

Lezione XXXIX-XXXX

martedì 12-1-2012

corso di genomica

laurea magistrale Biotecnologia
Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

Esami 31- gennaio 2012

7- febbraio 2012

28 - febbraio 2012

D. Frezza

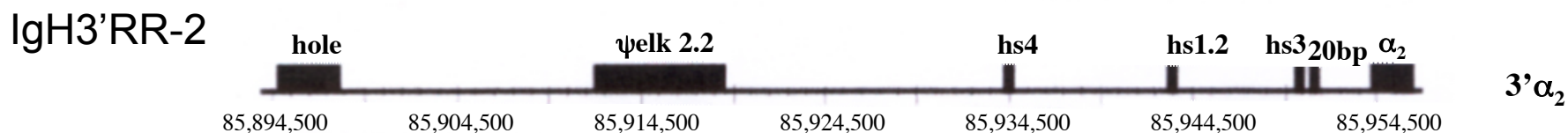
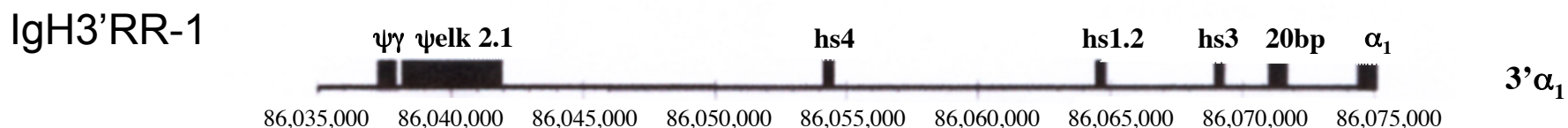
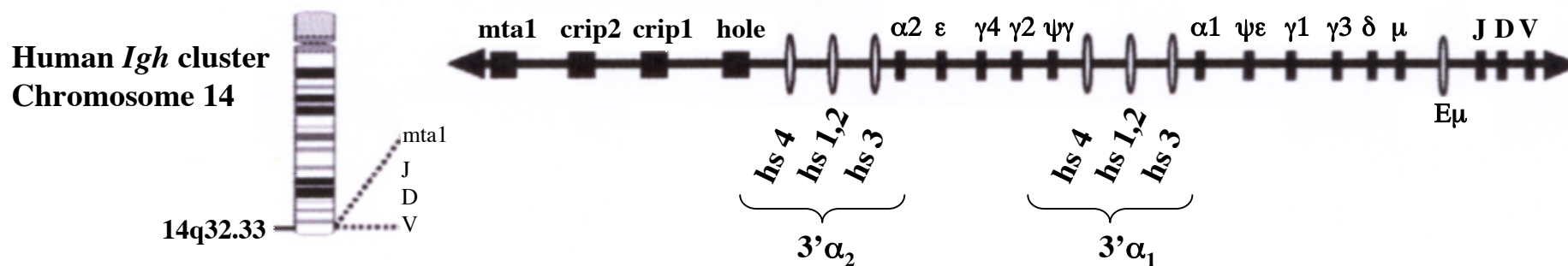
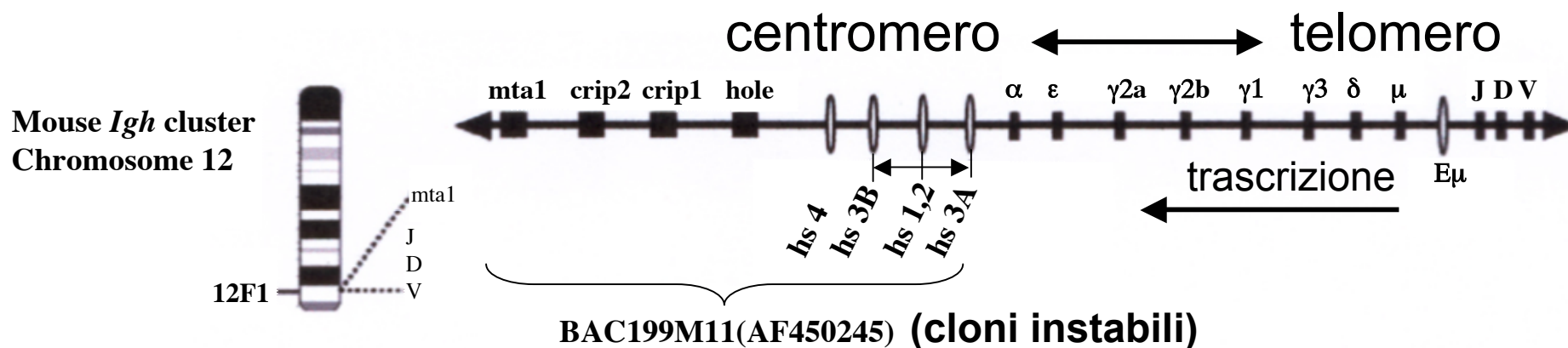
Estrazione del DNA da Tampone orale

Protocollo e scopo dell'analisi dell'esercitazione

Descrizione della regione genetica da tipizzare

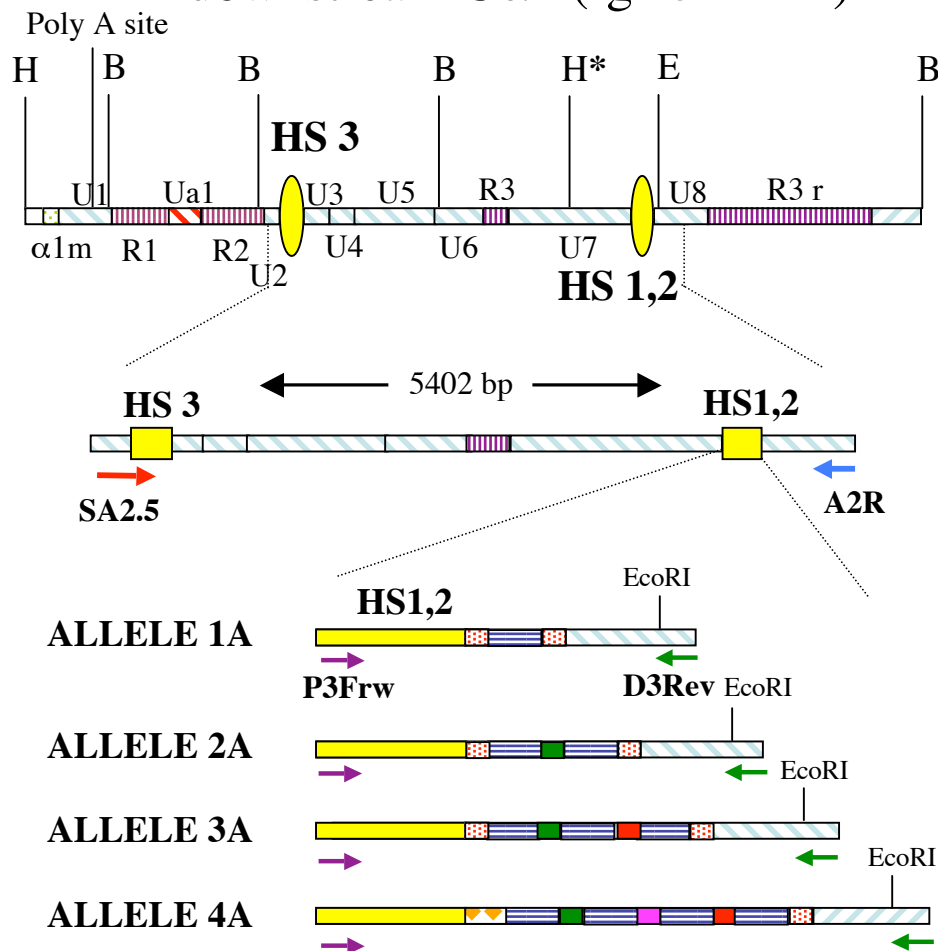
Analisi tramite PCR del polimorfismo della regione
regolativa della catena pesante delle Immunoglobuline

cluster Ig topo-uomo (duplicazione)



