

Lezione XXXV-XXXVI

martedì 20-XII-2011

corso di genomica

laurea magistrale Biotecnologia
Industriale

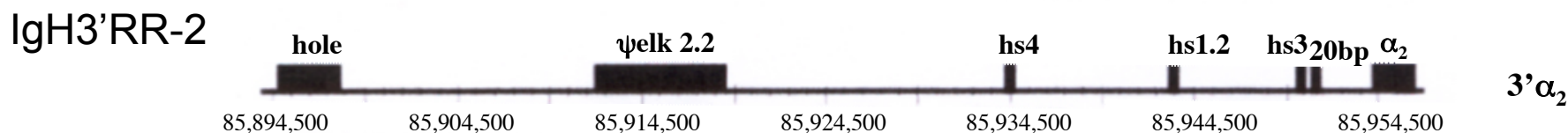
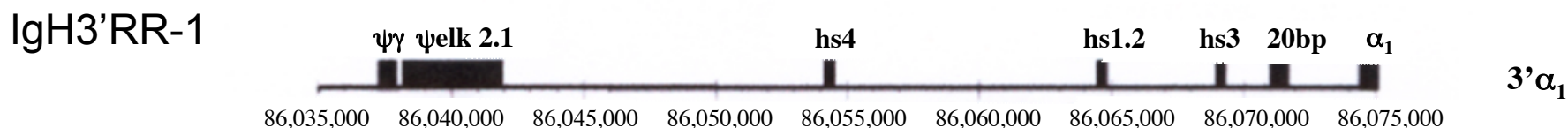
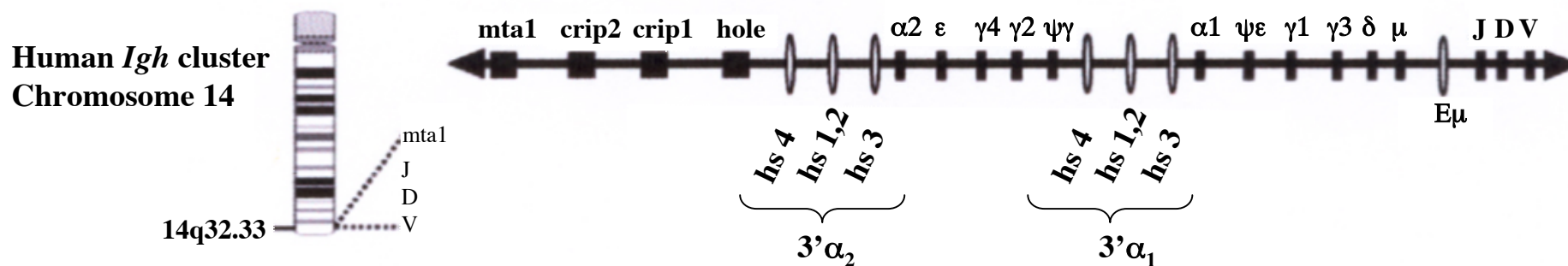
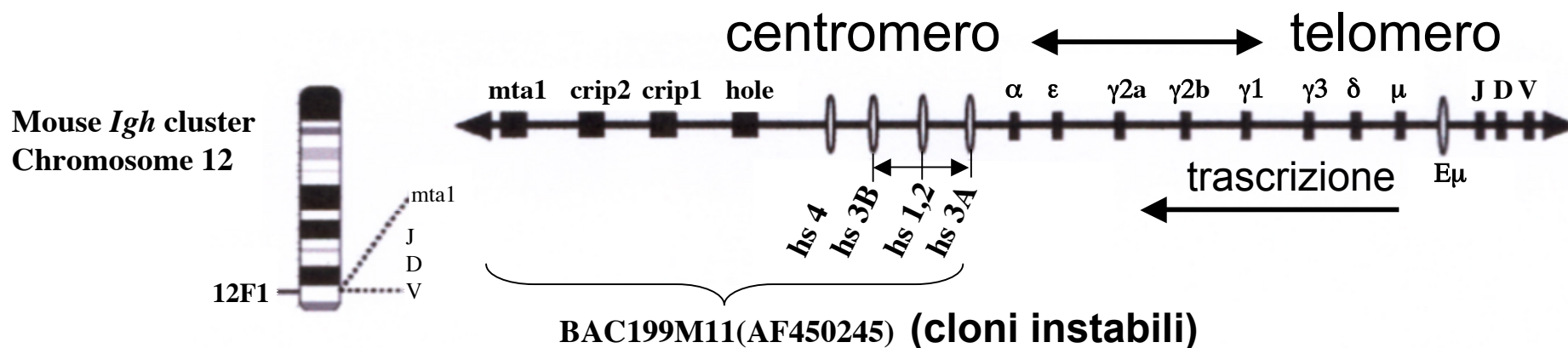
aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

D. Frezza

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:

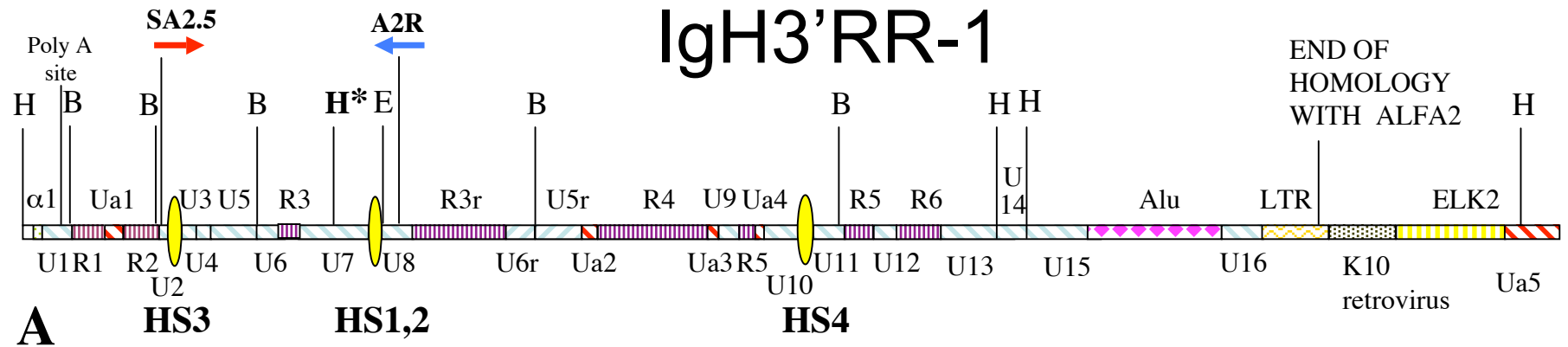
è cambiato il sistema di regolazione rispetto al topo ?

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

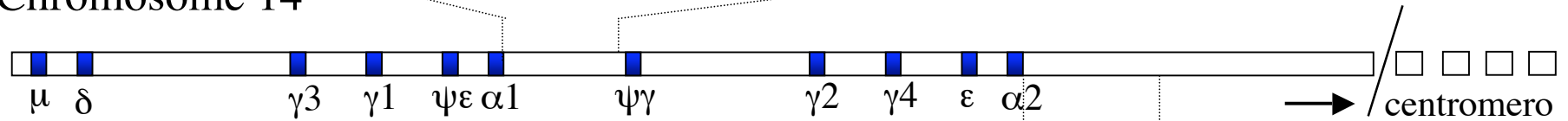
- dalle diverse forme alleliche si può capire il funzionamento delle due 3'RR ?

- hanno tempi di attivazione diversi?

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

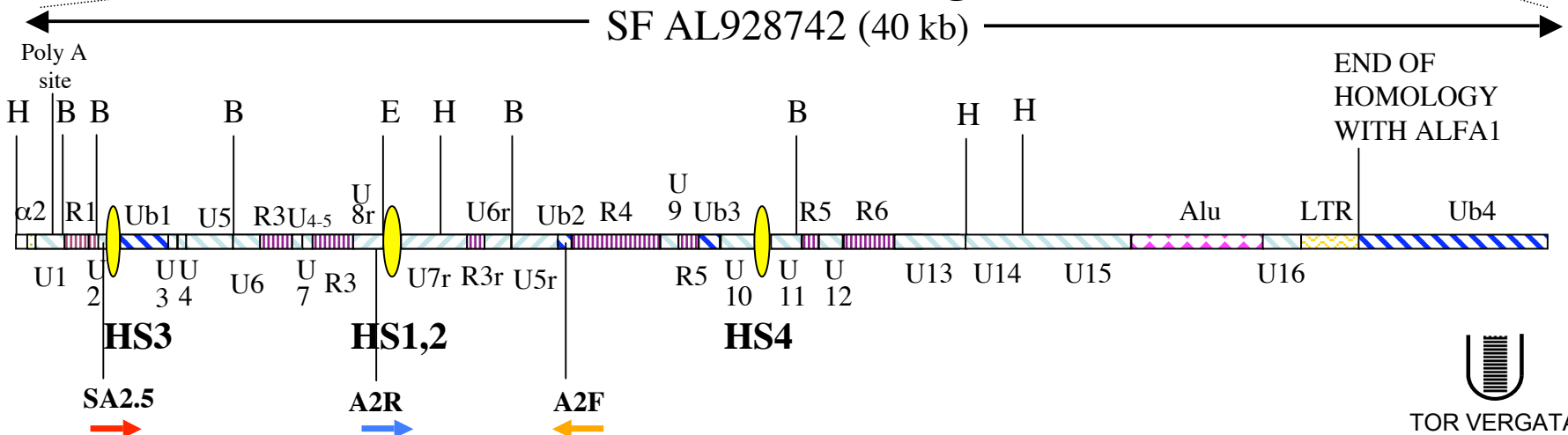


Chromosome 14



B

IgH3'RR-2



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)

