

Lezione VII-IIX

giovedì 20-X-2011

corso di genomica

laurea magistrale Biotecnologia
Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

non ci sarà lezione martedì 1 e giovedì 3 Novembre

D. Frezza

due nuove evidenze

- 1) si rinforza l'ipotesi che i geni attivati si muovono verso siti di trascrizione preassemblati
- 2) la sistemazione di condivisione della "factory" tra Myc e IgH è preferenziale
- 3) controllo: la colocalizzazione con geni casuali era bassa

Considerando il volume del nucleo e del segnale FISH la p di overlap di due segnali è $1/1500$, considerando solo 200 siti di trascrizione x nucleo nella B cell, la p che Myc sia casualmente nella TF con IgH è di $1/100$ - la p osservata è molto maggiore: c'è associazione preferenziale

- Myc è traslocato nel 80% dei linfomi, la vicinanza nei TF favorisce la traslocazione?

associazione preferenziali di TF

Tecnica sperimentale enhanced 4C (e4C circularized 3C)

Identificare i partners preferenziali nelle TF con i loci Hbb ed Hba (α e β globina crms 11 e 7)

- associazione con centinaia di geni su altri crms x entrambe
- ci sono associazioni preferenziali
- l'analisi bioinformatica mostra che i geni individuati hanno % alta del motivo CACC nel promotore
- si tratta della consensus per il fattore eritroide Eklf Krupper-like
- selezionando tra il network individuato ci sono molti geni regolati da Klf1
- conclusione: è un metodo che individua i geni coregolati con Hbb, topi K0 Klf1 non producono emoglobina e muoiono d 14,5

TF specializzate

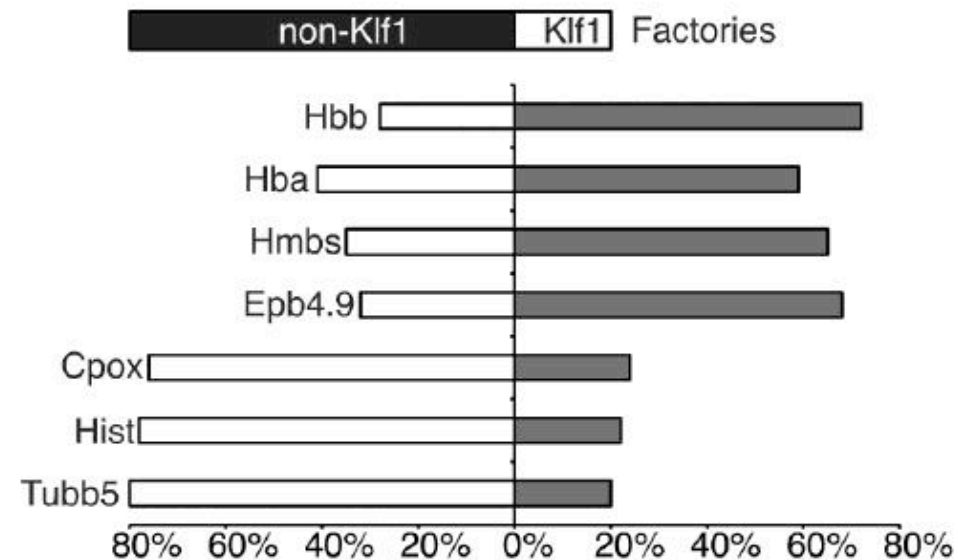
Immunofluorescenza di Klf1 (zink finger DNA binding prot.) in cell. precursori eritroidi

- maggior parte citoplasmatica,
- Klf1 nucleare è concentrata in pochi foci distinti
- doppia marcatura con RNAPII mostrano quasi totale overlap dei foci
- circa il 20% delle TF (30-40 /nucleo) sono arricchite con Klf1
- quanti geni Klf1 dipendenti stanno in queste TF?
- 60-80% degli alleli attivi Klf1 dipendenti (Hbb, Hba, Hmbs, Epb4.9) stanno nelle “factories” Klf1

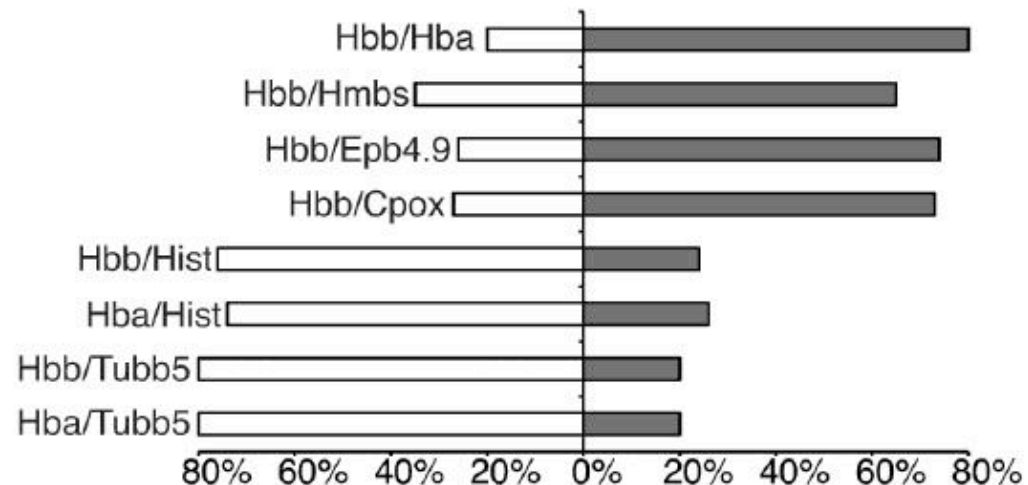
attività e colocalizzazione Fig. 1

A

Questo indica che geni Klf1 dipendenti hanno maggiore probabilità di trovarsi nelle TF con alti livelli di Klf1