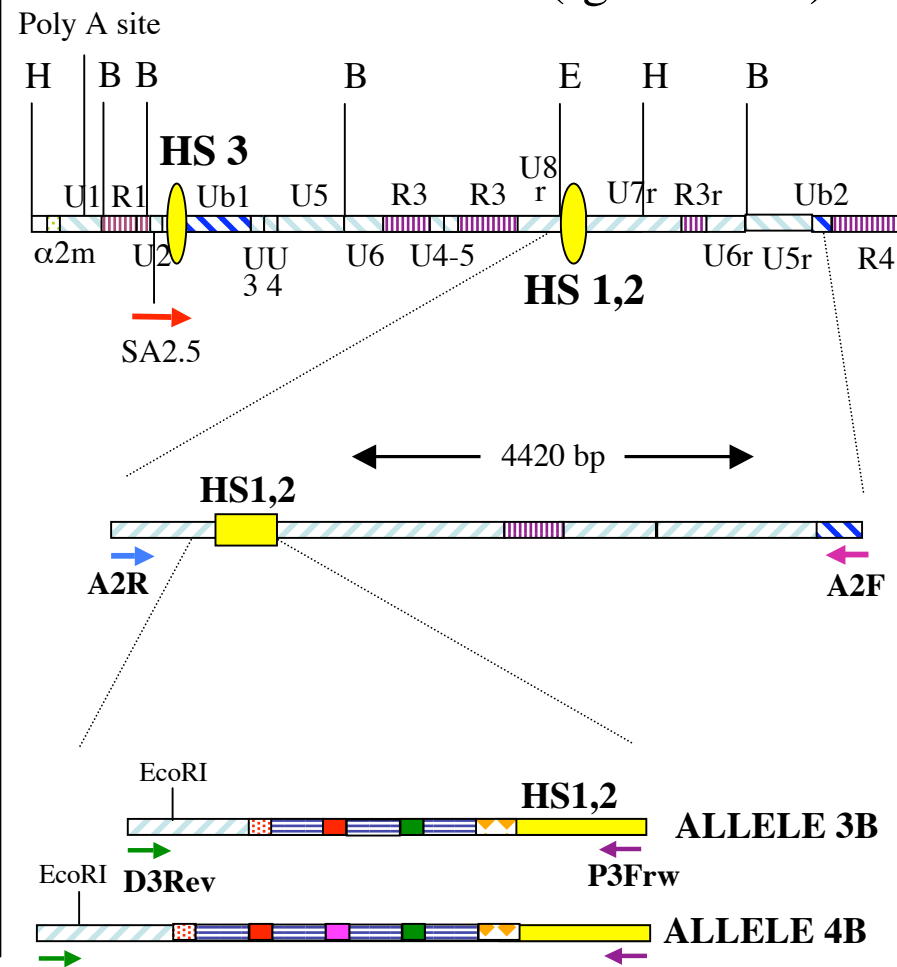
A

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

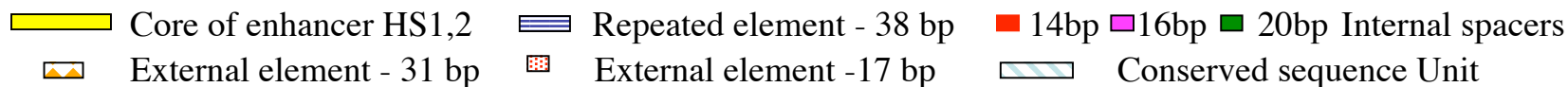


B

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



i polimorfismi

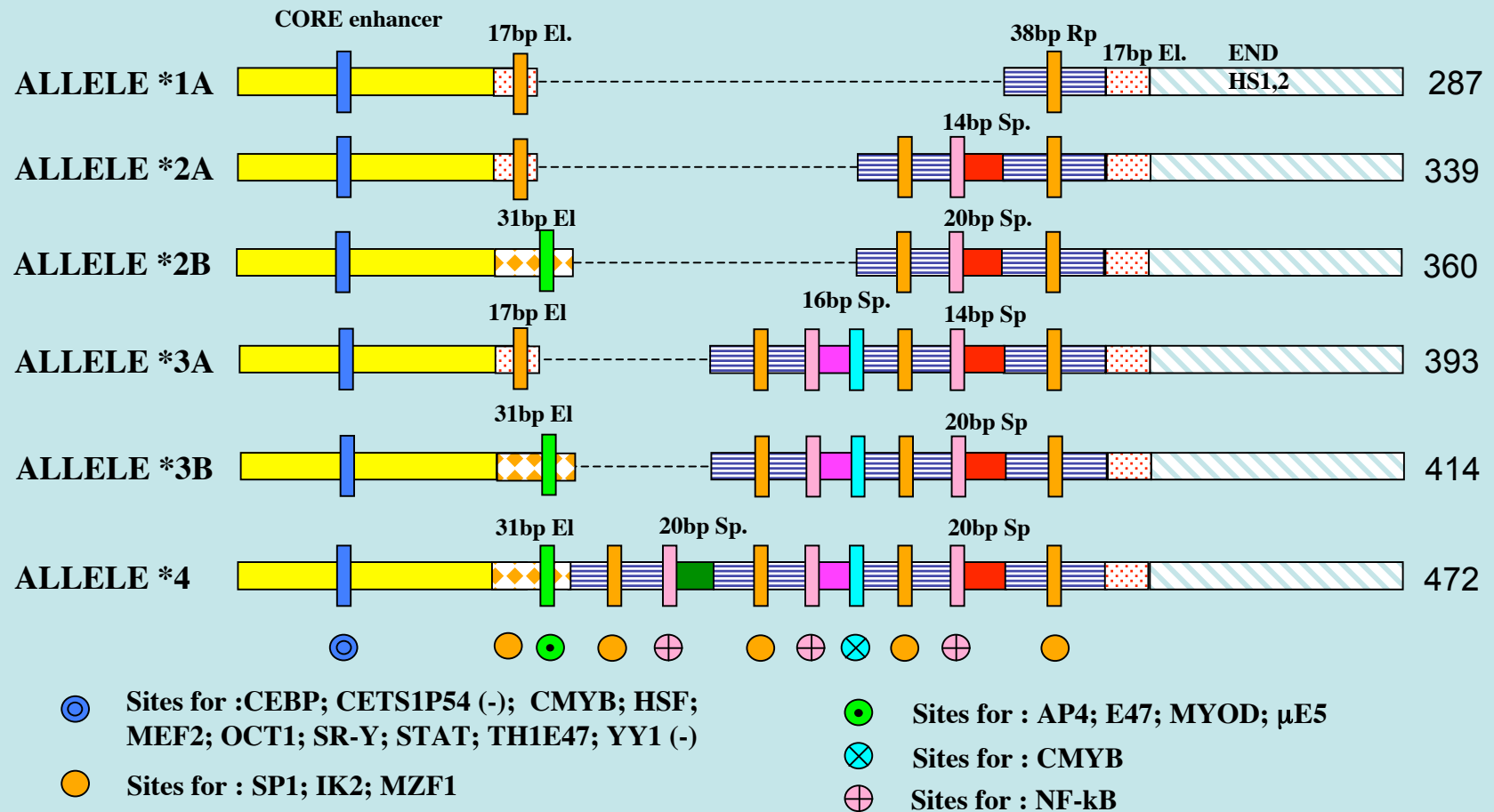




TOR VERGATA

6 alleli

Figure 3 polymorphism of HS1,2A



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

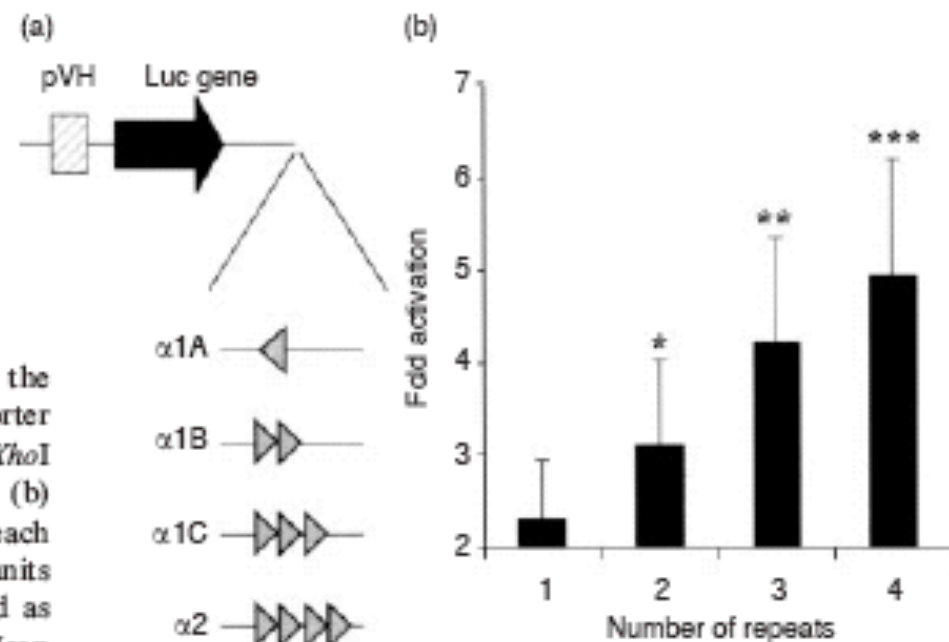
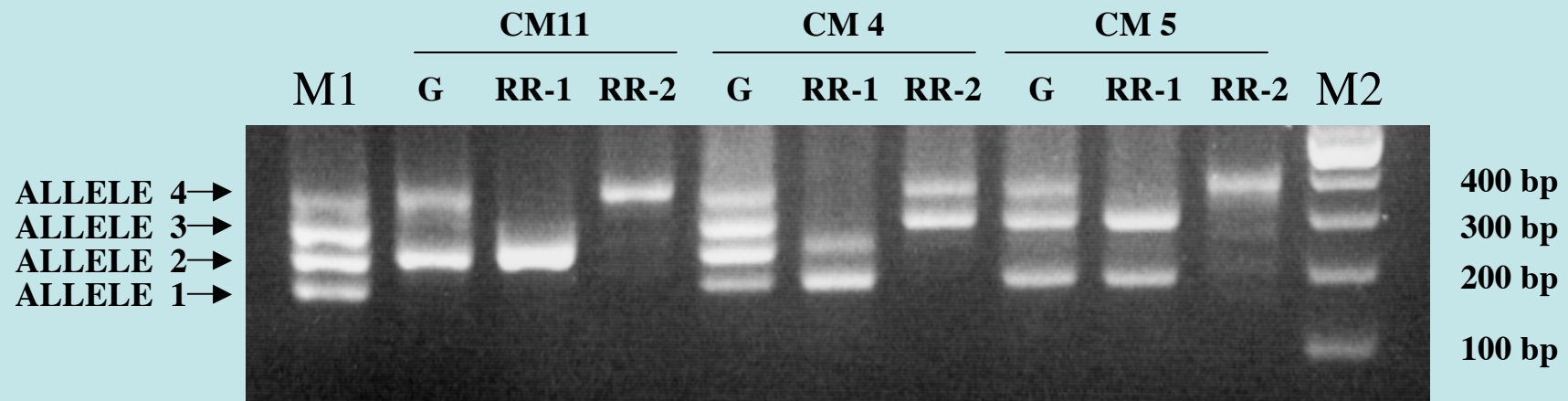


