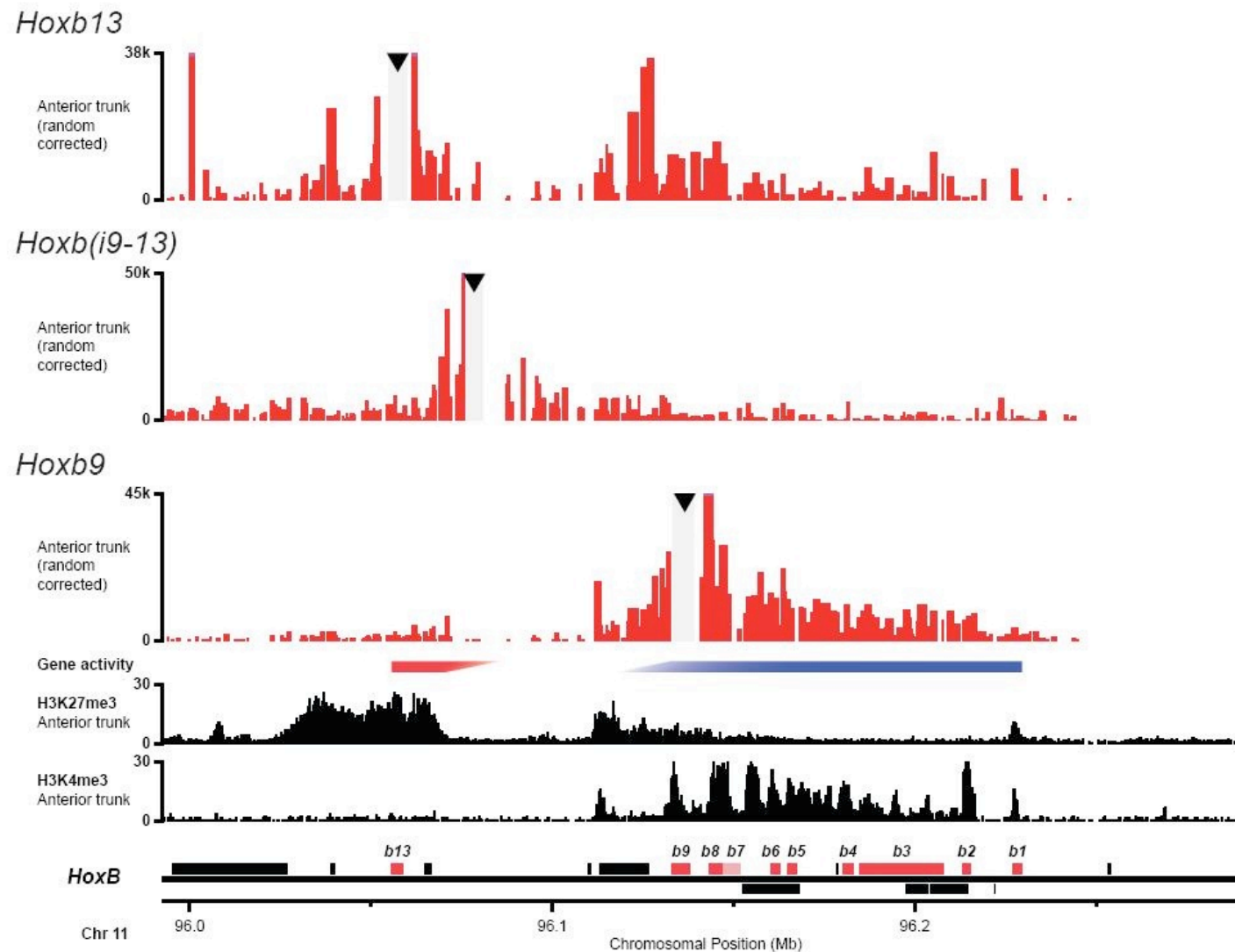
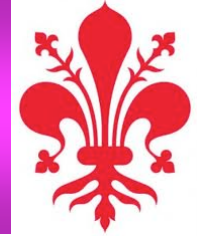
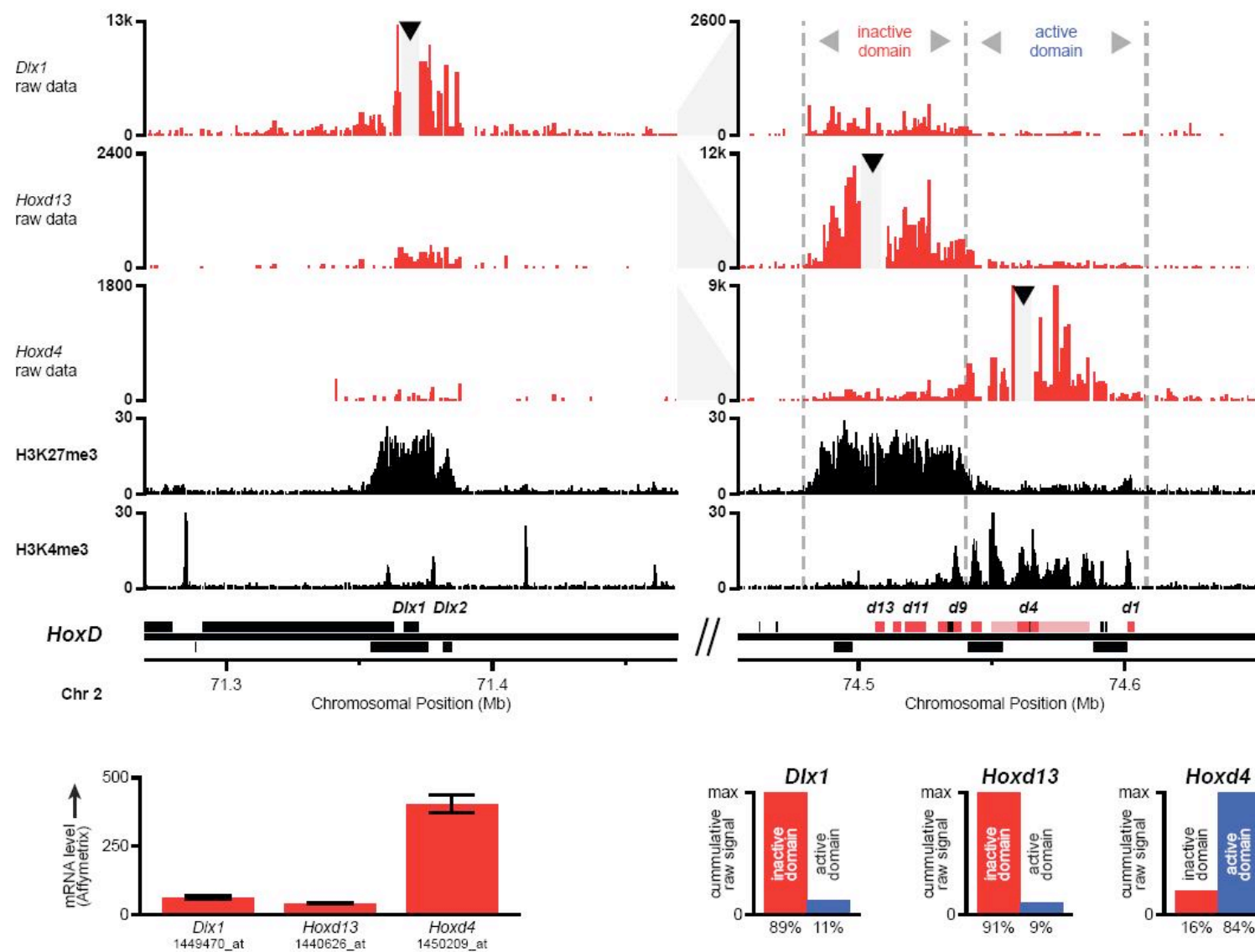
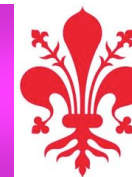
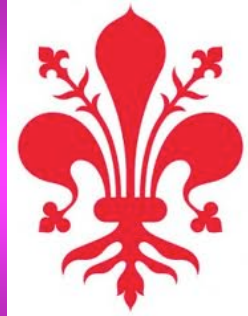