B



evidenza dedotta

- la maggior parte degli alleli attivi dei geni Klf1 (DNA binding protein zink-finger) dipendenti stanno collocati nella minoranza delle TF (20%) con alti livelli di concentrazione di Klf1
- al contrario alleli attivi non regolati da Klf1 non hanno preferenze per TF
- eccezione per *Cpox* un enzima della biosintesi dell'eme parzialmente regolato da KIF1 distribuito in maniera random tra TF dipendenti e non da Klf1
- coppie di geni regolati da Klf1 con RNA-FISH (fig.1 B) colocalizzano, in particolare *Hbb-Cpox* colocalizza ed è un buon controllo, se fosse random si troverebbe con *Hbb* anche nelle TF non specializzate. Geni indipendenti non colocalizzano e non condividono le TF specializzate con Klf1

altre deduzioni su Klf1

La colocalizzazione dei geni Klf1 dipendenti in TF ad alta concentrazione di Klf1 dimostra la selettiva preferenza di condivisione di TF specializzate con altri geni regolati dallo stesso fattore di trascrizione.

Klf1 organizza il genoma eritroide

Cellule eritroidi di fegato fetale di topi Klf1^{-/-}

Analisi 3C :

- mancanza di associazione (disrupted) tra geni dipendenti da Klf1 intra- ed inter- cromosomici
- mantenimento di interazioni a grande distanza tra geni non Klf1 dipendenti

Analisi immuno-FISH :

- geni Klf1 dipendenti sono meno associati nelle TF, cioè sono meno trascritti
- alcuni alleli di geni Klf1 dipendenti ancora attivi non erano più associati preferenzialmente in TF ad alta frequenza
- la presenza di Klf1 organizza TF specializzate dove colocalizzano alleli di geni coregolati

ribaltando la problematica

è per caso vero che esiste una compartimentazione anche per i geni dei cromosomi inattivi?

- in altre parole : ci sono solo compartimenti di attività o anche di inattività?
- esempio : esclusione allelica dei geni del cromosoma X inattivo

compartimenti di RNA non coding

l'inattivazione del cromosoma X da Xist (x inactive specific transcript, unico gene trascritto dal crms X inattivo Xi)

Regioni nucleari da cui RNAPII è esclusa: RNA Xist non coding formerebbe compartimenti che escludono RNAPII e repressivi per i geni femminili X-linked

- RNA Xist hanno repeats di A che legano e silenziano i geni X-linked e li ricollocano nel compartimento silente
- silenziamento insieme alle “nuclear scaffold proteins”

STATB1 e 2 (AT binding proteins) Agrelo et al 2009 Dev Cell 16:507-516.

- altri nc RNA (non coding) *Air* e *Kcnq1ot1* silenziano diversi gruppi di geni e raccolgono i geni nei compartimenti inattivi

ipotesi emergenti

Un concetto emergente sul meccanismo di silenziamento (problema non da poco per tutto il differenziamento) associato a quei geni e forse ad altri lunghi ncRNA ipotizza che il “silencing” potrebbe attuarsi con la formazione di un compartimento arricchito con attività modificante di repressione della cromatina, dove sono sequestrati i geni target, riducendo la mobilità della cromatina ed il contatto dei geni con le TF.

la bibliografia dell'articolo è ricca ed aggiornata il pdf sta sul sito della didattica: Transcript fact nucl org Fraser '11.pdf
P.Fraser è l'ultimo autore.