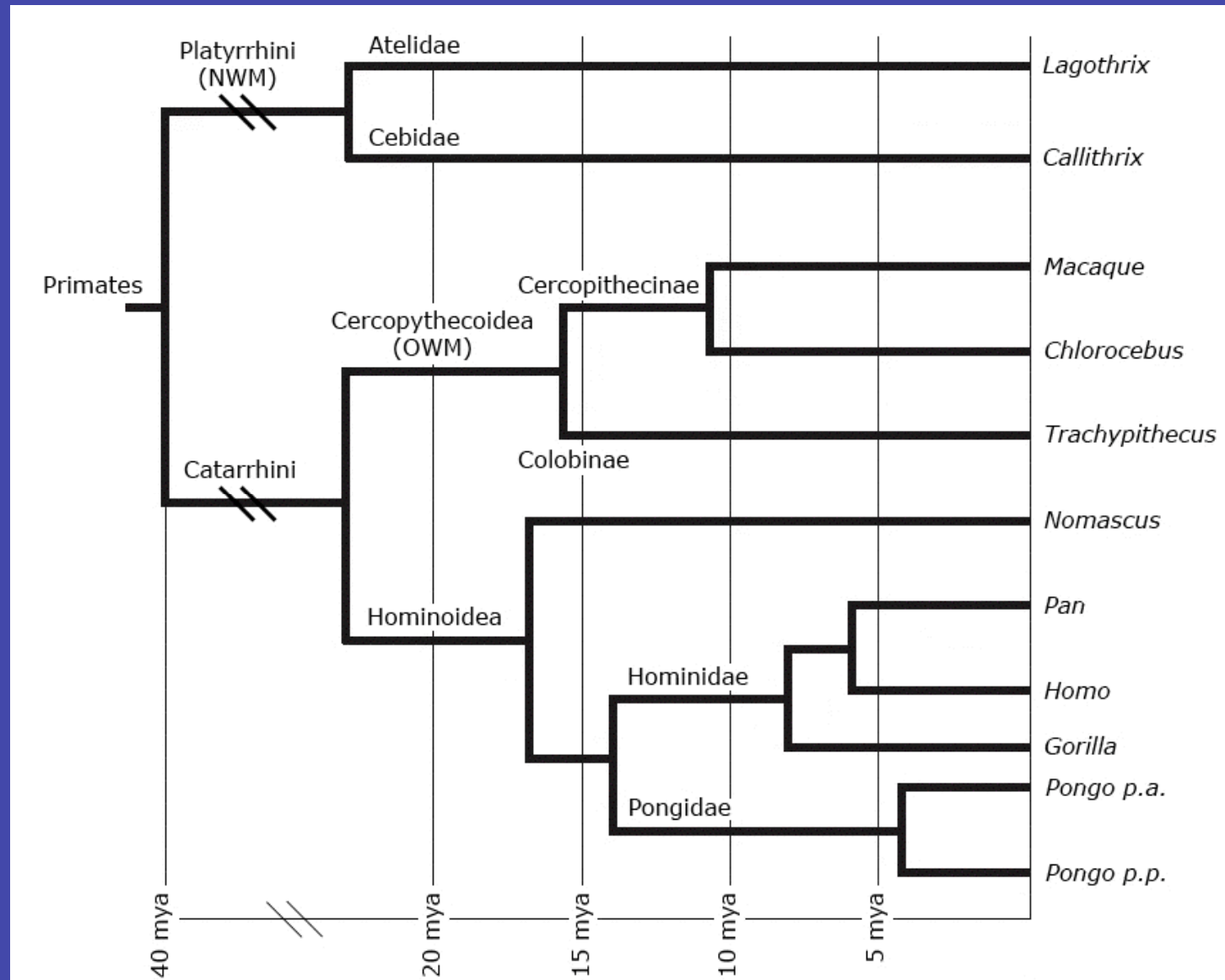
nell'uomo lavori di biologia cellulare-molecolare confermano il ruolo importante delle 3'RR, ma sono due invece di una

possibili differenze

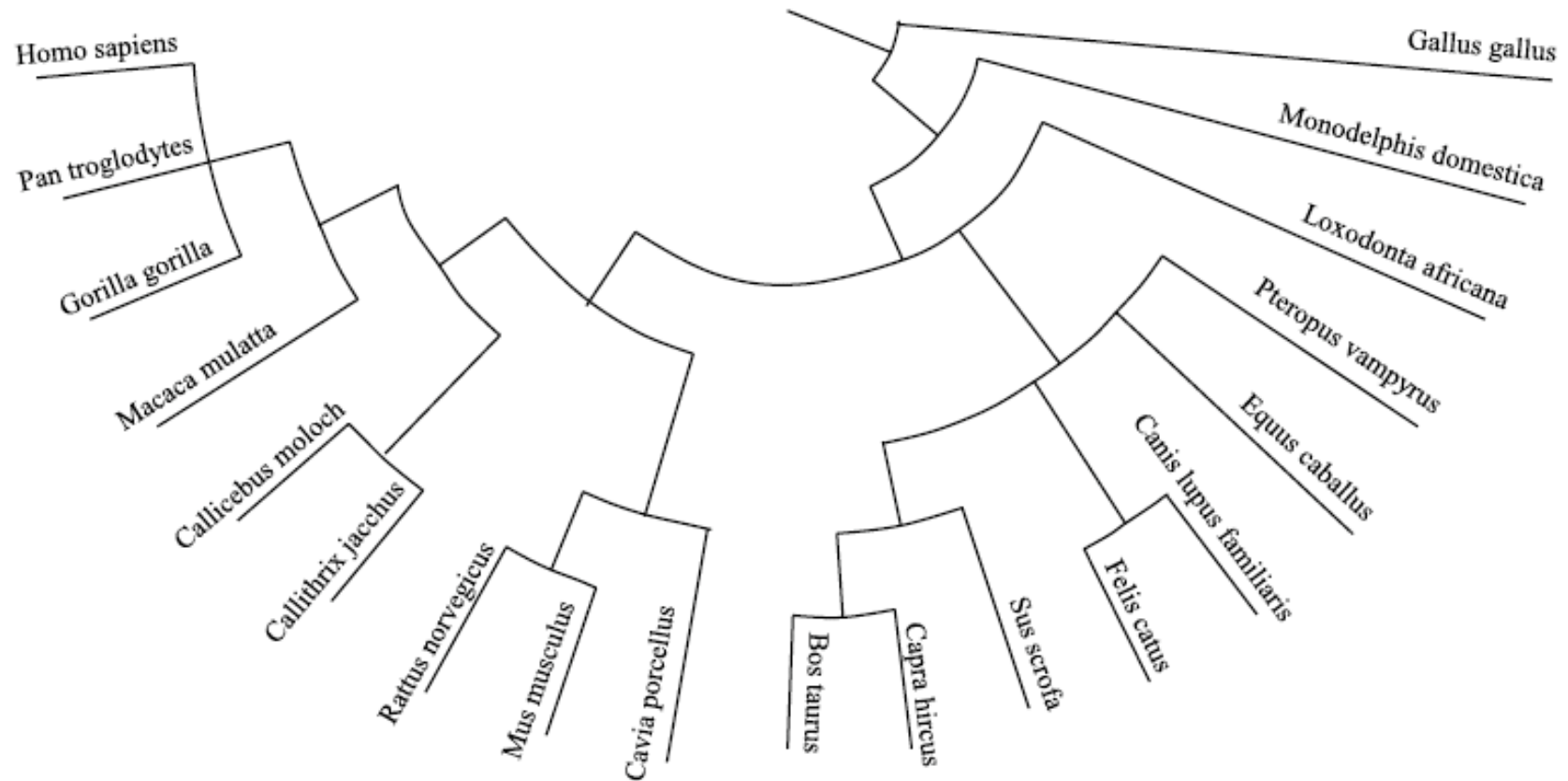
sull'uomo si studiano i polimorfismi non possibili su topo

cosa sono i polimorfismi di HS1.2

platyrrhine - catarrhine 40 Mya



evoluzione della IgH 3'RR

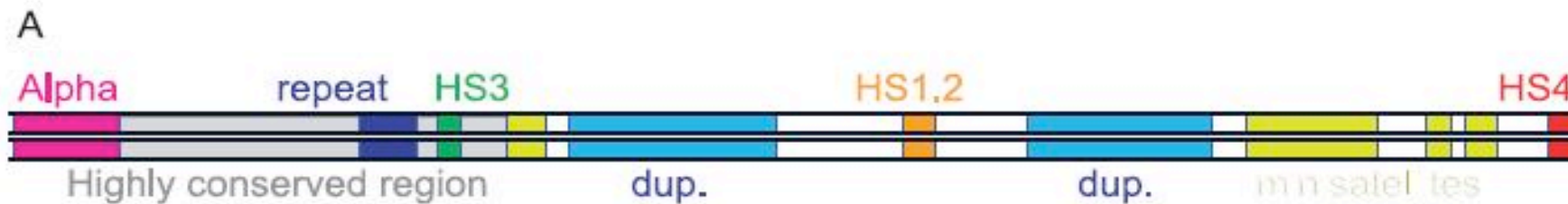


strutture conservate di HS1.2

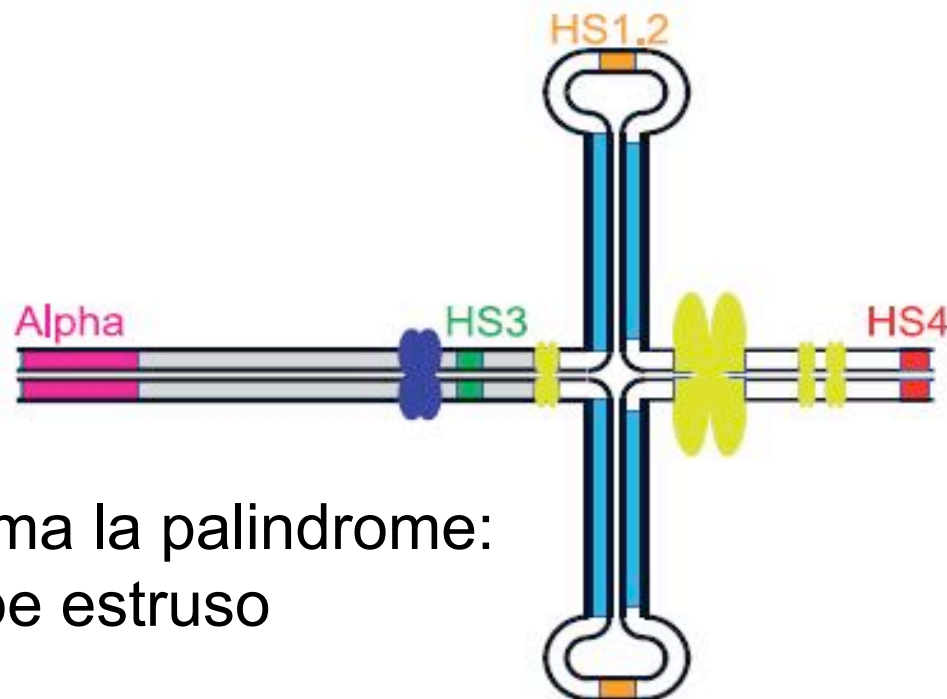
manca la sequenza di Panda uscita il 13 Dicembre 2009

