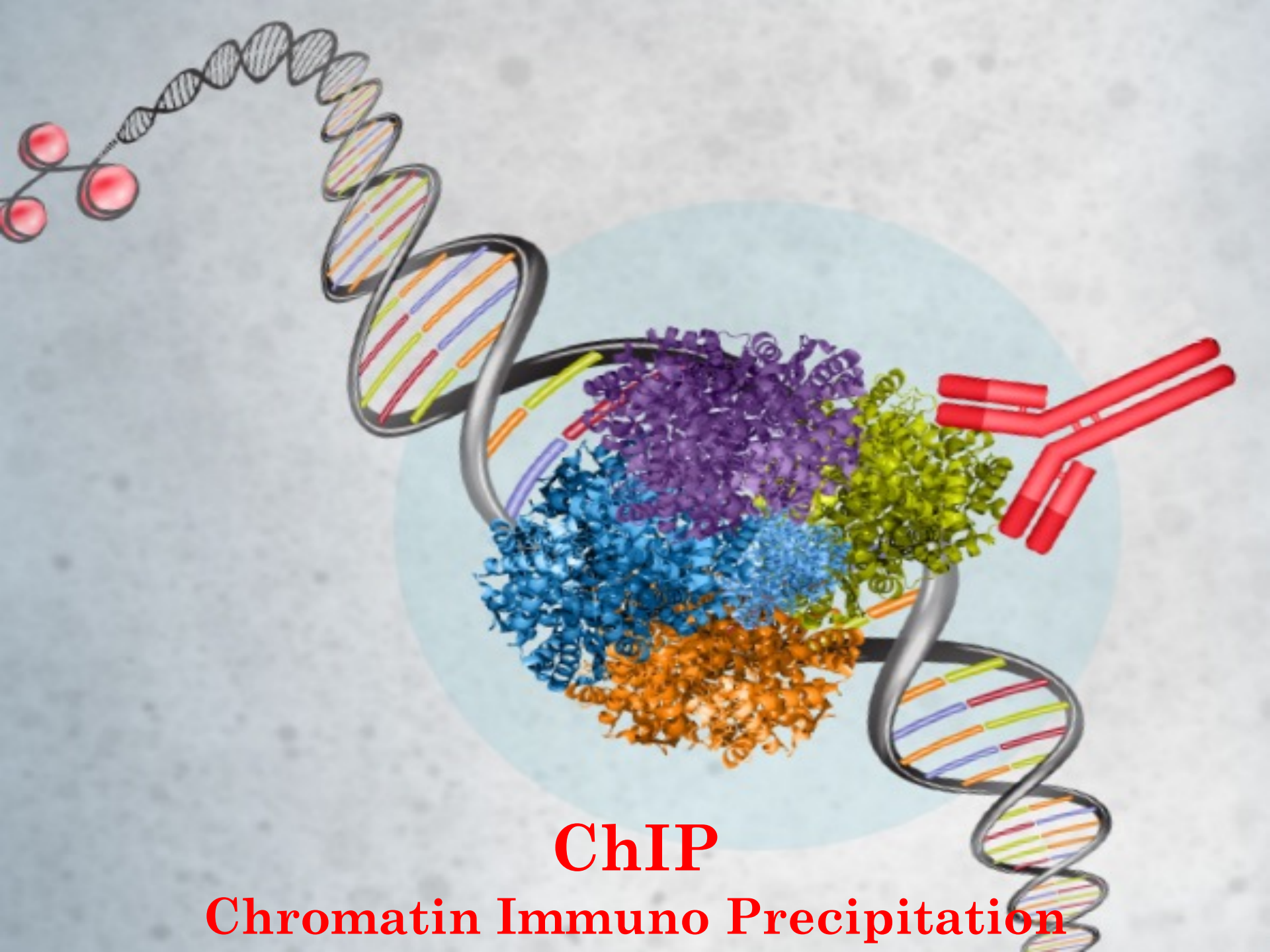