Figure 4. Transcriptional strength of the three PCR alleles of the $\alpha 1$ h1,2 enhancer and the $\alpha 2$ h1,2 allele in a luciferase gene reporter assay. (a) Construction: hs1,2 elements were cloned as *Bam*HI-*Xho*I fragments in *Bam*HI-*Sal*I sites of the pGL3-pVH vector. (b) Estimation of luciferase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

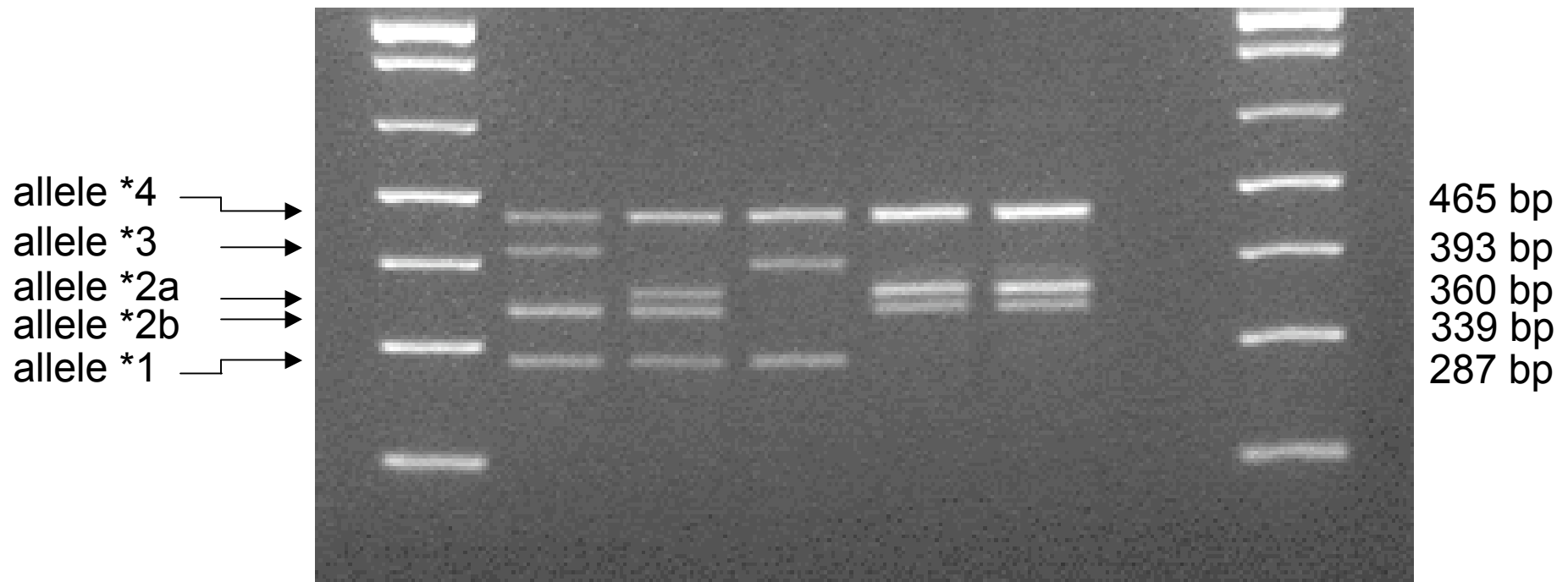


amplificazione G=genomica o selettiva RR-1; RR-2

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!