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

la palindrome interna alla 3'RR
conservata in tutti i mammiferi



B



quando si forma la palindrome:
hs1.2 verrebbe estruso

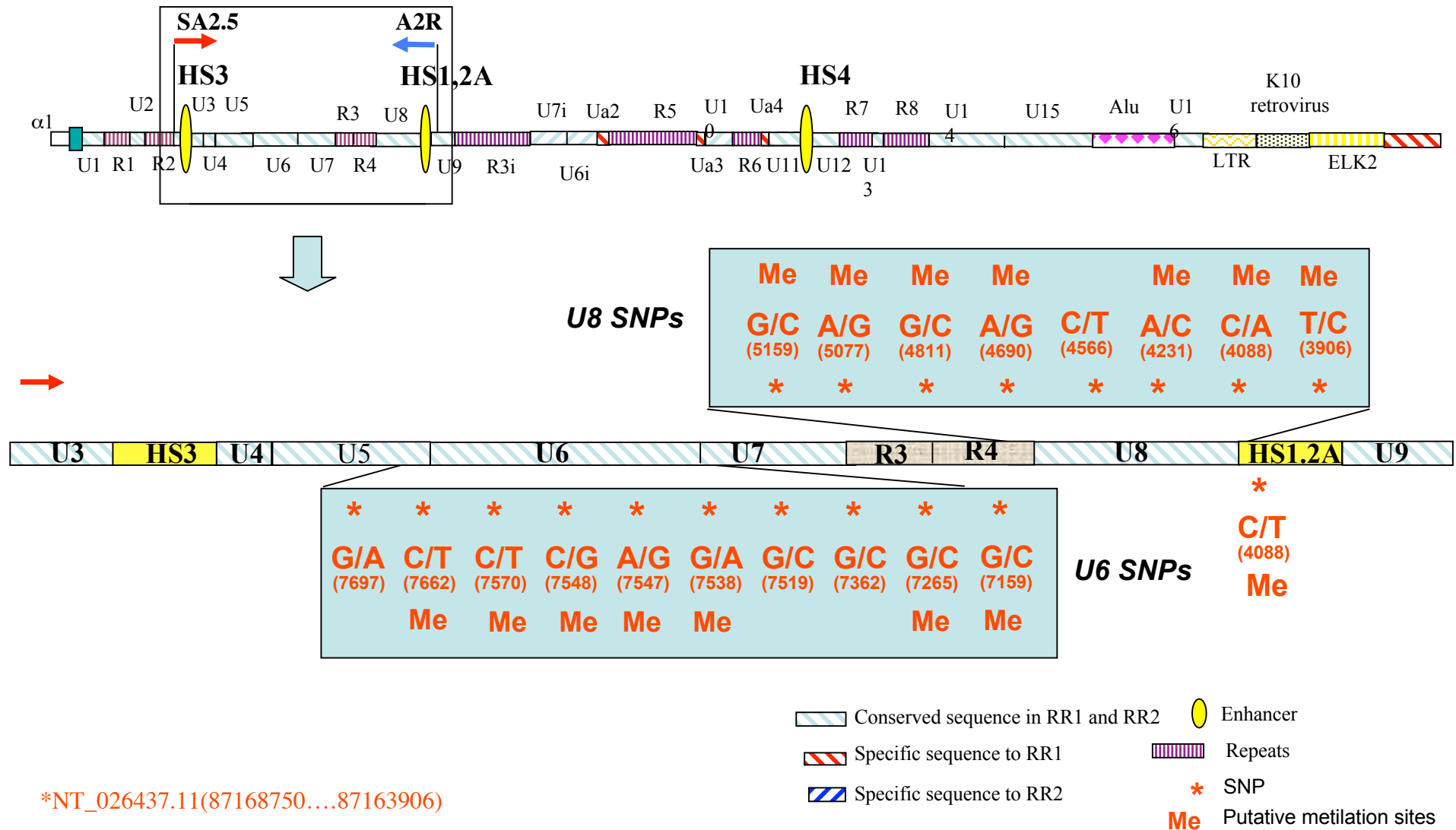
Sorprese nella sequenza palindromica

L'aspetto sorprendente è che abbiamo trovato mutazioni nelle varie regioni della palindrome e queste durante l'evoluzione sono state corrette nell'altro braccio per conservare la complementarietà.

Se la palindrome non avesse una funzione ci sarebbe stata maggiore omologia tra le specie e meno complementarietà all'interno delle specie.

In altre parole dopo la duplicazione per inversione ancestrale ci sarebbe stata degenerazione anche nella regione palindromica.

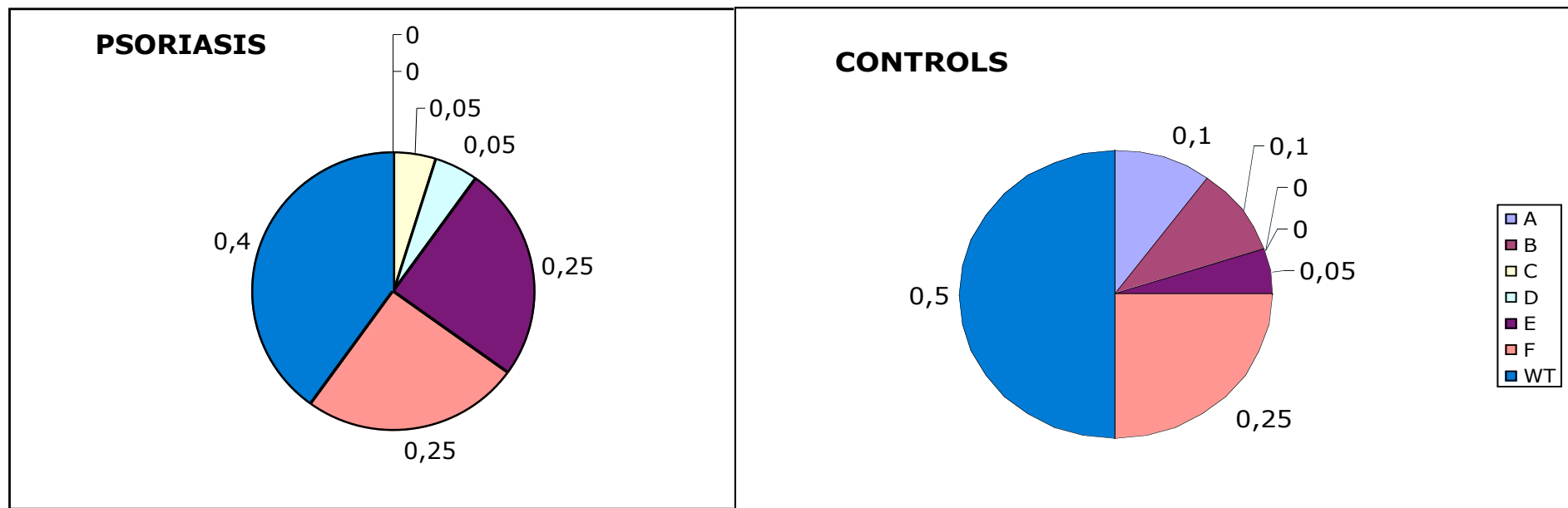
analisi dei polimorfismi nella palindrome



I polimorfismi della palindrome

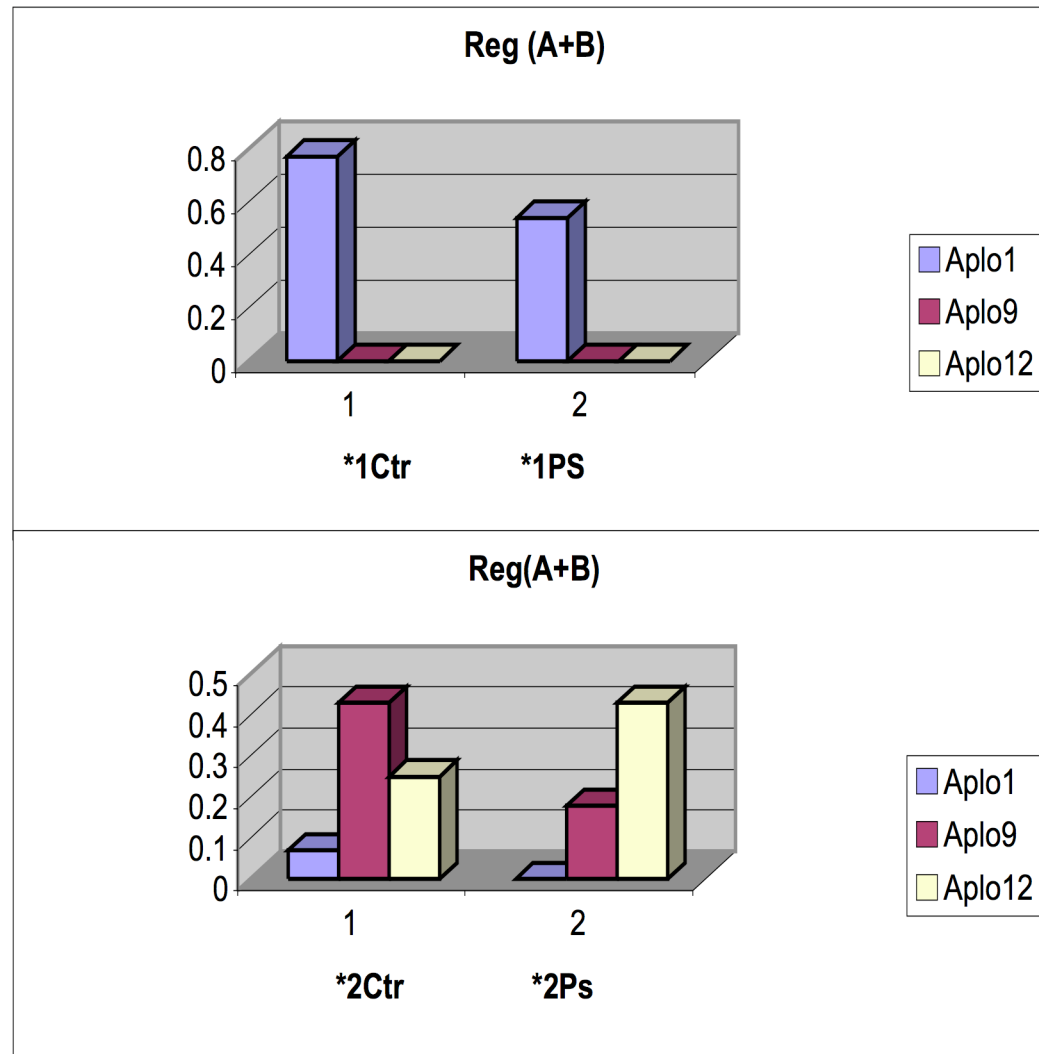
Cascano nella palidrome molti SNPs e gli aplotipi sono meno numerosi nel caso della Psoriasi

gli aplotipi nella palindrome



Gli aplotipi sono dati dalle varie combinazioni di SNPs presenti nella regione palindromica