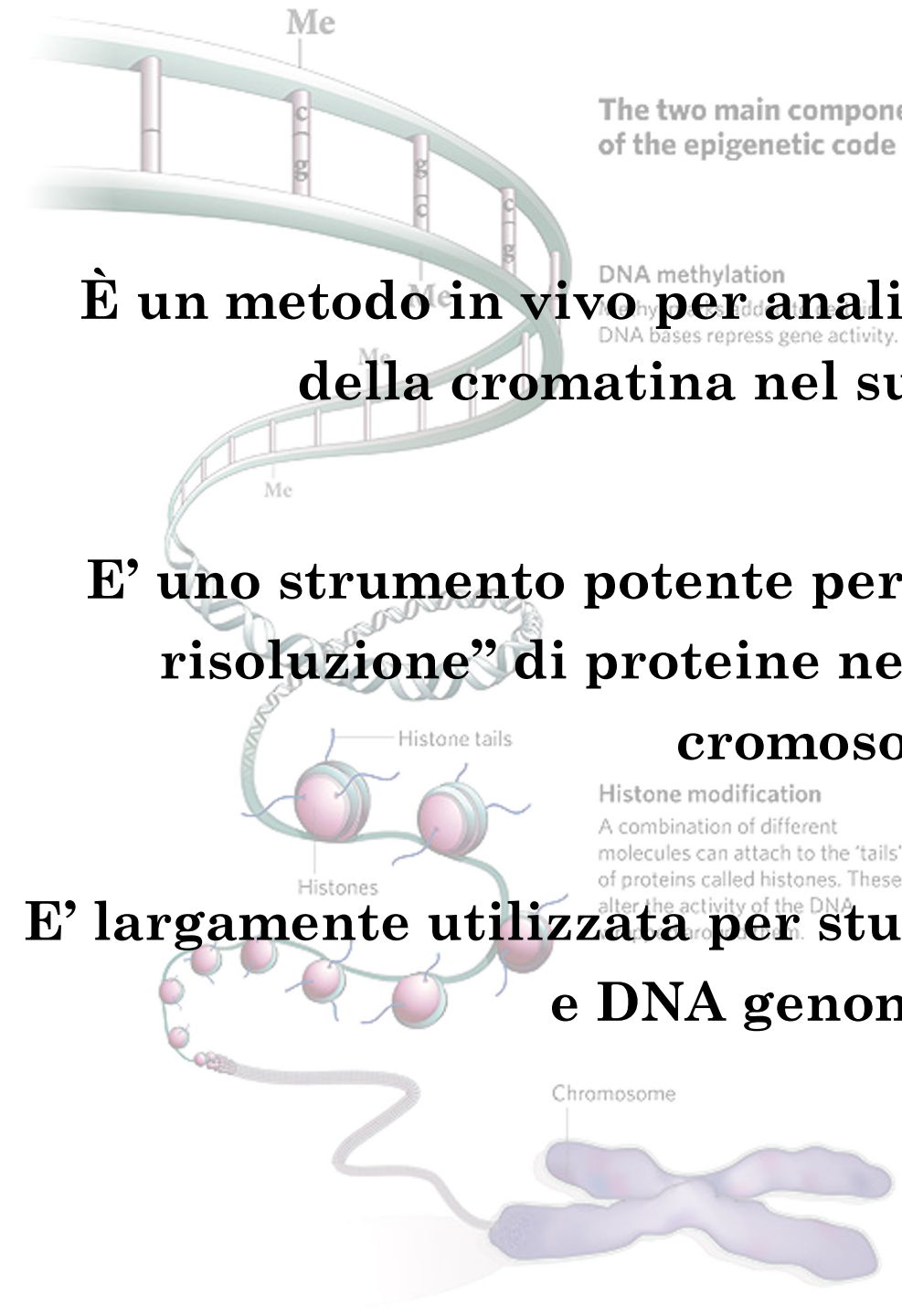