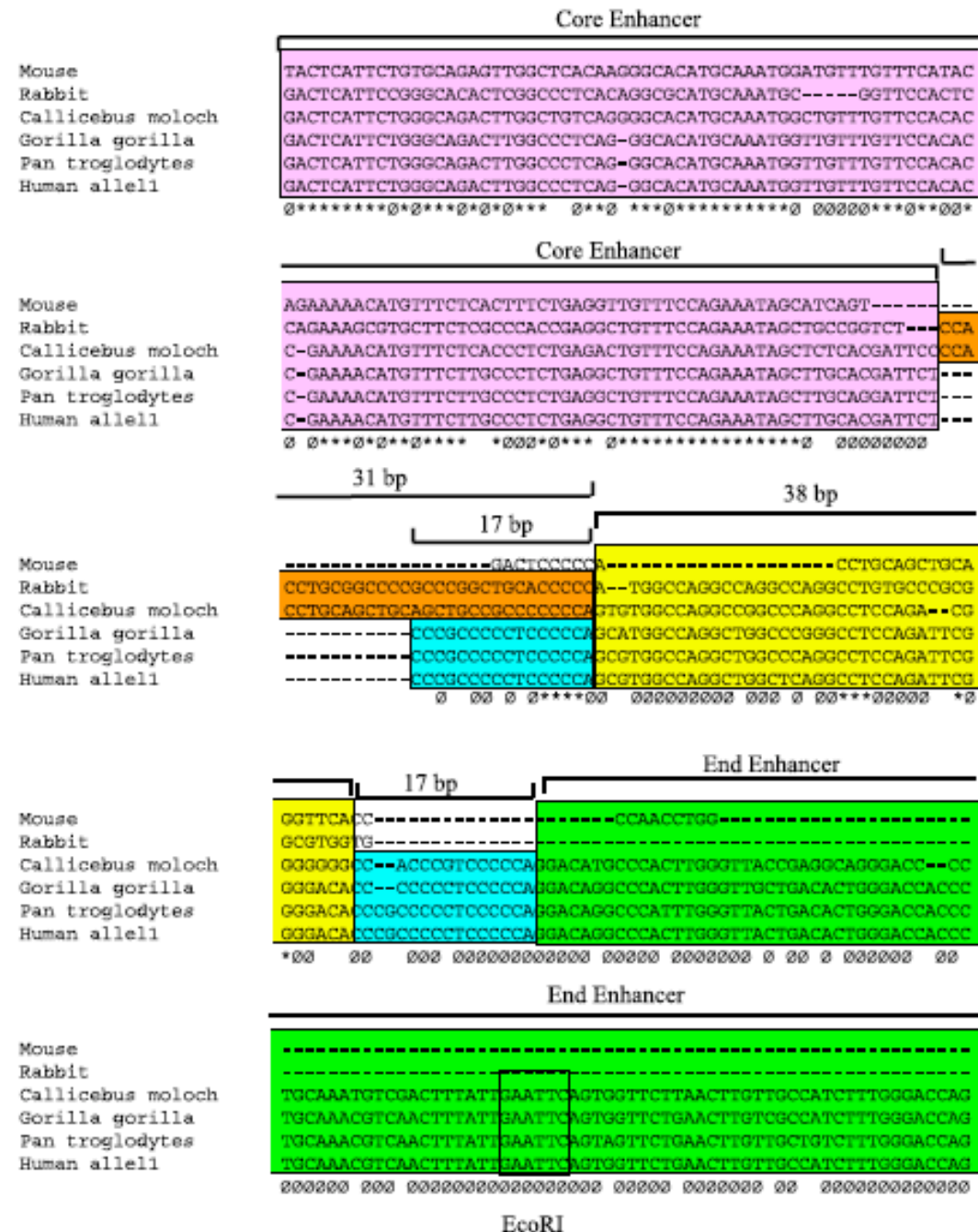
TOR VERGATA

allineamenti

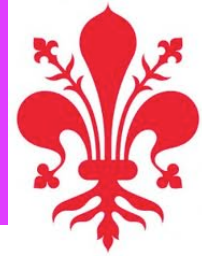
Evoluzione di HS1,2
in diverse specie di
mammifero e di primati

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

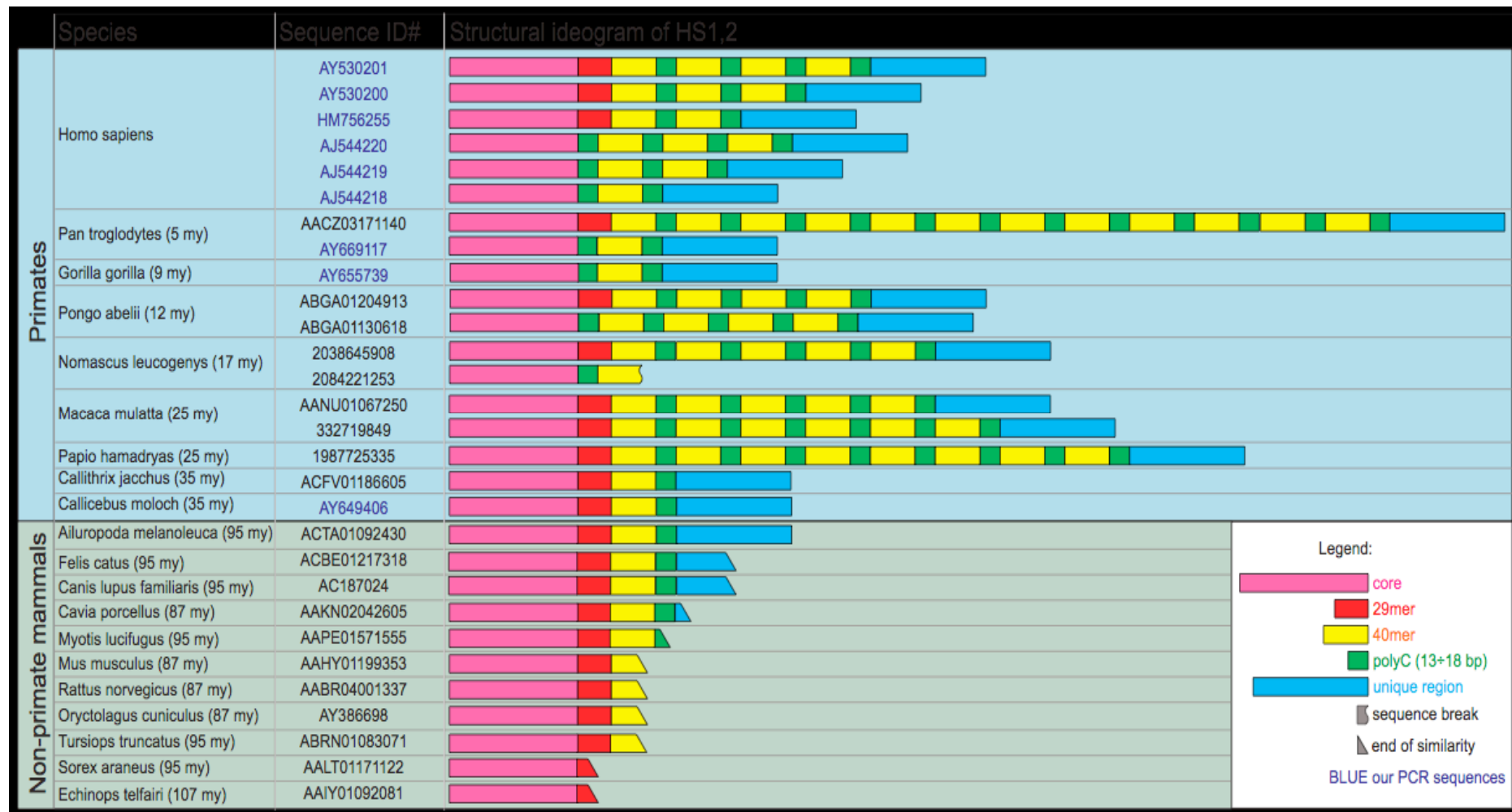
stiamo cercando di clonare
le forme polimorfiche di
altre specie (topo macaco,
scimpanzè) per confrontare
la funzionalità in cellule di
topo e uomo