Fig S13



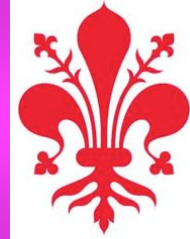
deduzioni importanti e differenze tra i 4 clusters



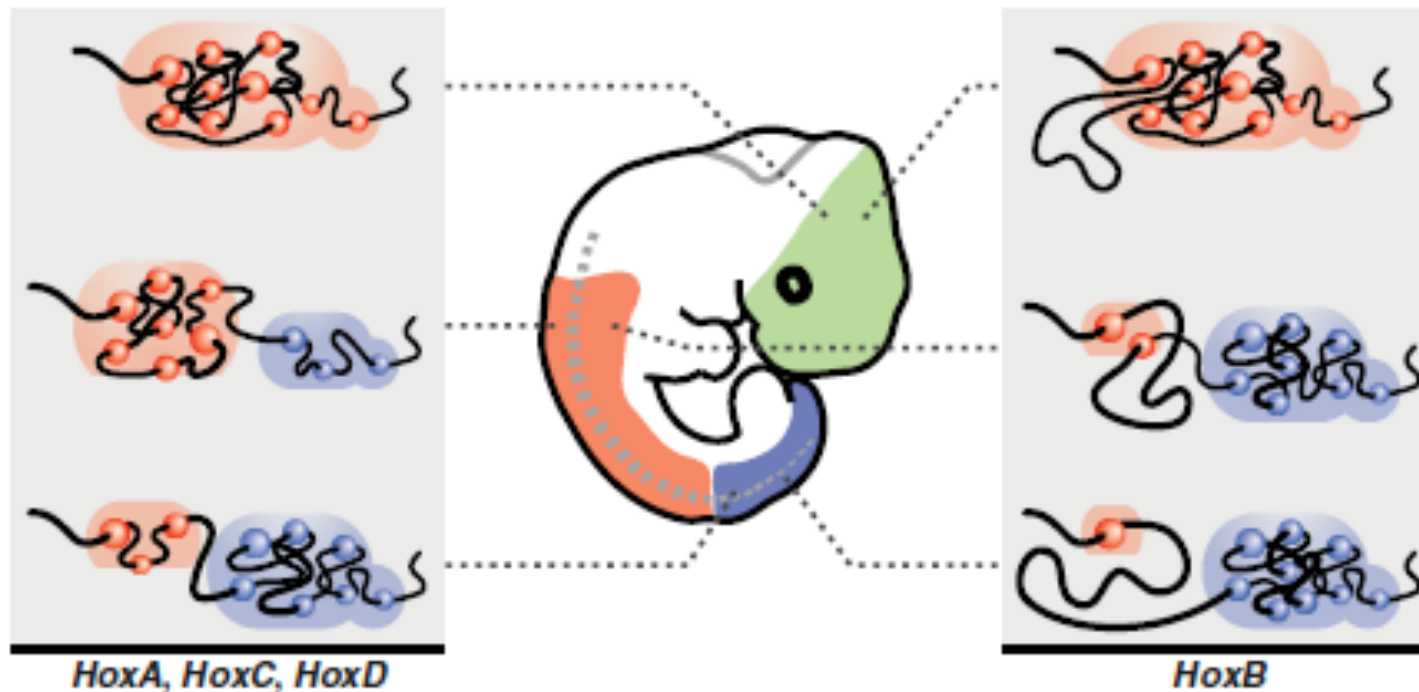
Il cluster Hox B è a se : contiene una sequenza intergenica di 80kb ricca di repeats che separa HoxB13 dal resto del cluster. In questa regione si osserva una debole associazione se non del tutto assente col resto del cluster (fig S12)

È un modello ripetibile

Sintesi e modello fig 3



HoxB ha una situazione diversa con 80kb tra HoxB13 e 9 la regione estrude con un loop-out come nello schema e non sta né nella regione attiva (blu) né in quella inattiva (rossa)



conferma tra 3D e marcatori di cromatina



Da questi dati si propone un modello dove i geni Hox si muovono a passi dal compartimento inattivo marcato da H3K27me3 ad un altro attivo marcato da H3K4me3 rivedi figura 3.