ChIP

Chromatin Immuno Precipitation



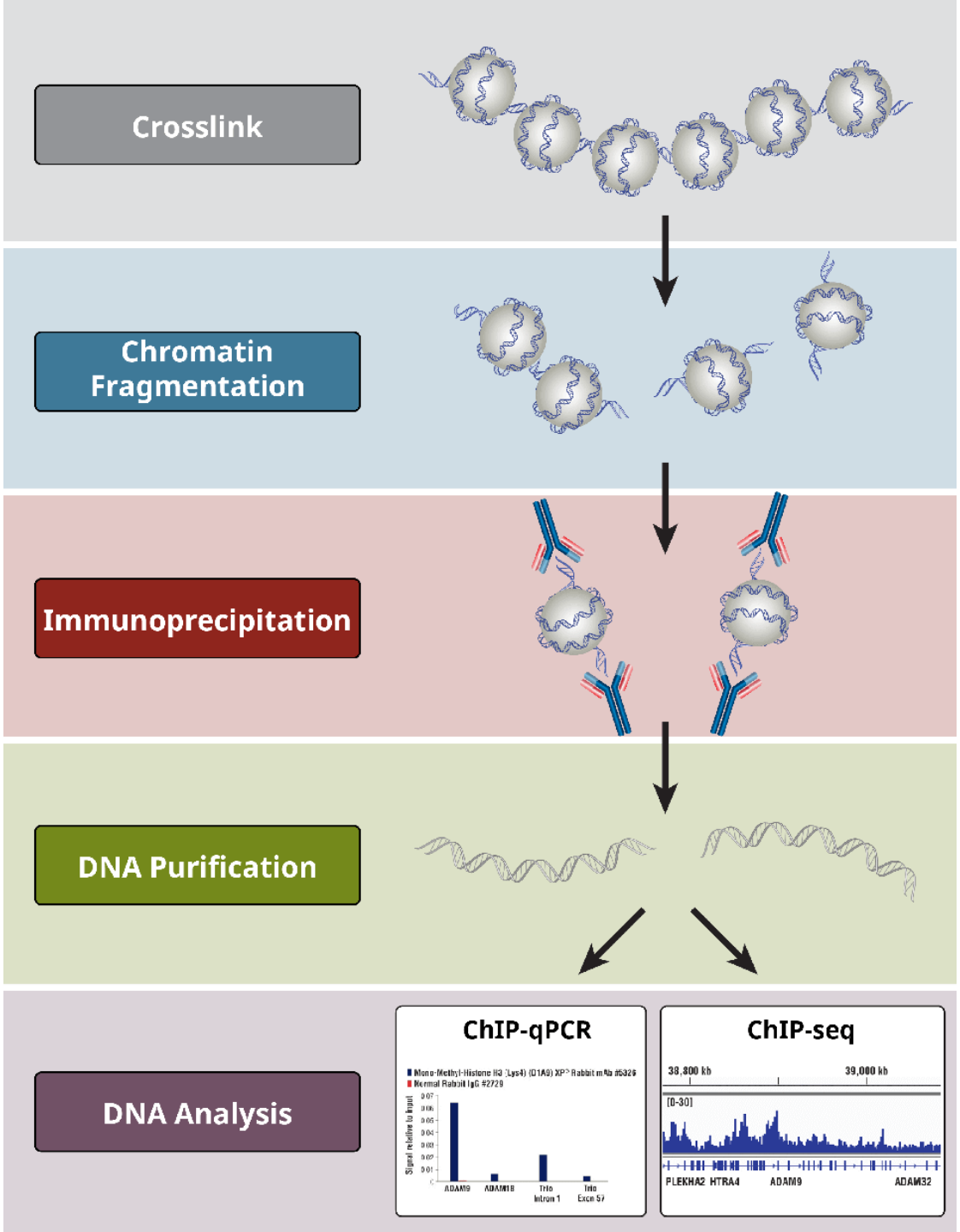
È un metodo in vivo per analizzare qualsiasi componente della cromatina nel suo contesto naturale