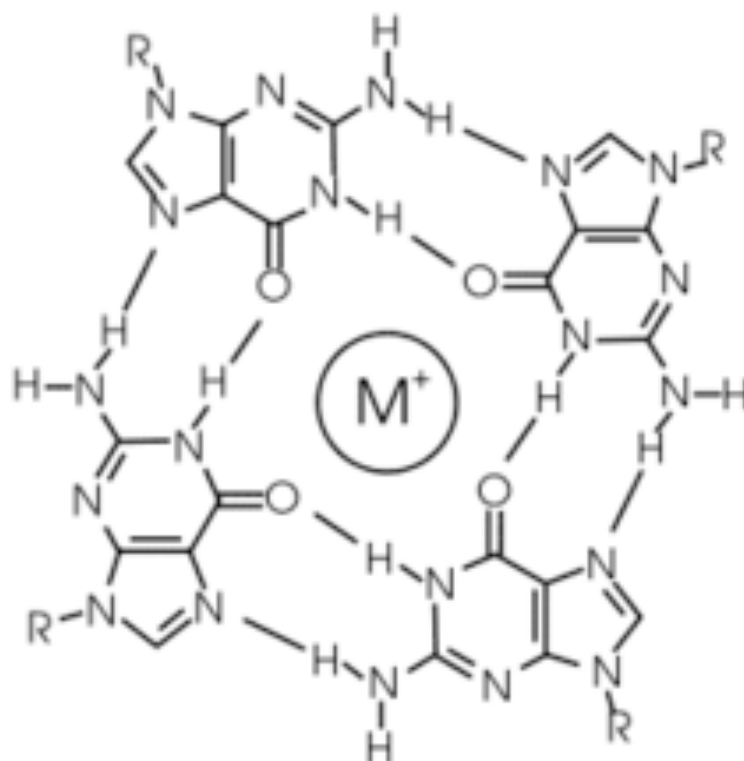
Il polimorfismo dell'enhancer hs1.2



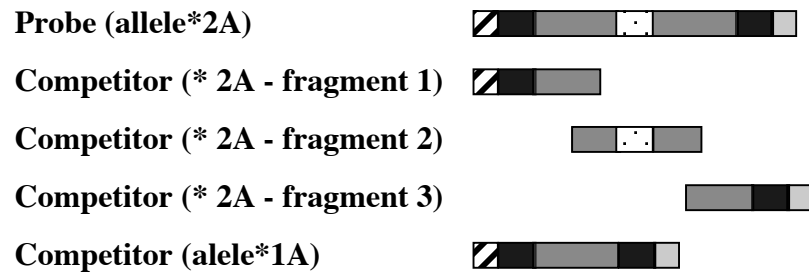
Dai genomi completi in bd: sono presenti a partire dai primati