Si può mimare la situazione di HoxB a cui mancano B10-11-12 ?

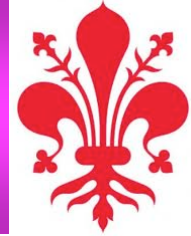
Verifica se questo modello può essere provato usando delle delezioni in vivo che perturbano l'attività genica.

Delezioni di HoxD8 fino a HoxD10

[del 8-10] non cambia molto l'espressione di HoxD11 (S14)

Invece l'ulteriore delezione intergenica [del i8-10] provoca una forte attivazione di HoxD11 nei tessuti anteriori (cefalici) figS14. Queste delezioni sovrapposte hanno un effetto di trascrizione con HoxD11 ectopico solo nel tronco anteriore.

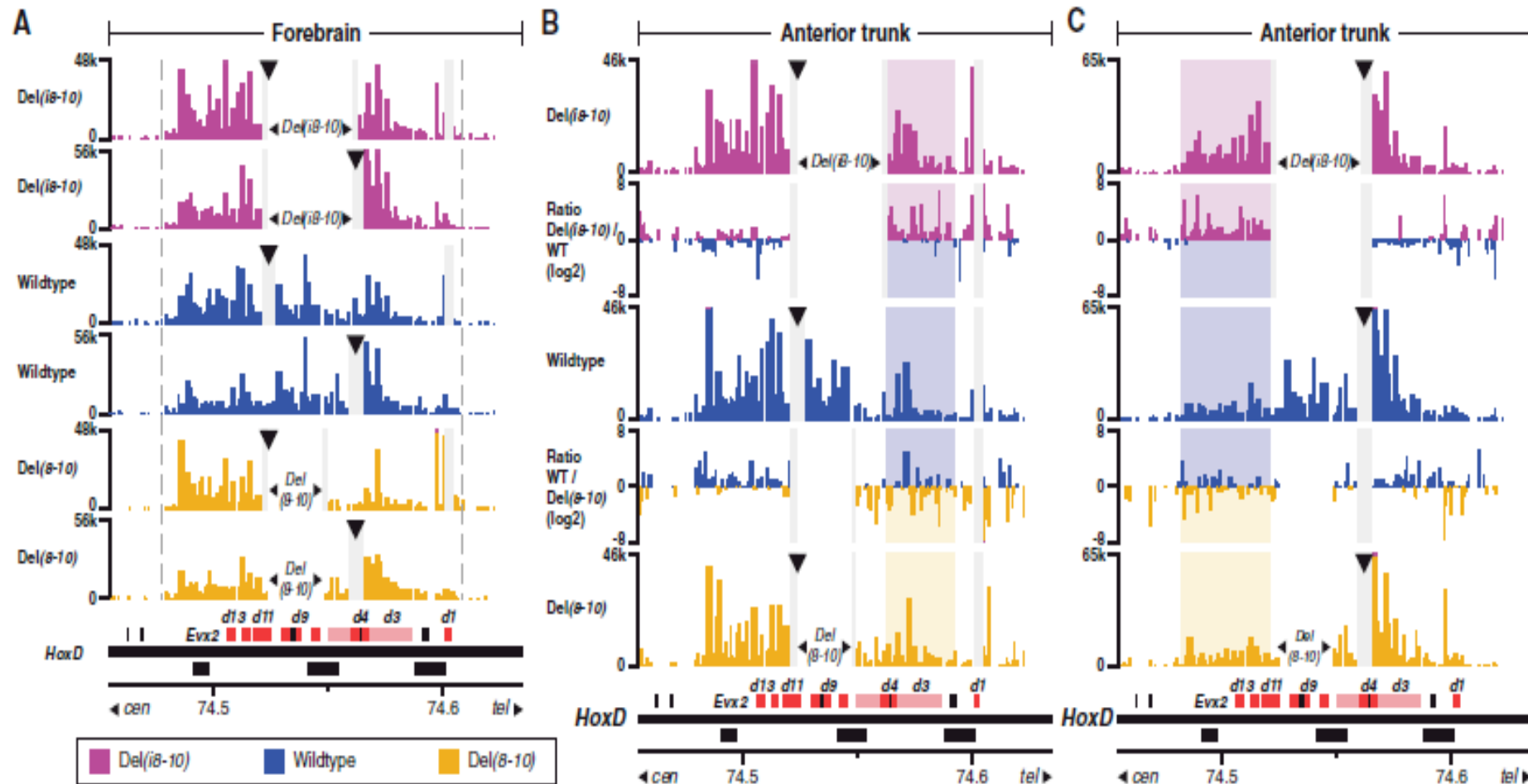
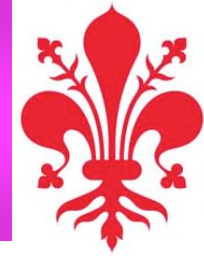
Verifiche di architettura