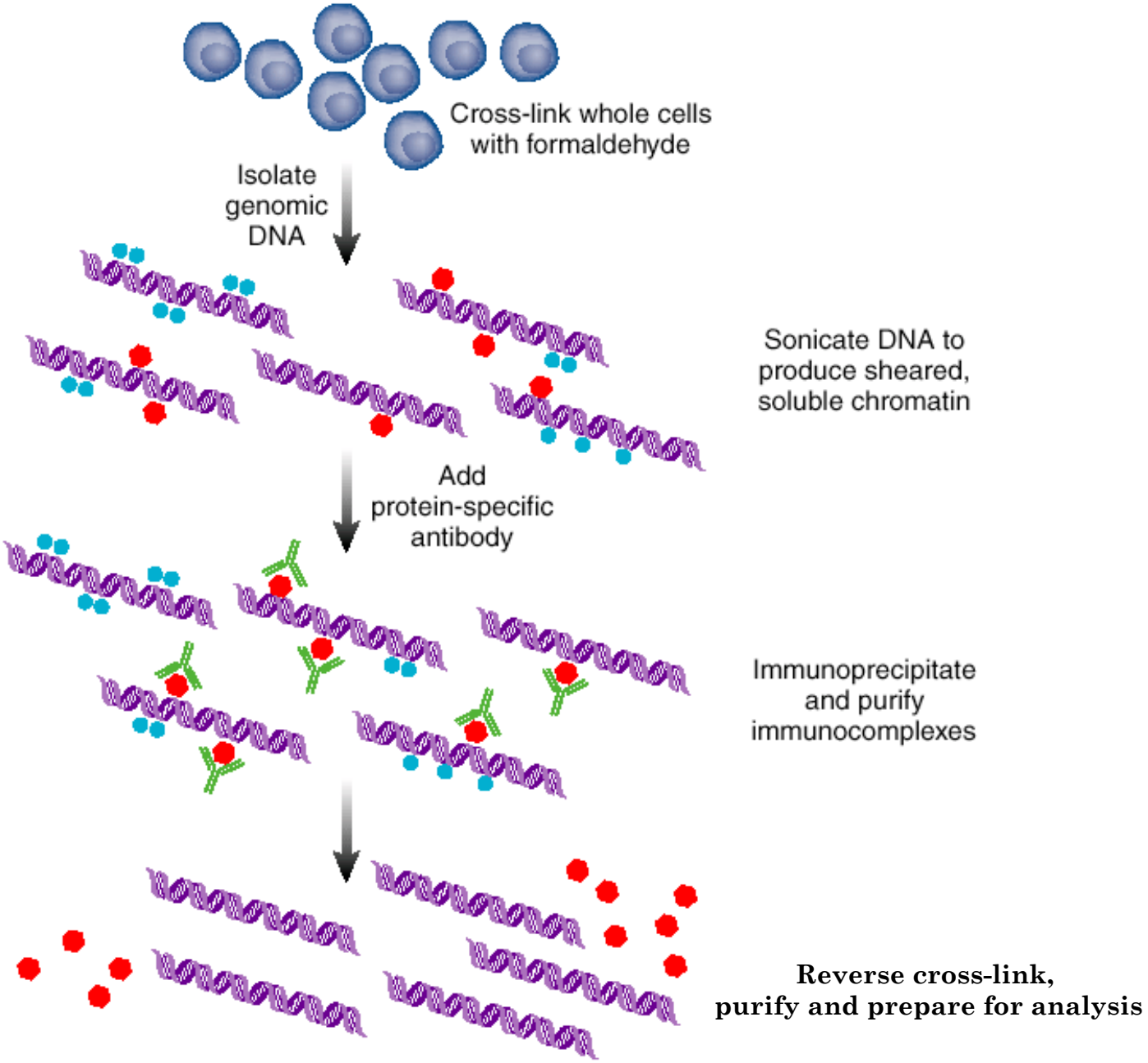
E’ uno strumento potente per ottenere “immagini ad alta risoluzione” di proteine nel contesto delle strutture cromosomiche

E’ largamente utilizzata per studiare l’interazione di proteine e DNA genomico in vivo

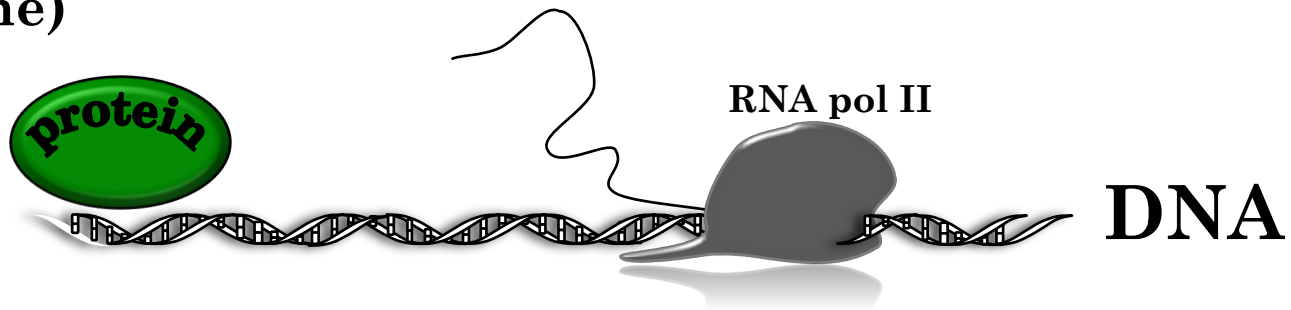
Il principio della ChIP:

arricchimento selettivo
della frazione di cromatina
contenente una specifica proteina


Crosslink
Chromatin Fragmentation
Immunoprecipitation
DNA Purification
DNA Analysis
ChIP-qPCR
Mono-Methyl-Histone H3 (Lys4) (D1A9) XP® Rabbit mAb #5326
Normal Rabbit IgG #2729
Signal relative to Input
ADAM9
ADAM18
Trio Intron 1
Trio Exon 57
ChIP-seq
38,300 kb
39,000 kb
[0-30]
PLEKHA2
HTRA4
ADAM9
ADAM32


Cross-link whole cells
with formaldehyde
Isolate
genomic
DNA
Sonicate DNA to
produce sheared,
soluble chromatin
Add
protein-specific
antibody
Immunoprecipitate
and purify
immunocomplexes
Reverse cross-link,
purify and prepare for analysis

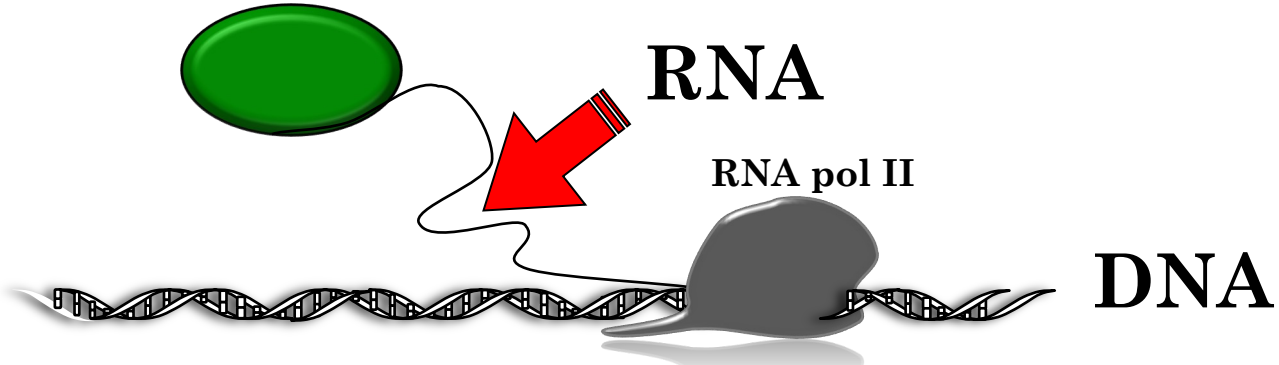
La ChIP è stata usata per mappare diversi fattori coinvolti in processi correlati con il DNA (replicazione, modificazione, trascrizione)