modello tetraplex



mappatura tramite competizione con “gel shift” EMSA

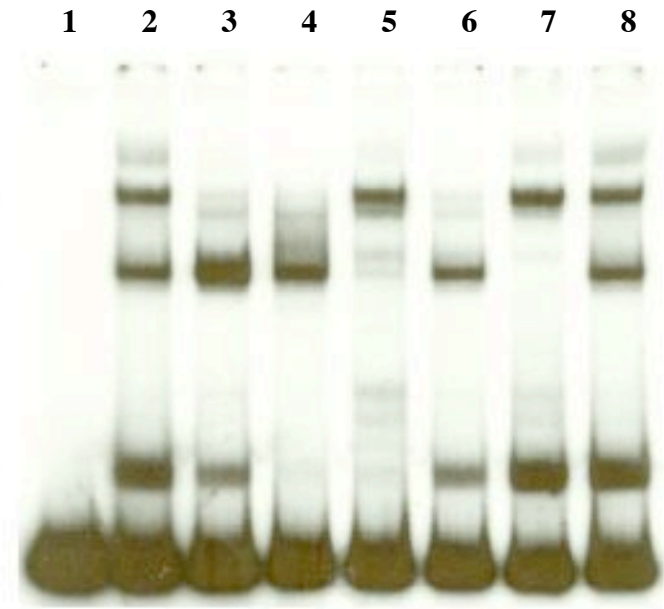


a →

b →

c →

d →



SP1 compete banda B *

NF-kB “ banda C *

frgm 1 ≈ allele *1A comp B (+D) *

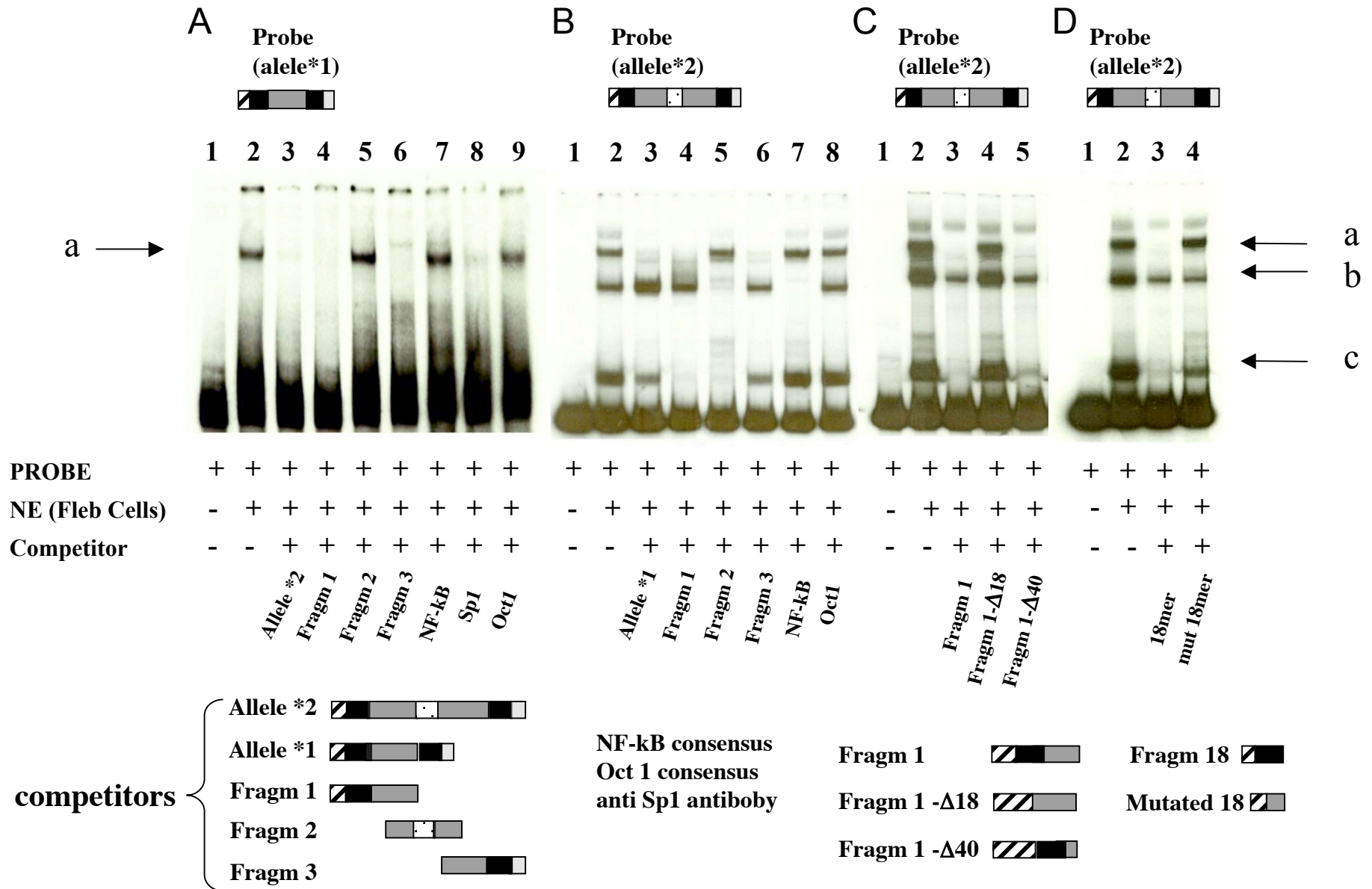
frgm 2 comp C (+D) ≈ NF-kB *

frgm 3 “ B (-D) *

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

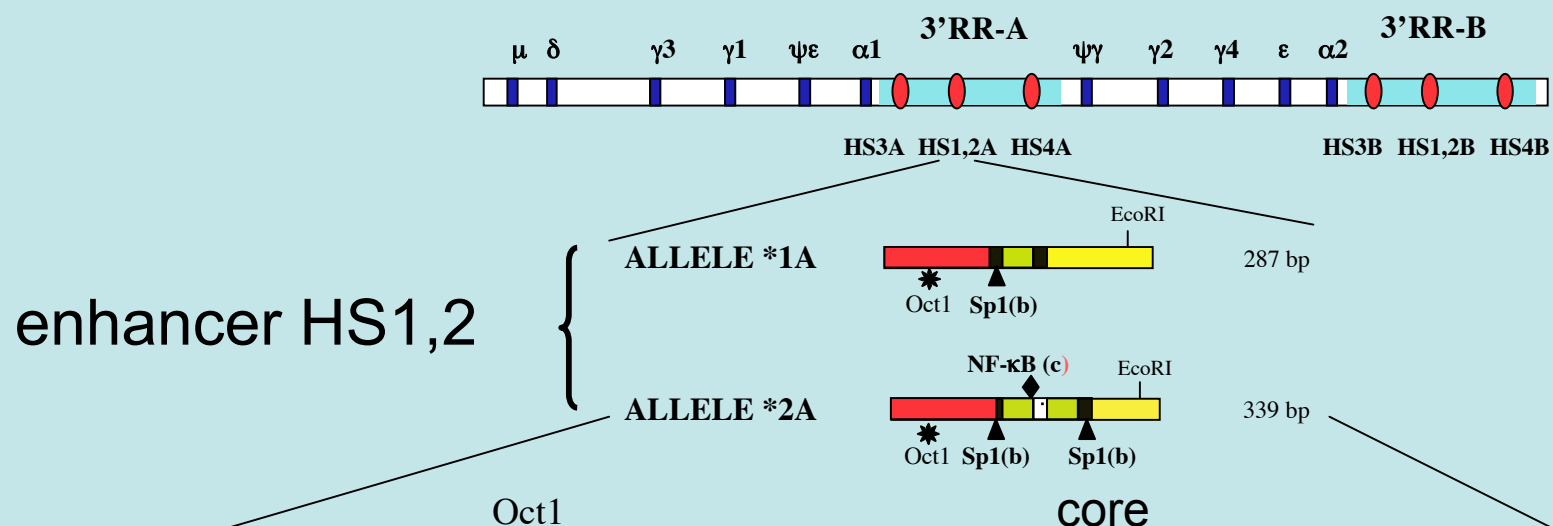
EMSA electrophoresis mobility shift assay with allele *1 and *2