Osservando gli aplotipi associati al genotipo di hs1.2



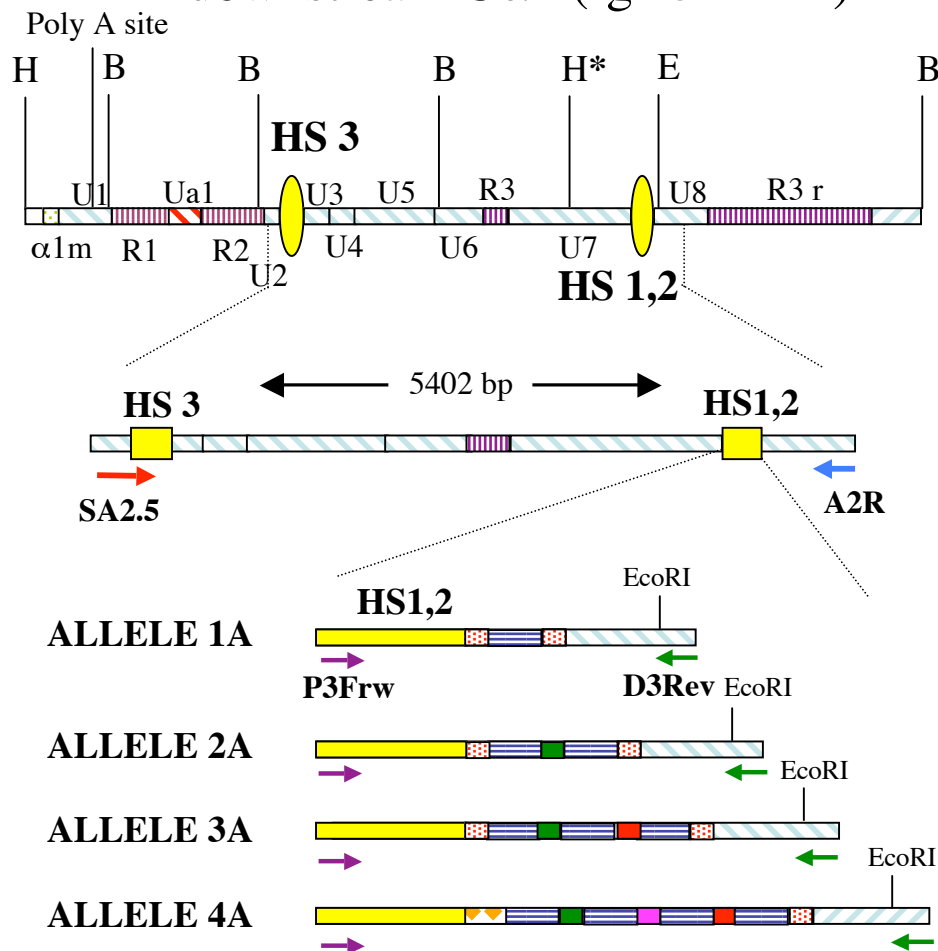
per i portatori
dell'allele *1 le freq.
sono uguali nel contrl.
e nella Psoriasi
 $\chi^2 P = 0.65$

per i portatori
dell'allele *2 le freq.
sono diverse nei
contrl e nella psoriasi
 $\chi^2 P = 0.028$