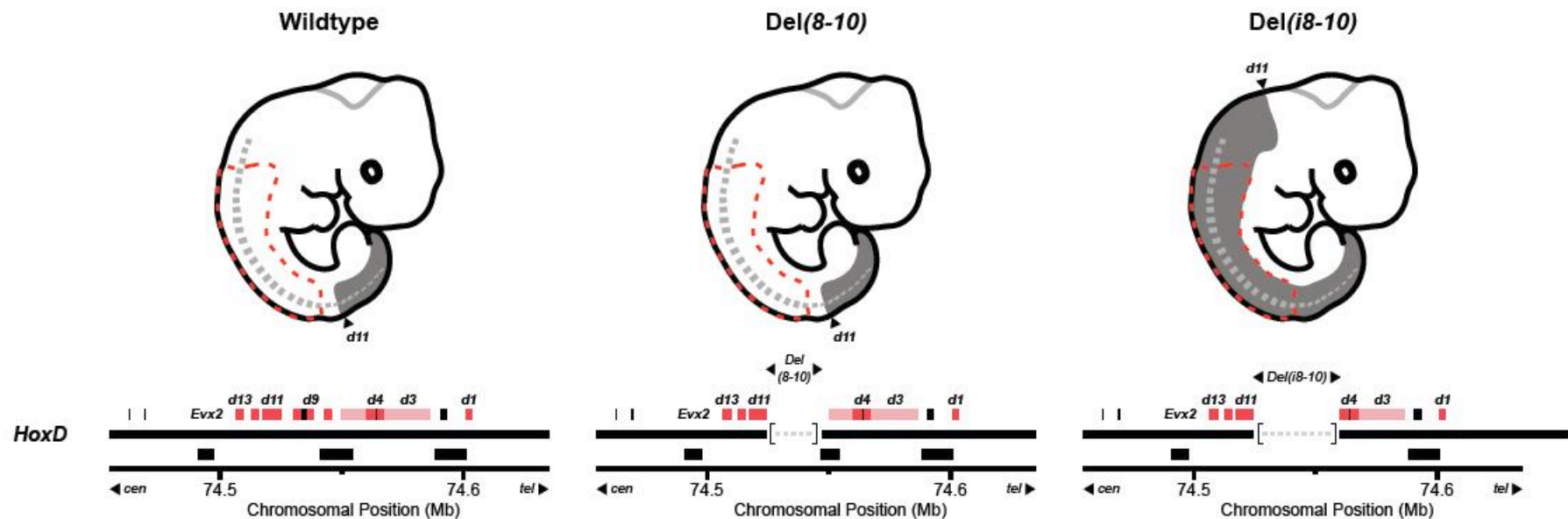
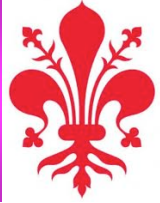
Le delezioni provocano cambiamenti dell'architettura del cluster HoxD inattivo nel cervello? fig4A, S15,16 (controlli).