DNA binding experiment with nuclear proteic extracts

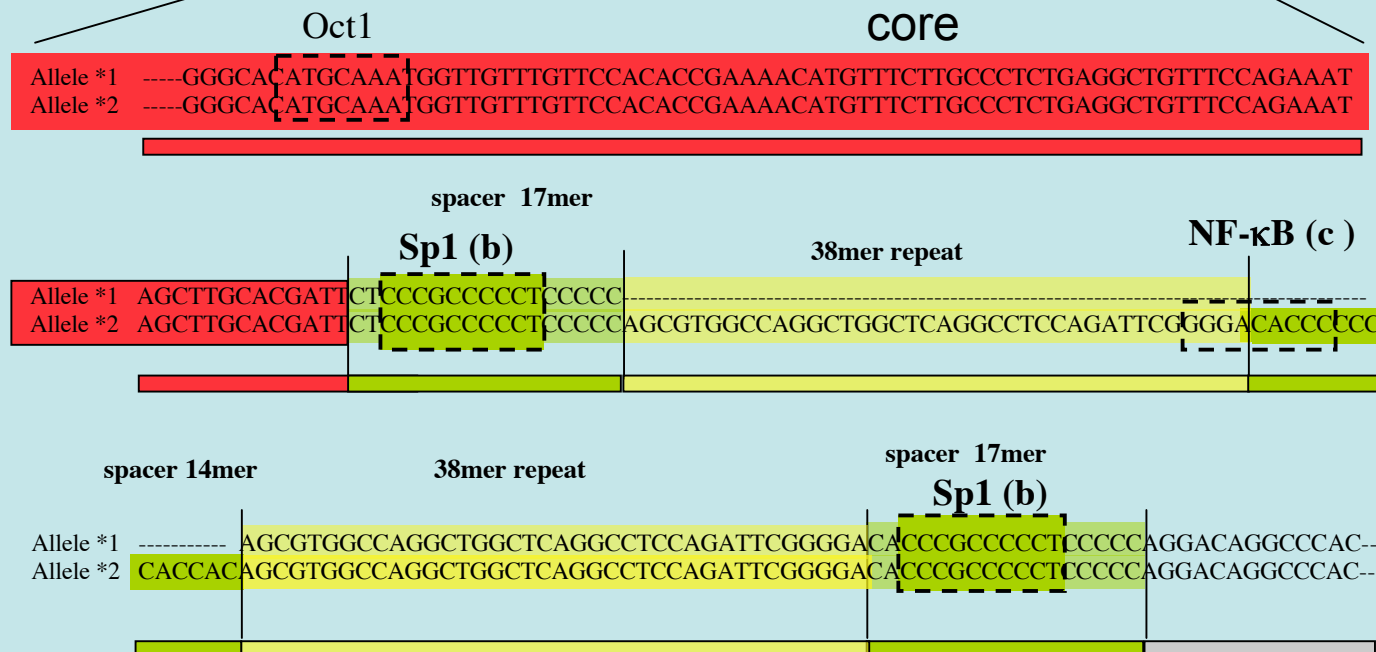


Consensus for Sp1 and NF-κB in HS1,2-A allele*1 and *2

A



B





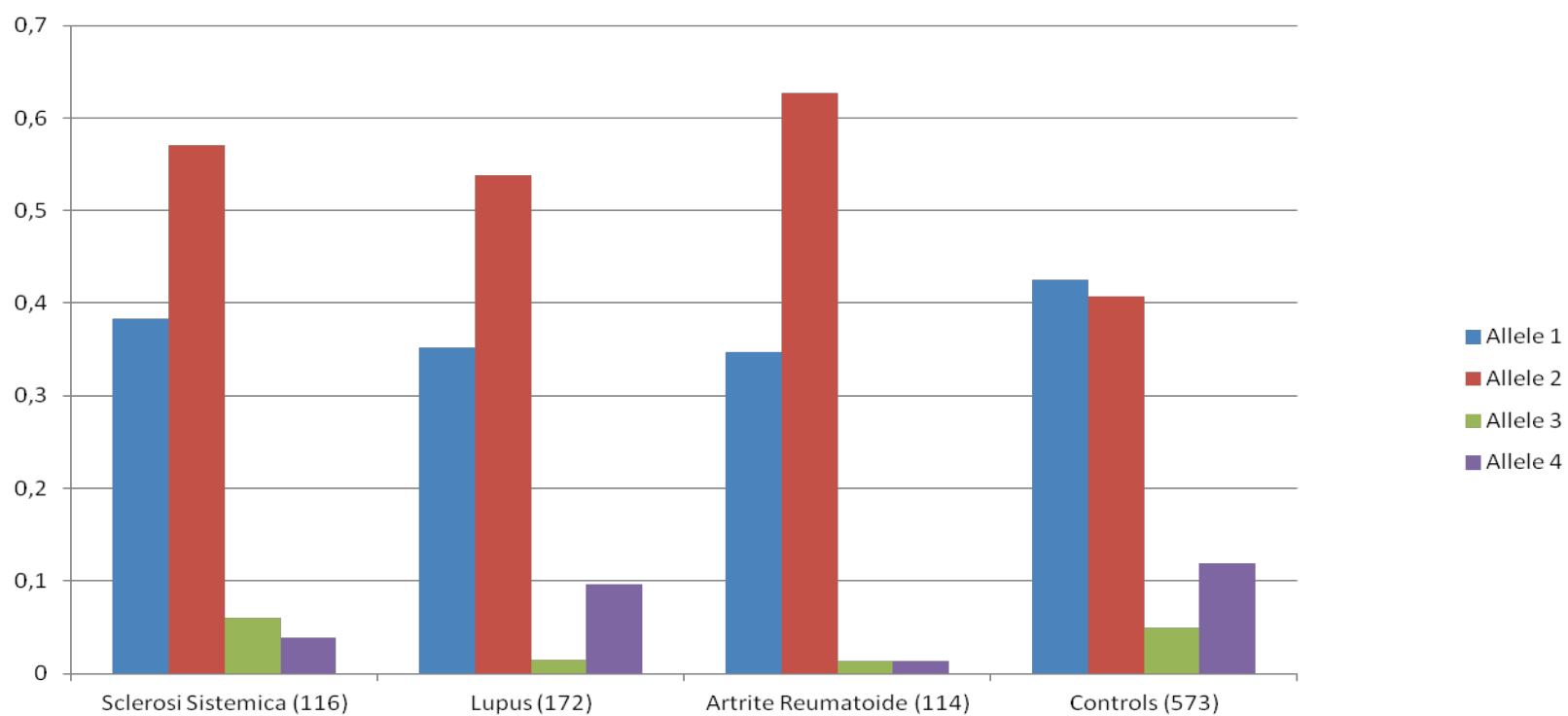
associazione con patologie autoimmuni dell'enhancer hs1.2

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



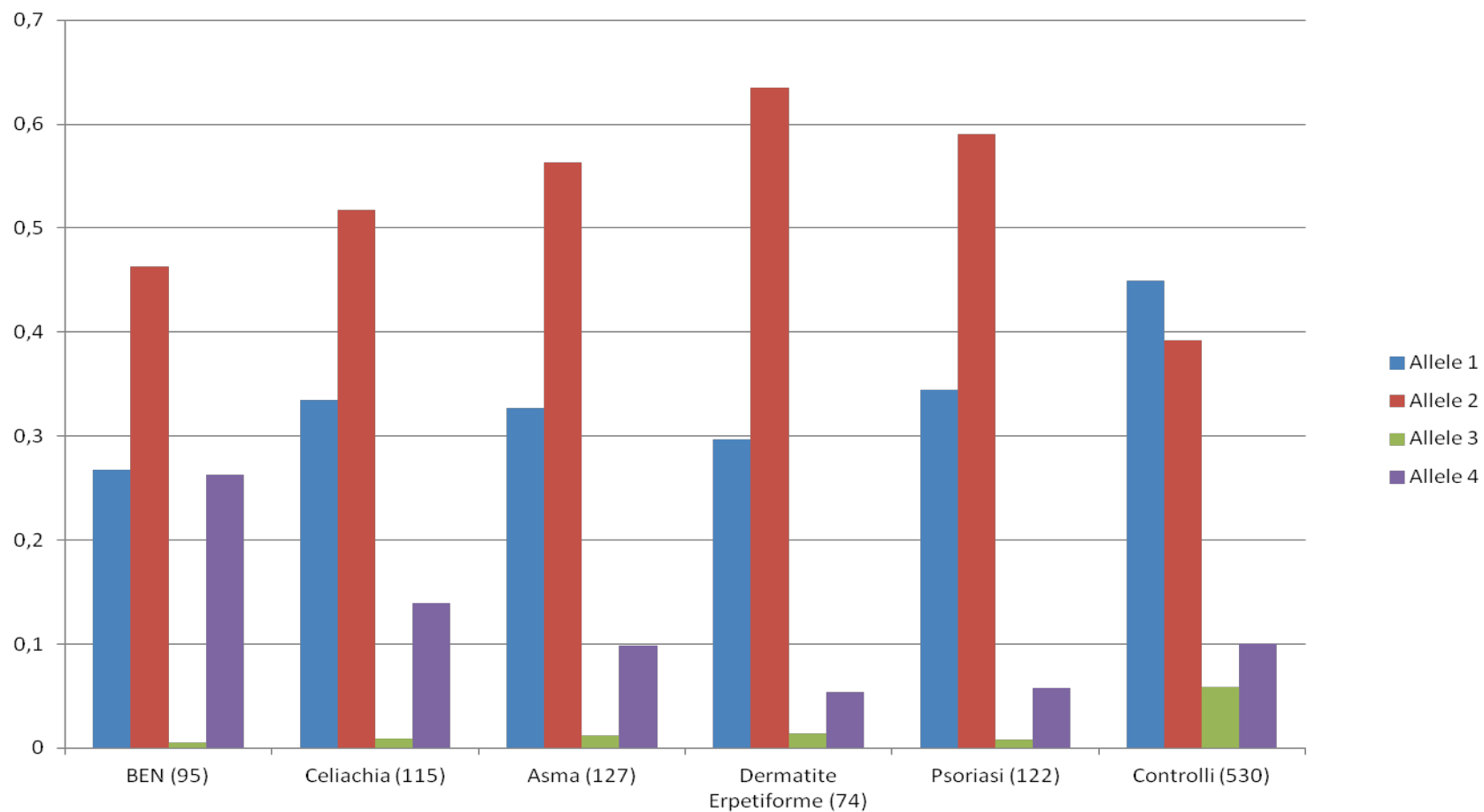
associazione con patologie immuno- infiammatorie

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

Vaccinazioni III

<i>f</i>	H1N1		
	NR	R	HR
ALLELE *1	0,341 ± 0,05	0,371 ± 0,04	0,258 ± 0,03
ALLELE *2	0,523 ± 0,05	0,536 ± 0,04	0,617 ± 0,04
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,136 ± 0,03	0,093 ± 0,02	0,125 ± 0,03

<i>f</i>	IgM		
	LOW	MEDIUM	HIGH
ALLELE *1	0,478 ± 0,04	0,411 ± 0,04	0,018 ± 0,01
ALLELE *2	0,433 ± 0,04	0,478 ± 0,04	0,821 ± 0,04
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,089 ± 0,02	0,112 ± 0,03	0,161 ± 0,03
TOTAL	67	67	56