campione piccolo n.36
no more money

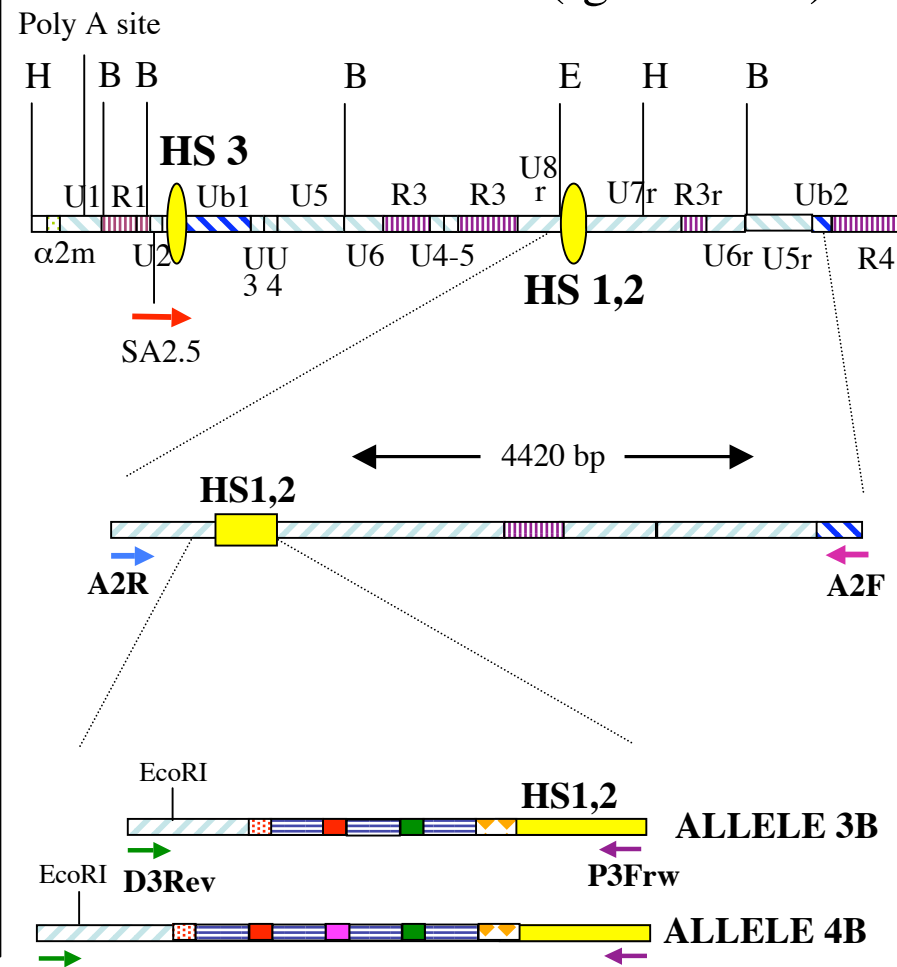
A

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

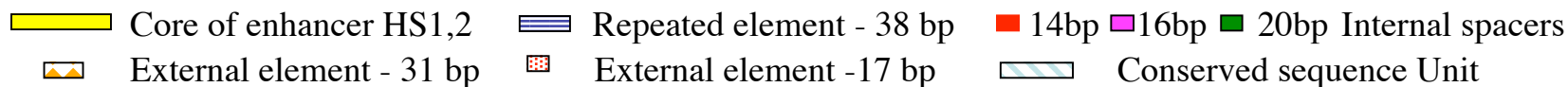


B

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



i polimorfismi

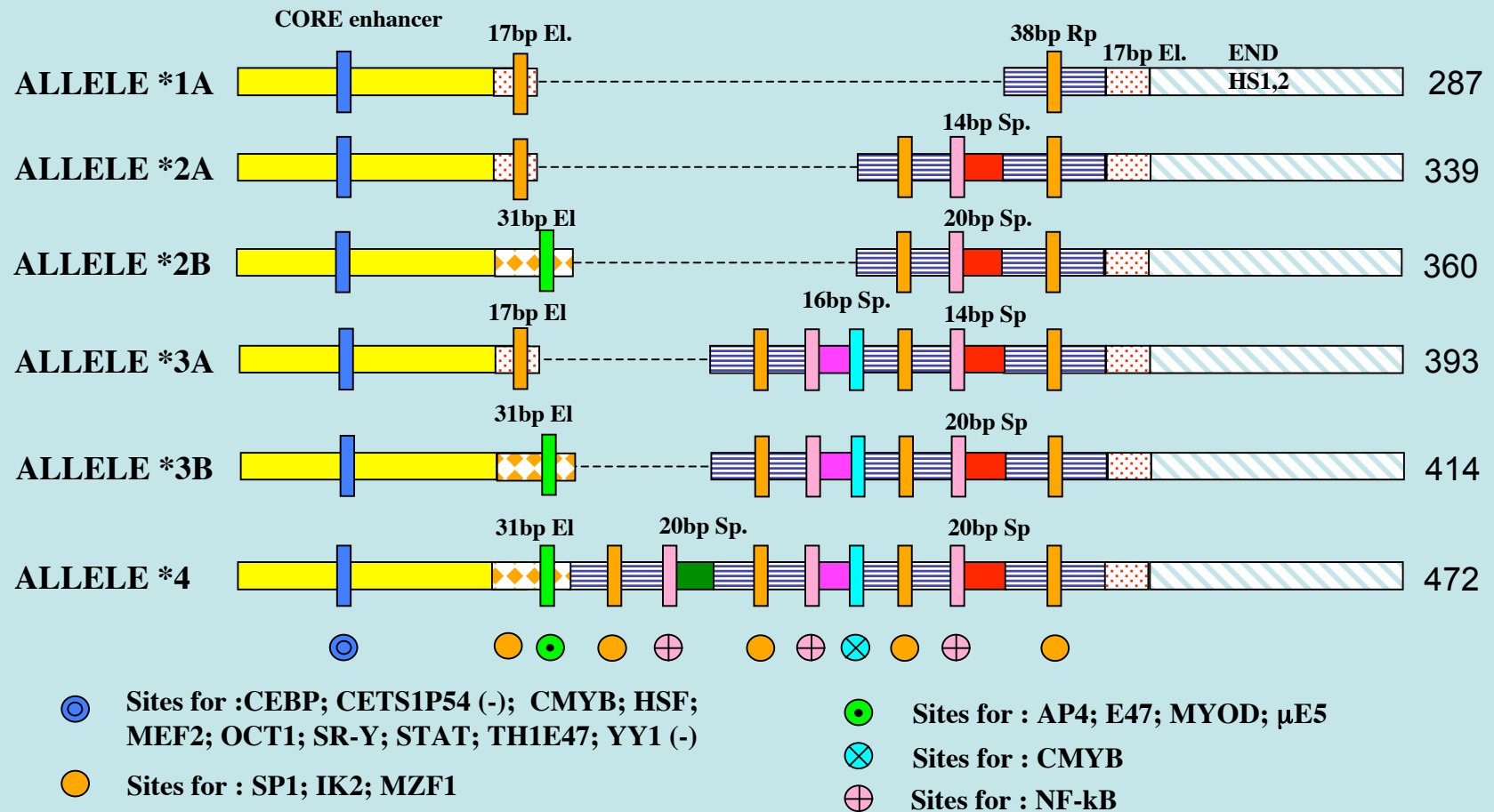


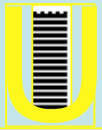


TOR VERGATA

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

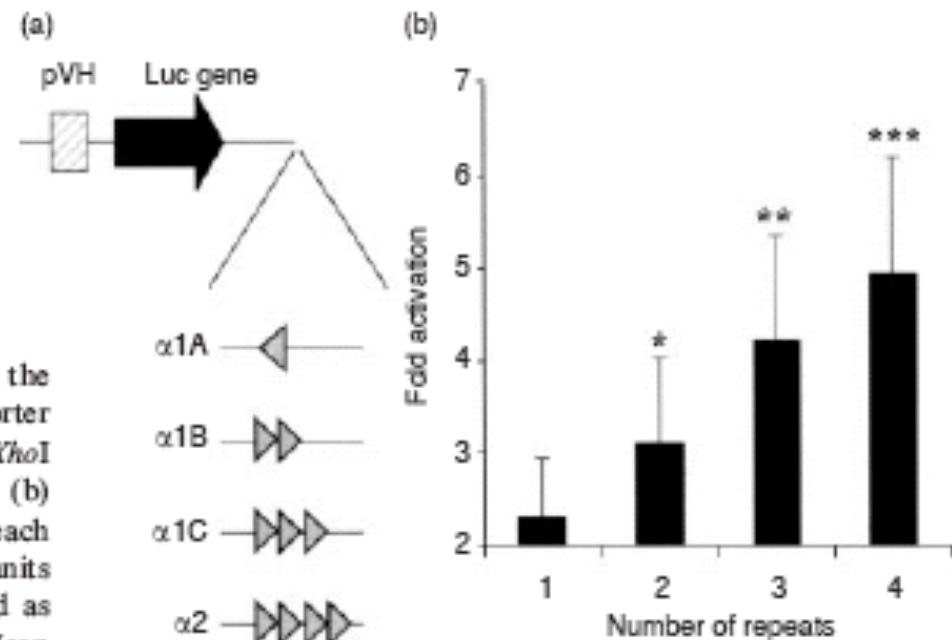
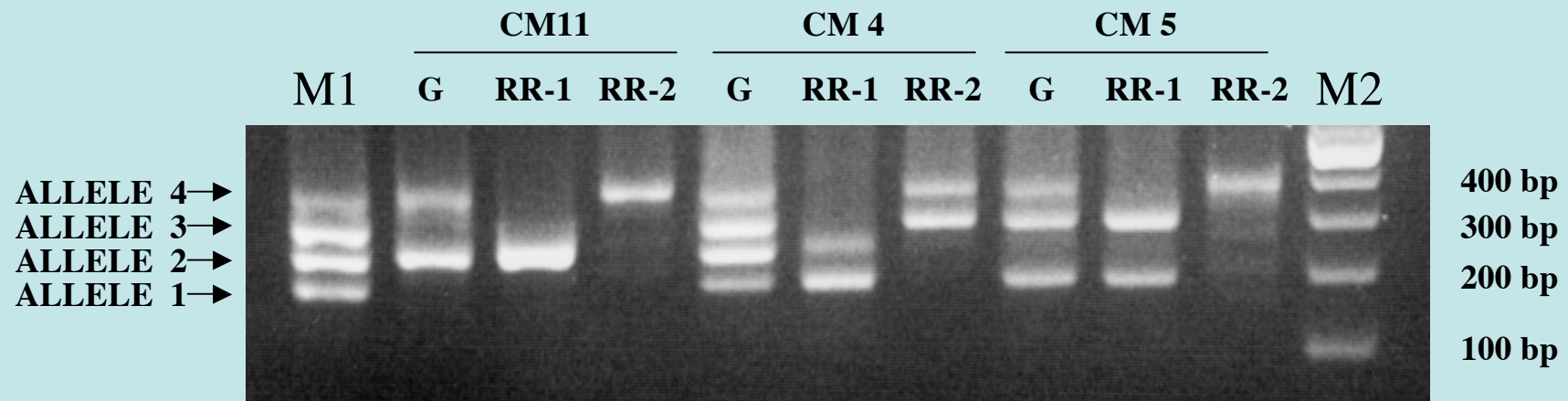


Figure 4. Transcriptional strength of the three PCR alleles of the $\alpha 1$ h1,2 enhancer and the $\alpha 2$ h1,2 allele in a luciferase gene reporter assay. (a) Construction: hs1,2 elements were cloned as *Bam*HI-*Xho*I fragments in *Bam*HI-*Sal*I sites of the pGL3-pVH vector. (b) Estimation of luciferase 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

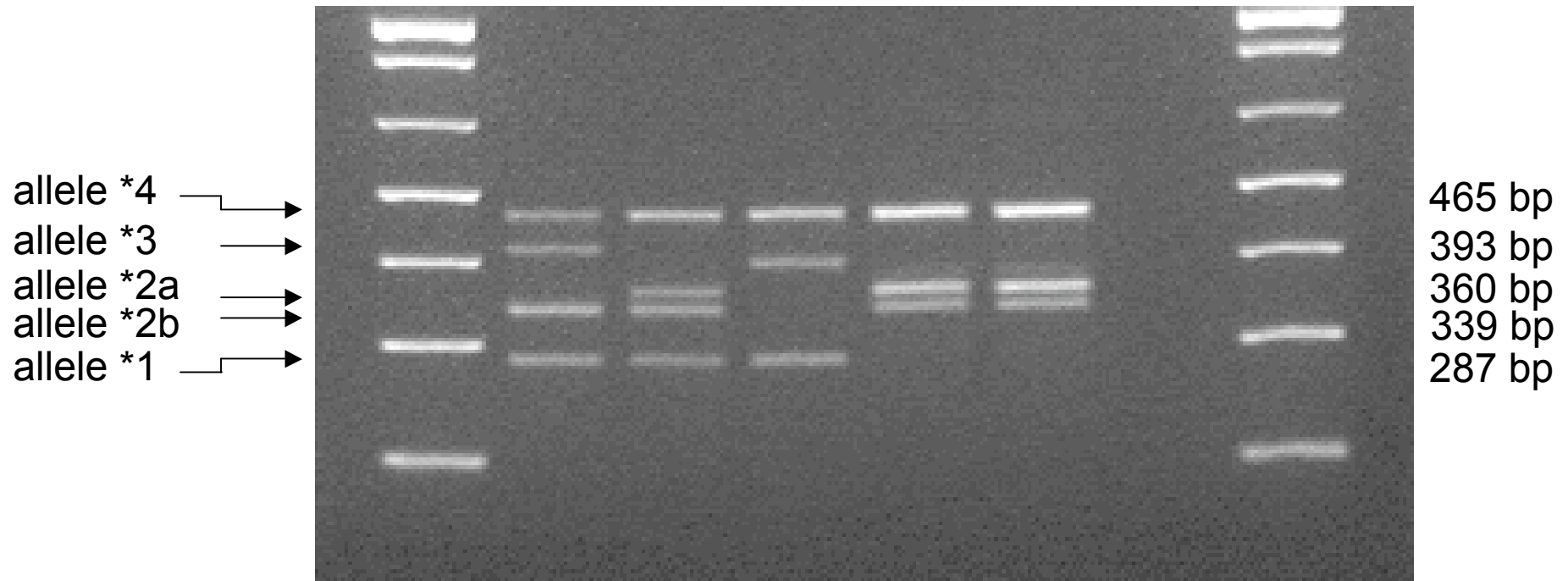


amplificazione G=genomica o selettiva RR-1; RR-2

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!