……e per mappare altri fattori associati con i complessi di trascrizione, ma

NON direttamente

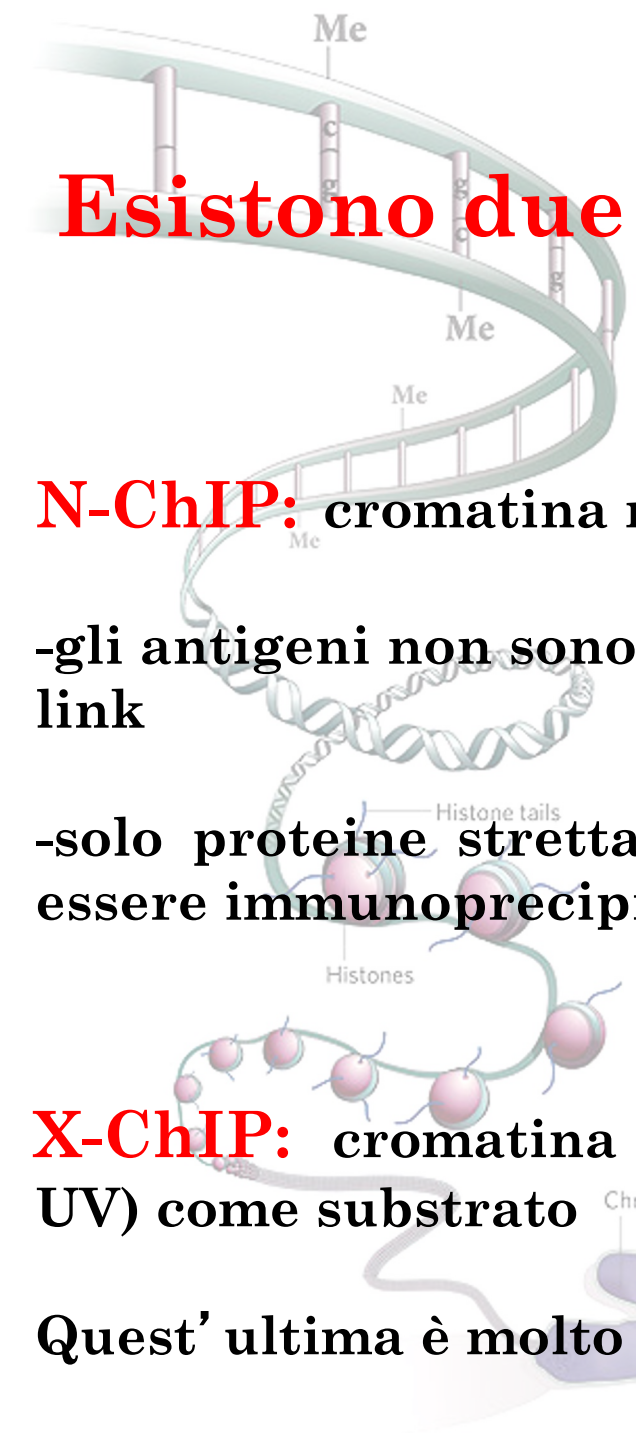
Associati con il DNA (enzimi di capping dell' mRNA, ed altri fattori coinvolti nella maturazione dell' RNA).



ChIP

Chromatin Immuno Precipitation

Ha arricchito notevolmente le nostre conoscenze su come i geni sono regolati nel loro contesto naturale



Esistono due principali tecniche di ChIP

N-ChIP: cromatina nativa

-gli antigeni non sono sicuramente nascosti o modificati dal cross-link

-solo proteine strettamente associate con la cromatina possono essere immunoprecipitate

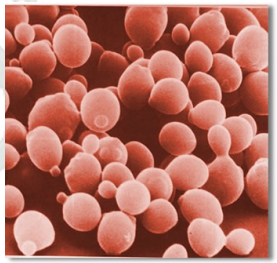
X-ChIP: cromatina cross-linked (sia chimicamente FA che con UV) come substrato

Quest' ultima è molto più usata dell' N-ChIP

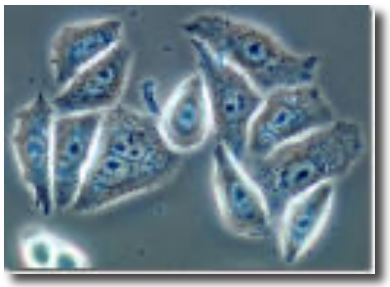
Materiale di partenza: la cromatina

La cromatina estratta da diverse fonti/organismi è un substrato idoneo per la ChIP