<i>f</i>	H3N2		
	NR	R	HR
ALLELE *1	0,297 ± 0,05	0,315 ± 0,04	0,347 ± 0,03
ALLELE *2	0,581 ± 0,05	0,585 ± 0,04	0,528 ± 0,04
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,122 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,125 ± 0,02

<i>f</i>	IgG		
	LOW	MEDIUM	HIGH
ALLELE *1	0,479 ± 0,04	0,373 ± 0,04	0,038 ± 0,02
ALLELE *2	0,443 ± 0,04	0,485 ± 0,04	0,821 ± 0,04
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,079 ± 0,02	0,142 ± 0,03	0,141 ± 0,03
TOTAL	70	67	53

<i>f</i>	B		
	NR	R	HR
ALLELE *1	0,312 ± 0,06	0,341 ± 0,03	0,308 ± 0,04
ALLELE *2	0,584 ± 0,07	0,541 ± 0,03	0,577 ± 0,04
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,104 ± 0,04	0,118 ± 0,02	0,115 ± 0,02

<i>f</i>	IgA		
	LOW	MEDIUM	HIGH
ALLELE *1	0,485 ± 0,04	0,366 ± 0,04	0,055 ± 0,02
ALLELE *2	0,404 ± 0,04	0,5 ± 0,04	0,836 ± 0,03
ALLELE *3	0	0	0
ALLELE *4	0,111 ± 0,03	0,134 ± 0,03	0,109 ± 0,03
TOTAL	68	67	55



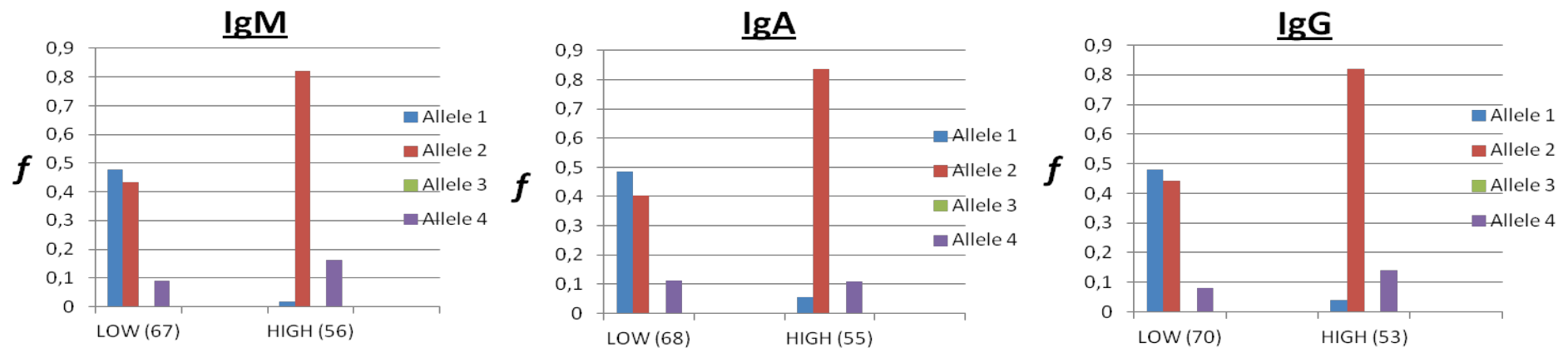
TOR VERGATA

Vaccinazioni IV

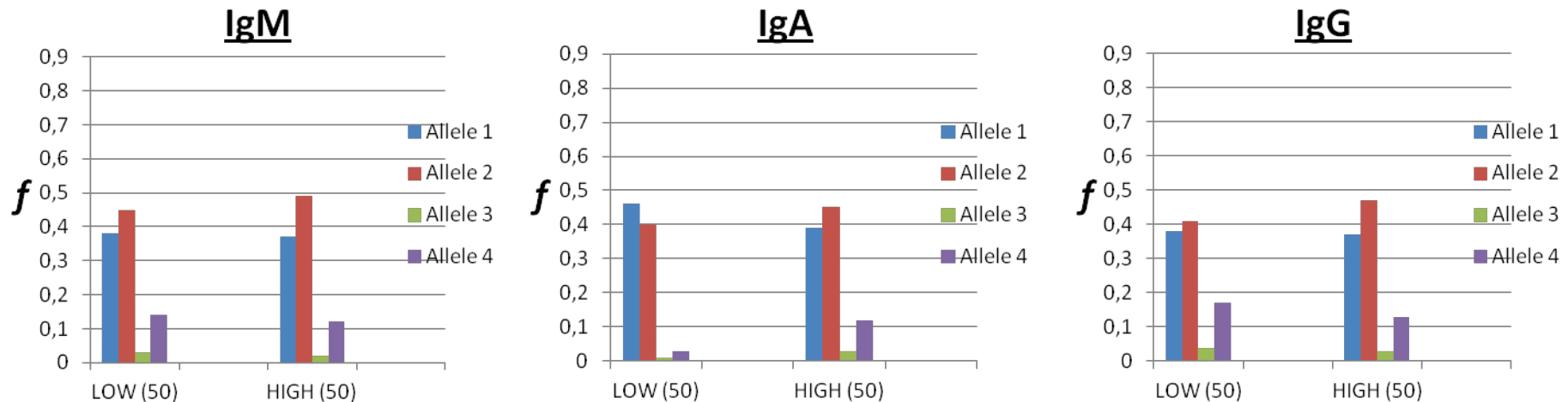


I soggetti con Ig alte medie e basse a confronto:
le frequenze alleliche di hs1.2 nei bambini e soggetti adulti

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



Età 21-26 anni



Metodo di estrazione con kit “Qiagen”

QIAamp PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DA TAMPONE

Mettere il cotone in una provetta da 1.5 ml;

In una Falcon aggiungere:

- 400 µl di **PBS** per campione (usare p1000)
- 20 µl di **Proteinasi K** per campione (usare p200)

Aggiungere 400 µl (p1000) di **BUFFER AL** per campione e agitare le provette per 15 secondi;

Incubare a 56°C per 10 minuti (lisi);

Centrifugare (short spin) le provette;

Strizzare il cotone e aggiungere 400 µl (p1000) di **ETANOLO assoluto** ed agitare le provette (A) per 15 secondi;

Centrifugare (short spin) le provette (A);

Protocollo estrazione II

Mettere la colonnina GD (con filtro) dentro una nuova provetta da 2 ml (B);

Trasferire 700 μ l (p1000) della mix dalla provetta (A) nella colonnina sulla provetta (B) senza bagnare il bordo;

Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;

Eliminare l'eluato e riposizionare la colonnina nella provetta;

Ripetere l'operazione per recuperare la mix rimanente;

Eliminare l'eluato;

Aggiungere 500 μ l (p1000) di **BUFFER AW1** alla colonnina (I lavaggio);

Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;

Eliminare la provetta da 2 ml e mettere la colonnina in una nuova provetta da 2ml;

Aggiungere 500 μ l (p1000) di **BUFFER AW2** alla colonnina (II lavaggio);

Centrifugare a 14.000 rpm per 3 minuti;

Trasferire la colonnina in una nuova provetta da 2 ml e centrifugare a piena velocità per 1 minuto (III lavaggio);

Protocollo estrazione III

Trasferire la colonnina in un nuova provetta da 1.5 ml;

Aggiungere 150 μ l (p200) di **BUFFER AE** alla colonnina e incubare a T ambiente per 1 minuto (eluizione DNA);

Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;