info sull'autore

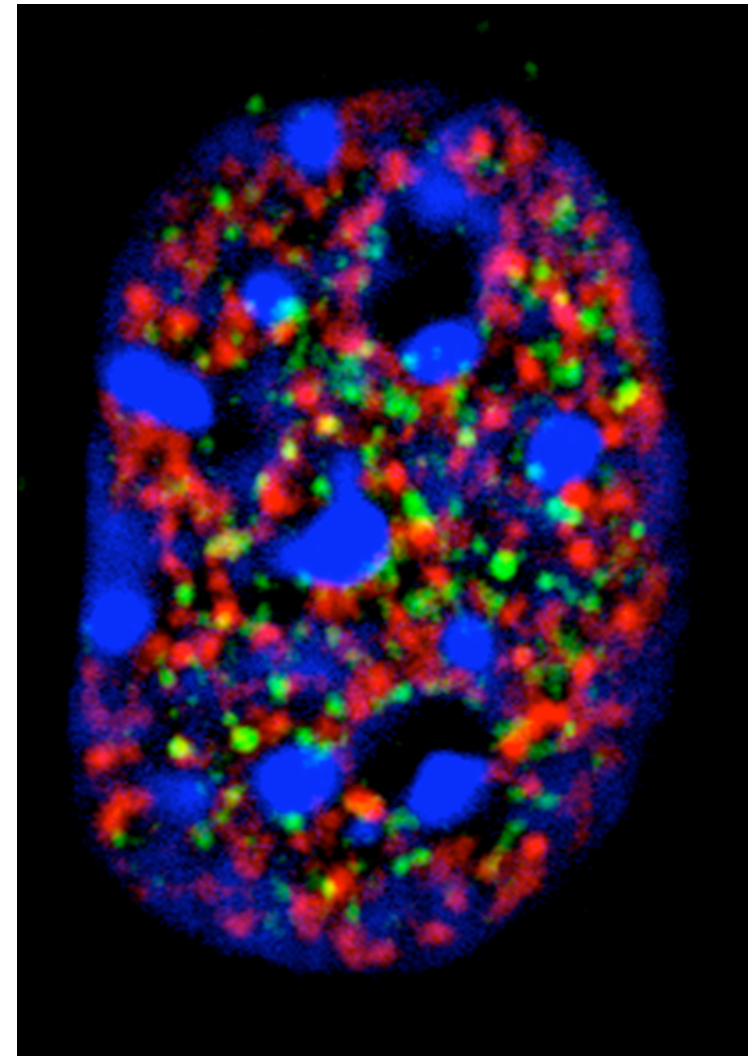
Research summary

Cambridge UK

Inst. Strategic Projects ISPs:

Dynamic changes in chromatin and nuclear structure can regulate patterns of cellular gene expression during differentiation and development, or in response to environmental signals.

Our research looks at various levels of chromatin, chromosome and nuclear structure, from individual nucleosome modifications to the dynamic 3D structure of chromosomes and their inter-relationships in the nucleus and how they affect genome functions.



prove di esistenza di TF

Interessi diversi nella storia dell'uomo :

Anselmo d'Aosta (1033-1109): prova ontologica dell'esistenza di Dio

Osborne (2004): active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription; (Nat Genet 36, 1065-71).

Wendy Bickmore (2007) : Nuclear organization and chromatine decondensation, distinct mechanisms. (Developm. 234, 909-919).

prove sperimentali dell'esistenza dei territori cromosomici e “transcription factories”.

funzione e struttura

La collocazione della cromatina all'interno dei distretti del nucleo è sufficiente ed è parte della regolazione?

È un meccanismo attivo che permette alla cromatina di attivarsi?

Esistono diversi modelli per questi meccanismi e li vediamo per diversi cluster e sistemi di regolazione.

Per ora non si conoscono i segni sul DNA di come possono avvenire questi fenomeni e se sono solo epigenetici, molto probabilmente ci sono entrambe:
controlli genetici ed epigenetici

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 ?

alcune evidenze di regioni con attività genica intensa, differente collocamento al centro o periferia del nucleo

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

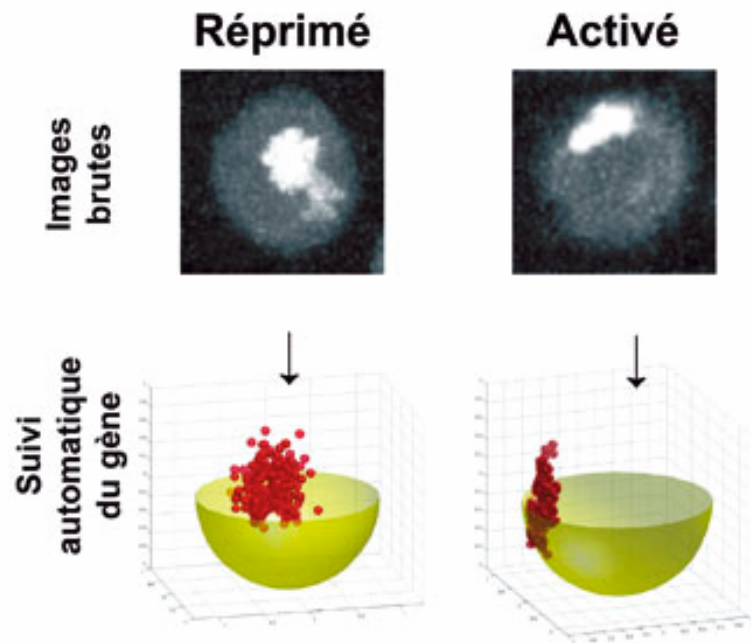
interpretazione:

ci sono collocazioni specifiche preferenziali

come si trovano le evidenze

Nuclear Architecture and Gene Expression

New and exciting things are happening in the field of gene expression: Two research teams have demonstrated the importance of spatial organization in the regulation of gene expression.



Ulf Nehrbass and his team tracked a gene's movement after activation: They observed that it settled in the nucleus' periphery (a requirement for gene expression) and that its mobility was reduced.

Leggete il riassunto.doc

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