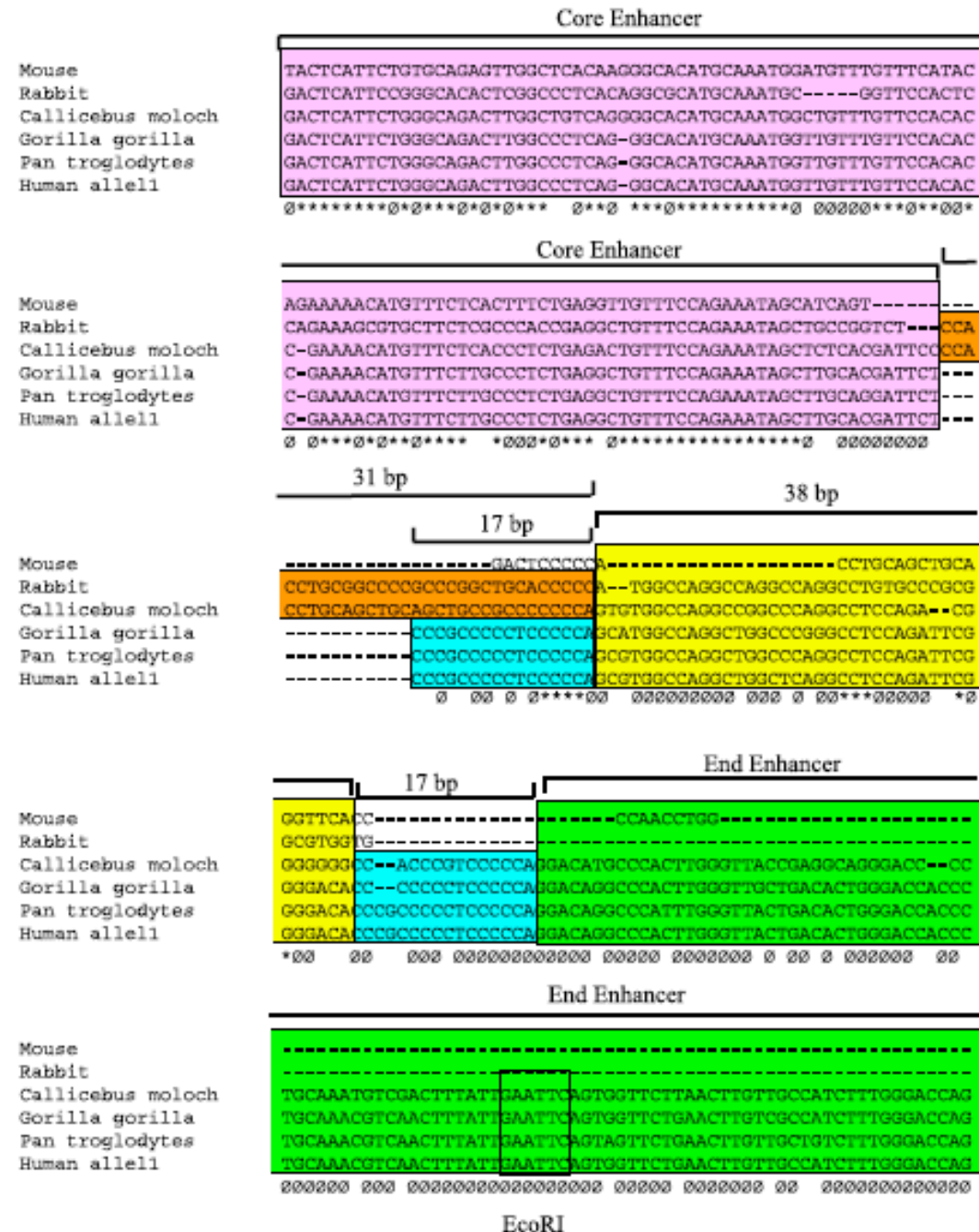
TOR VERGATA

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]

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

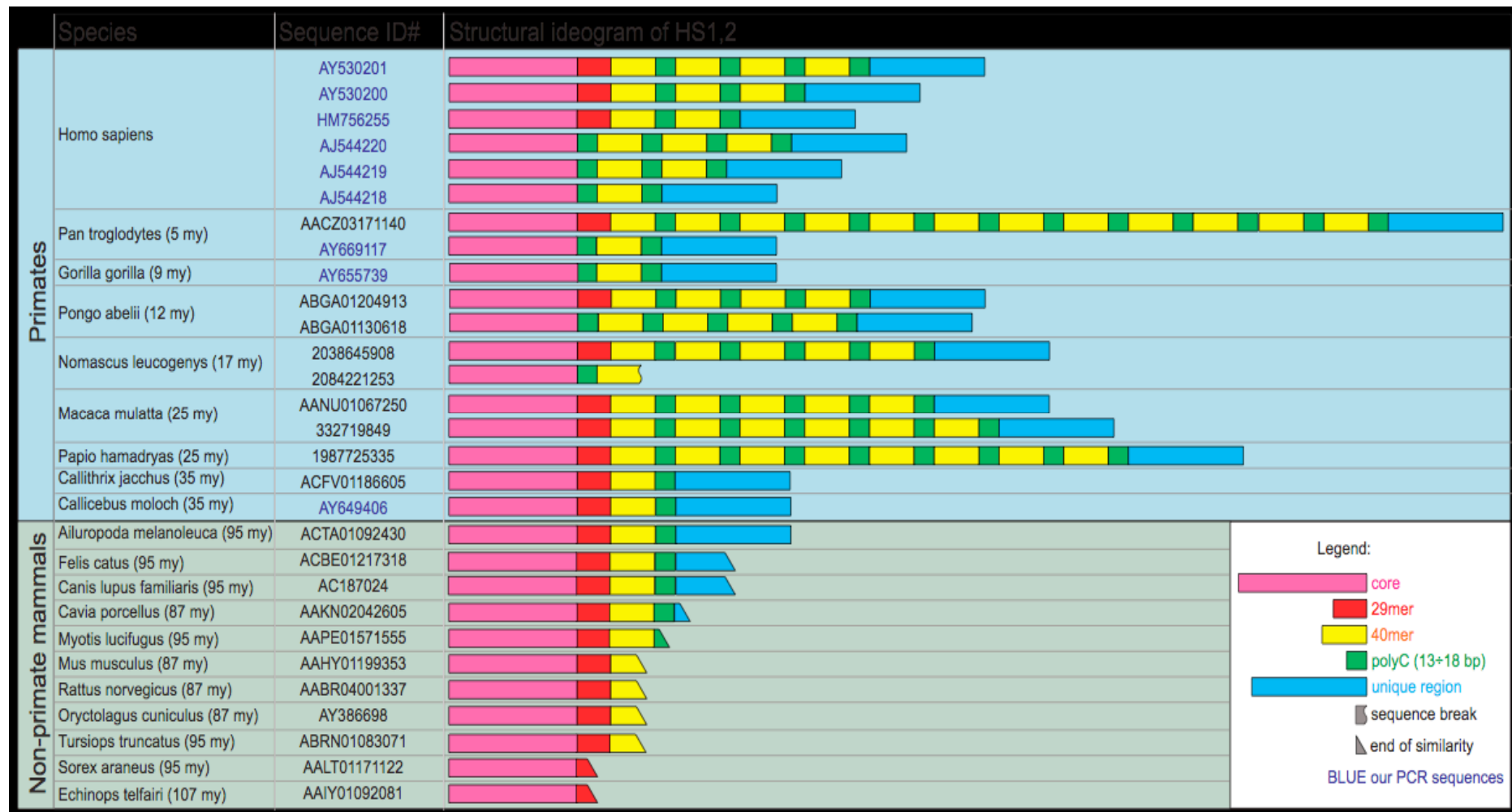
EMSA electrophoretic mobility shift assay:

- 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

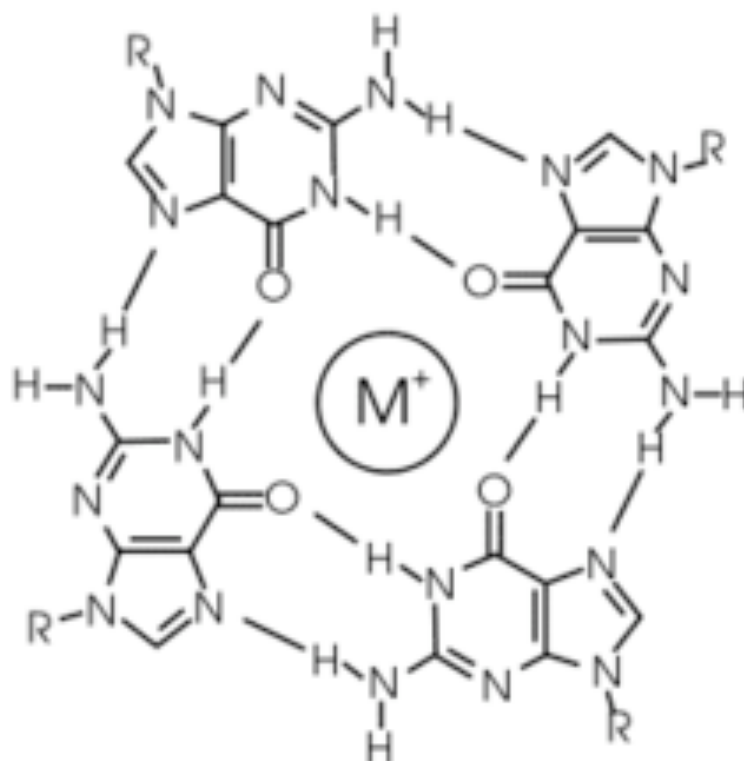
Il polimorfismo dell'enhancer hs1.2



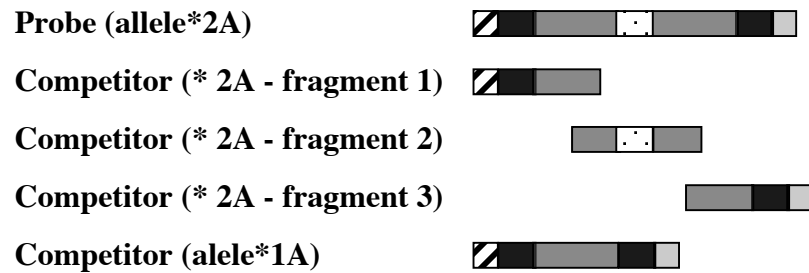
Dai genomi completi in bd: sono presenti a partire dai primati