I - si osserva che i domini inattivi mantengono gli stessi confini sui due lati, - questo indica che il meccanismo della compartimentazione 3D è probabilmente intrinseca al cluster
II - analisi delle interazioni tra HoxD 11 e HoxD4 come marcatori del tronco anteriore, fig 4B, C, S17

espressione ectopica (fuori luogo) di HoxD



Espressione in situ del HoxD 8-10 fig S14



Le regioni intergeniche fanno da boundaries sull'espressione tissutale sull'asse embrionale con la colinearità della struttura genomica cis-acting del cluster

analisi dell'effetto delle delezioni



La differenza tra del 8-10 e del i8-10 sta nella lunghezza dove i8-10 è > di 8-10 (vedi schema figura 4)

Dove c'è espressione ectopica di HoxD11 (del i8-10) l'associazione di HoxD11 ed il compartimento “positivo” è molto aumentata.

Osservazione fatta usando come “viewpoint” sia HoxD11 che HoxD4.

Guardare su figura 4 B, C la differenza del rapporto tra “del-i8-10” / wt e “del-8-10” (viola /blu e blu /giallo)

I contatti di “del-8-10” rimangono come nel wt.

E' l'attivazione ectopica più che la delezione per sé che genera l'associazione di HoxD11 con il dominio della regione attiva.

conclusioni



L'attivazione colineare dei geni Hox comporta un passaggio a gradi di ogni gene da un compartimento negativo ad uno positivo che ha proprietà biochimiche diverse e perciò risulta in una separazione fisica per le modalità regolative.

Benchè debba essere dimostrato appieno se questo processo (i.e. spostamento fisico) comporta un'attivazione colineare o se ne sia una conseguenza.

Se lo spostamento provoca l'attivazione questo risponde a tre domande importanti della famiglia di questi geni:

- i. per assicurare una giusta successione nell'attivazione colineare rispettando la morfologia assiale
- ii. per prevenire l'attivazione anticipata dei geni più posteriori che porterebbe a fenotipi deleteri
- iii. per fissare e memorizzare lo stato trascrizionale ai vari livelli del corpo.

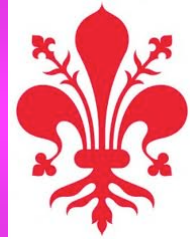
Questi limiti sono ben assegnati dal nostro modello “cis-acting” meglio che agire dopo interazioni “trans-acting” che non avrebbe stessa affidabilità e precisione.

Novità portate

Gli esperimenti hanno evidenziato che il cluster si comporta in maniera coerente rispetto a ciò che era stato visto in vitro con attivazione 3'-5' cefalo-caudale con margini sui somiti definiti dai vari geni, compartimentazione dei geni secondo la metilazione H3K27me3 / H3K4me3 corrispondente ai livelli di interazione osservata con metodo 4C. Interruzione sul cluster genera interruzione della distribuzione bimodale es. HoxB e su delezione in HoxD.

E' la cromatina intergenica che controlla l'attivazione dei geni a valle per cui HoxD11 (vedi fig S14) non è più confinato alla regione caudale ed è espresso molto più anteriormente. Questo non dipende da mutanti nei geni ma dall'organizzazione del cluster, regione non-coding. La colinearità non è solo temporale ma spaziale sull'asse corporeo.

Prossimo articolo : Erez Lieberman-Aiden et al.



Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome.

Science 9 Ottobre 2009, 326 (5950) pp 289-293. Erez Lieberman-Aiden et al.

The Hi-C method