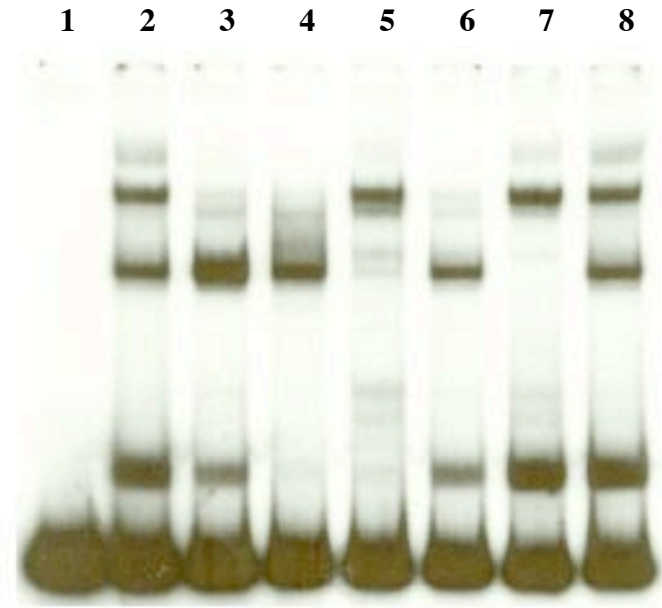
modello tetraplex



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) *

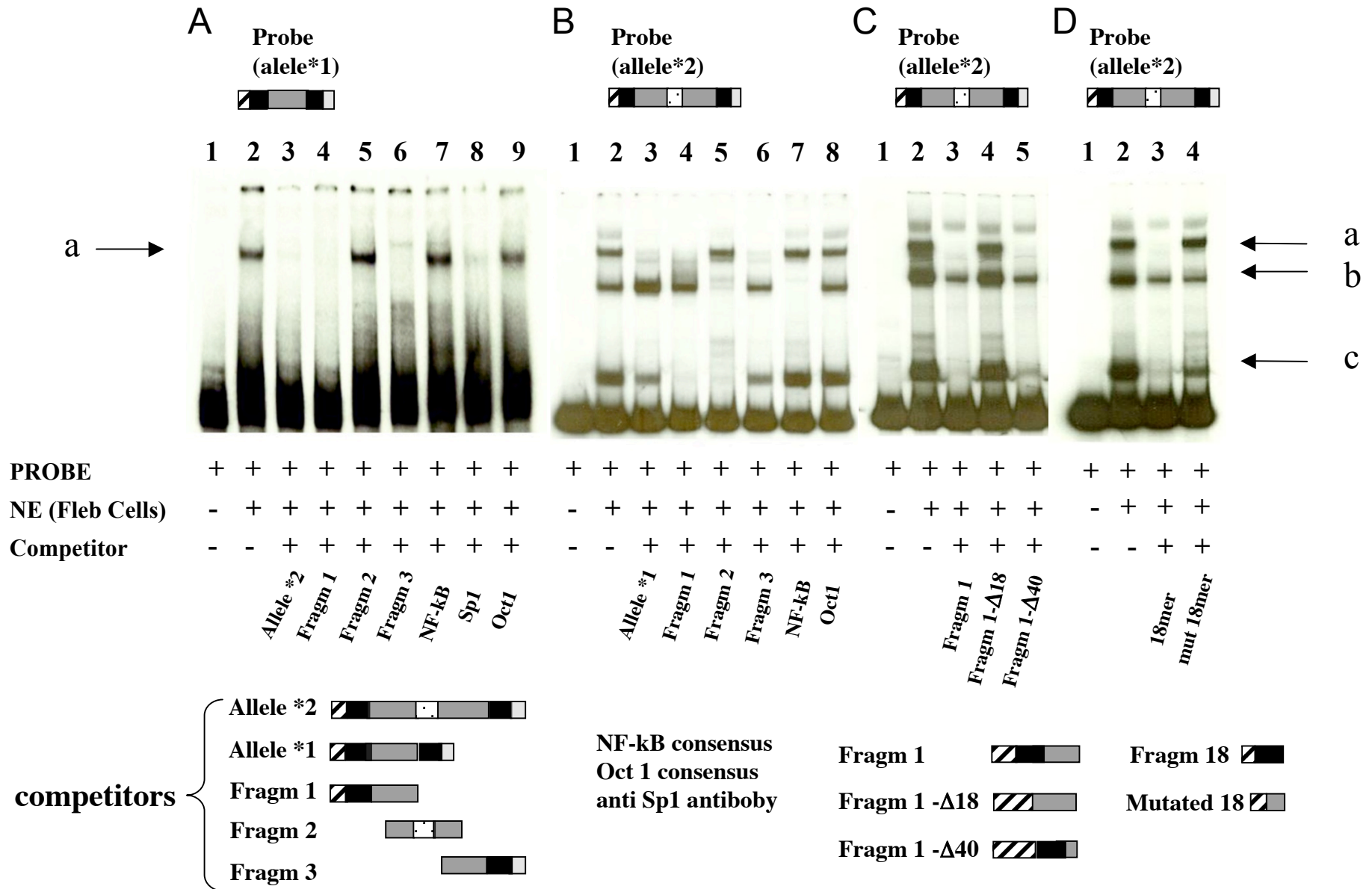
frgm 2 comp C (+D) ≈ NF-kB *

frgm 3 “ B (-D) *

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

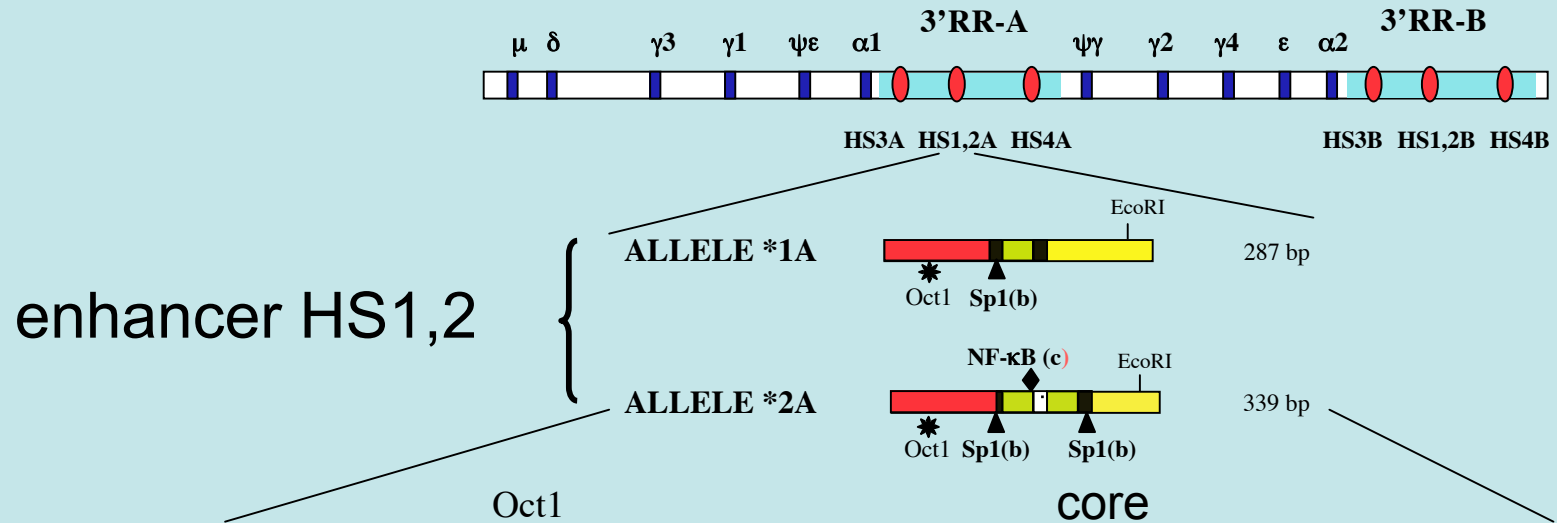
EMSA electrophoresis mobility shift assay with allele *1 and *2

DNA binding experiment with nuclear proteic extracts

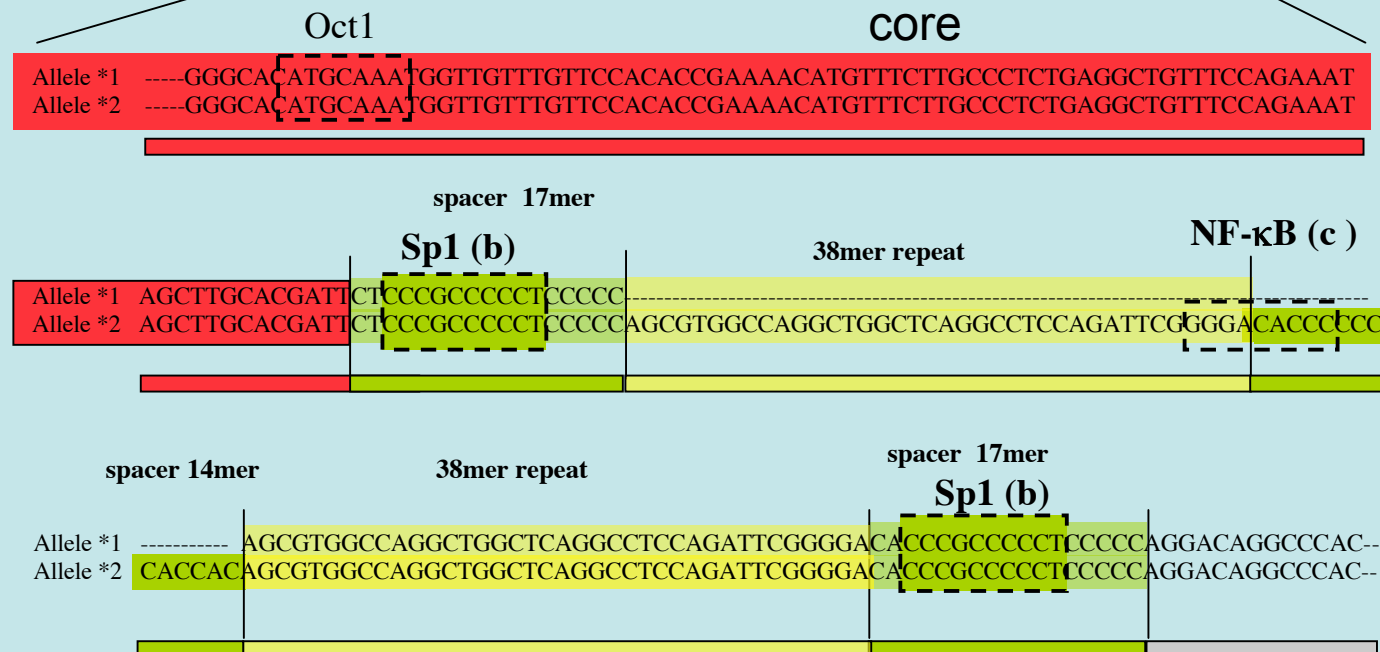


Consensus for Sp1 and NF-κB in HS1,2-A allele*1 and *2

A



B





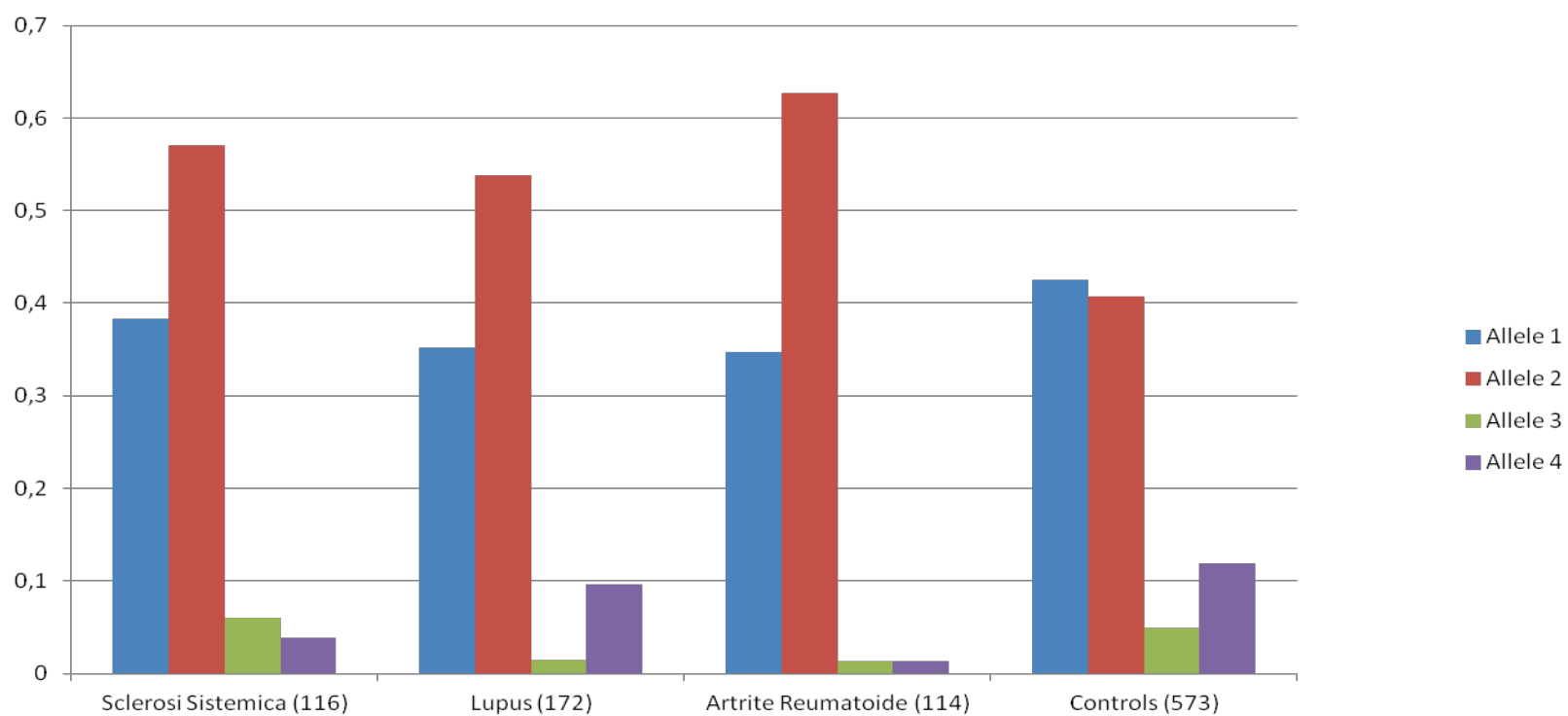
associazione con patologie autoimmuni dell'enhancer hs1.2

Analisi su pazienti con Sclerosi sistemica
Artrite reumatoide
Lupus eritematoso

I associazione con aumento della frequenza dell'allele *2
nei pazienti con queste patologie

Il associazione tra soggetti con livelli alti di IgM del siero e
l'allele *2

patologie autoimmuni



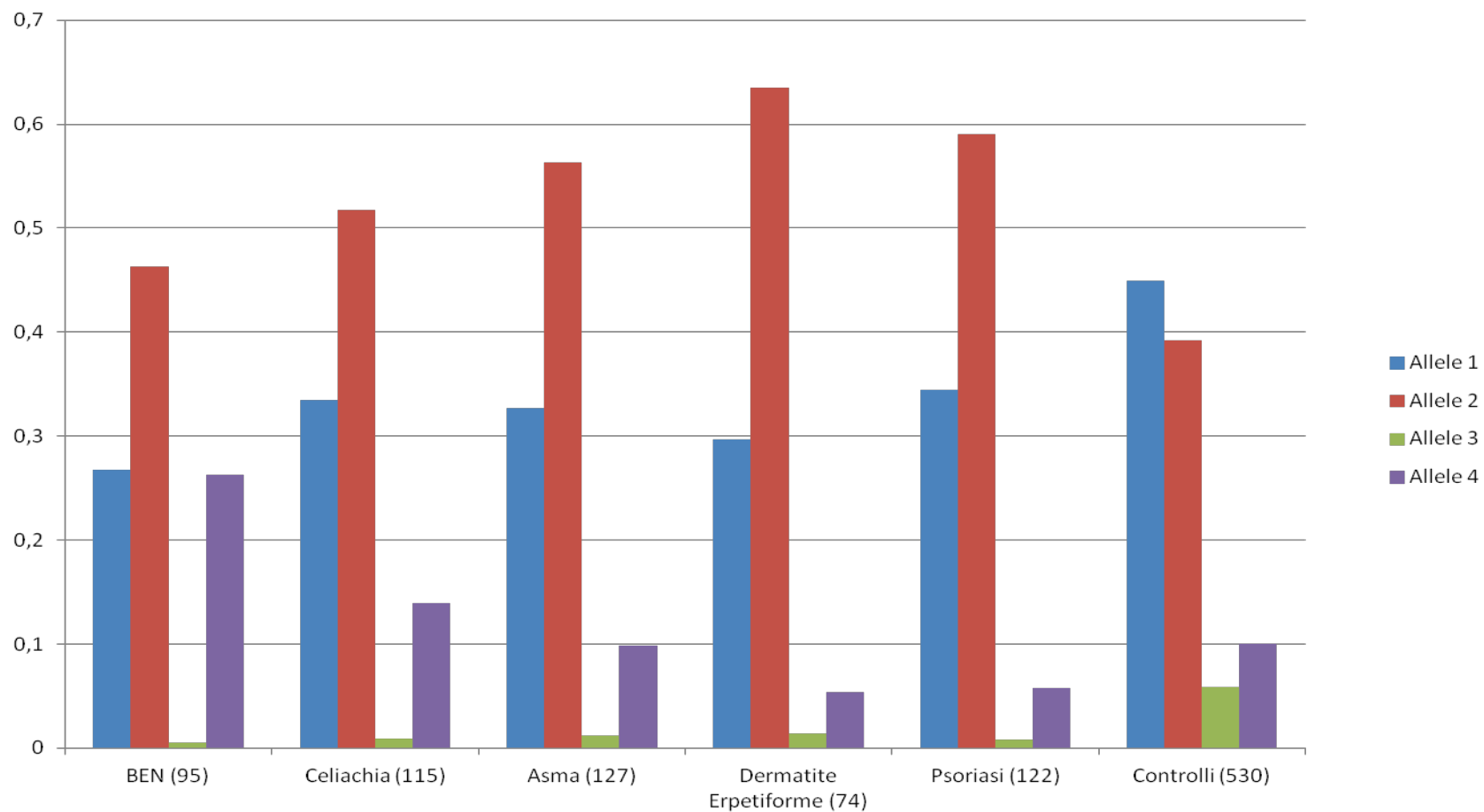
associazione con patologie immuno- infiammatorie

Analisi su pazienti con : celiachia
psoriasi
dermatite erpetiforme
nefropatia balcanica cronica
asma

L'infiammazione fa parte della cronicità di queste patologie

Asma e Psoriasi mostrano correlazione tra livelli di Ig del siero e frequenza dell'allele *2 dell'enhancer hs1.2

associazione con infiammazione



Vaccinazioni I



2 coorti indipendenti vaccinati con antigeni diversi

I coorte di 193 bambini di età sotto 5 anni

Vaccinati per antigene influenzale H1N1

H2N3

B

II coorte 392 studenti del PTV di età sopra 20 anni

Vaccinati contro HBV (virus epatite B)

Analisi della risposta: quantità di antigeni specifici

non correla con le frequenze alleliche di hs1.2

Vaccinazioni II

I soggetti con risposta alta media o bassa alla vaccinazione non correlano con le frequenze alleliche di hs1.2

I soggetti vaccinati con livelli totali di Ig del siero alti medi o bassi correlano come nelle patologie con hs1.2

Le frequenze alleliche nei soggetti con livelli di Ig alti medi o bassi si differenziano ulteriormente



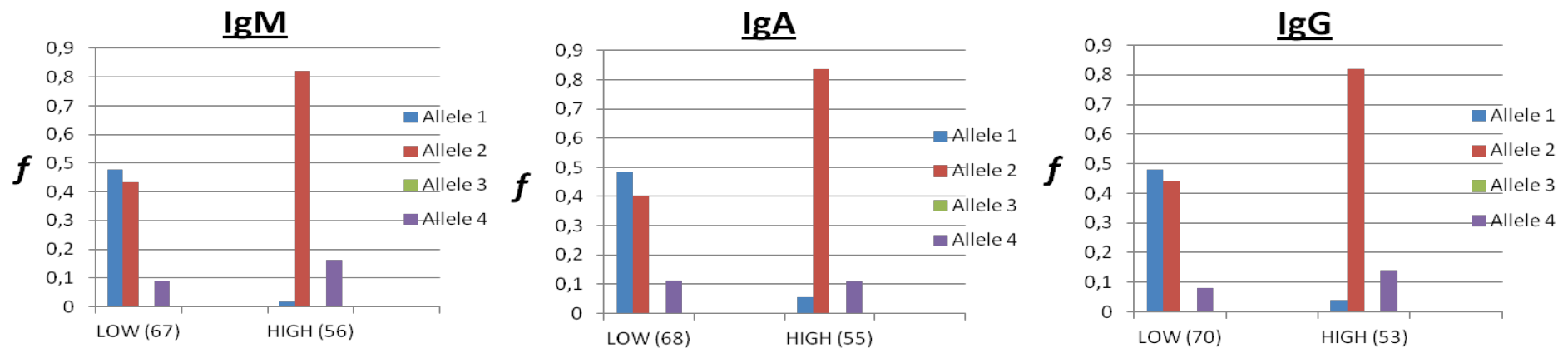
TOR VERGATA

Vaccinazioni III



I soggetti con Ig alte medie e basse a confronto:
le frequenze alleliche di hs1.2 nei bambini e soggetti adulti

Età 3-5 anni maggiore copertura con allele *2 ?



Età 21-26 anni