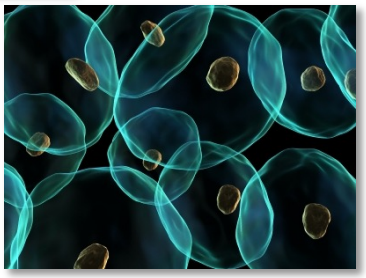
yeast



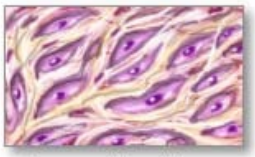
tissue culture cells

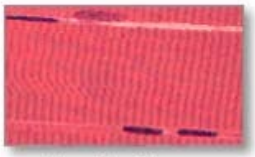


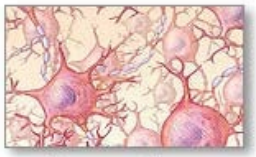
homogeneous cell suspension



tissue



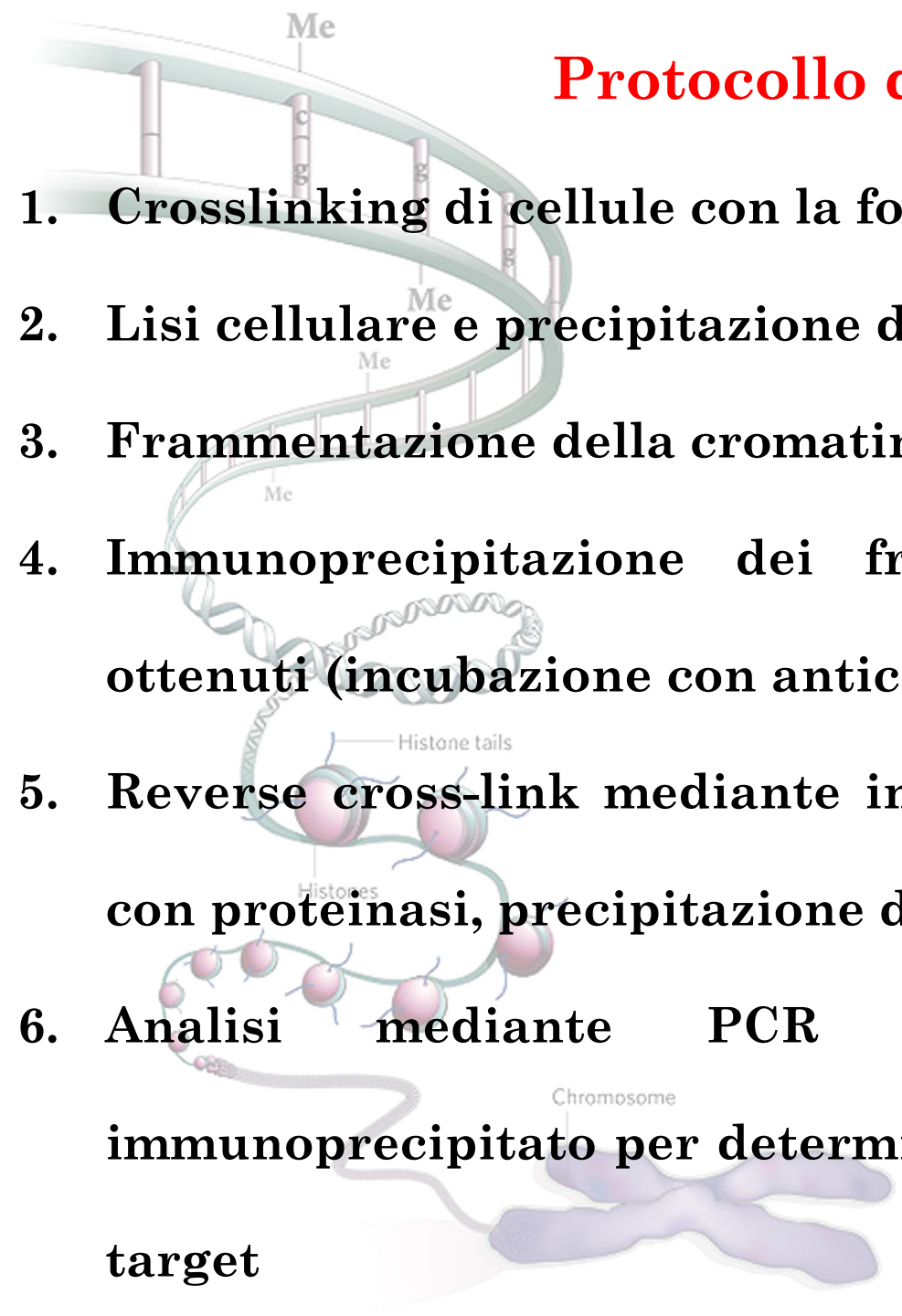


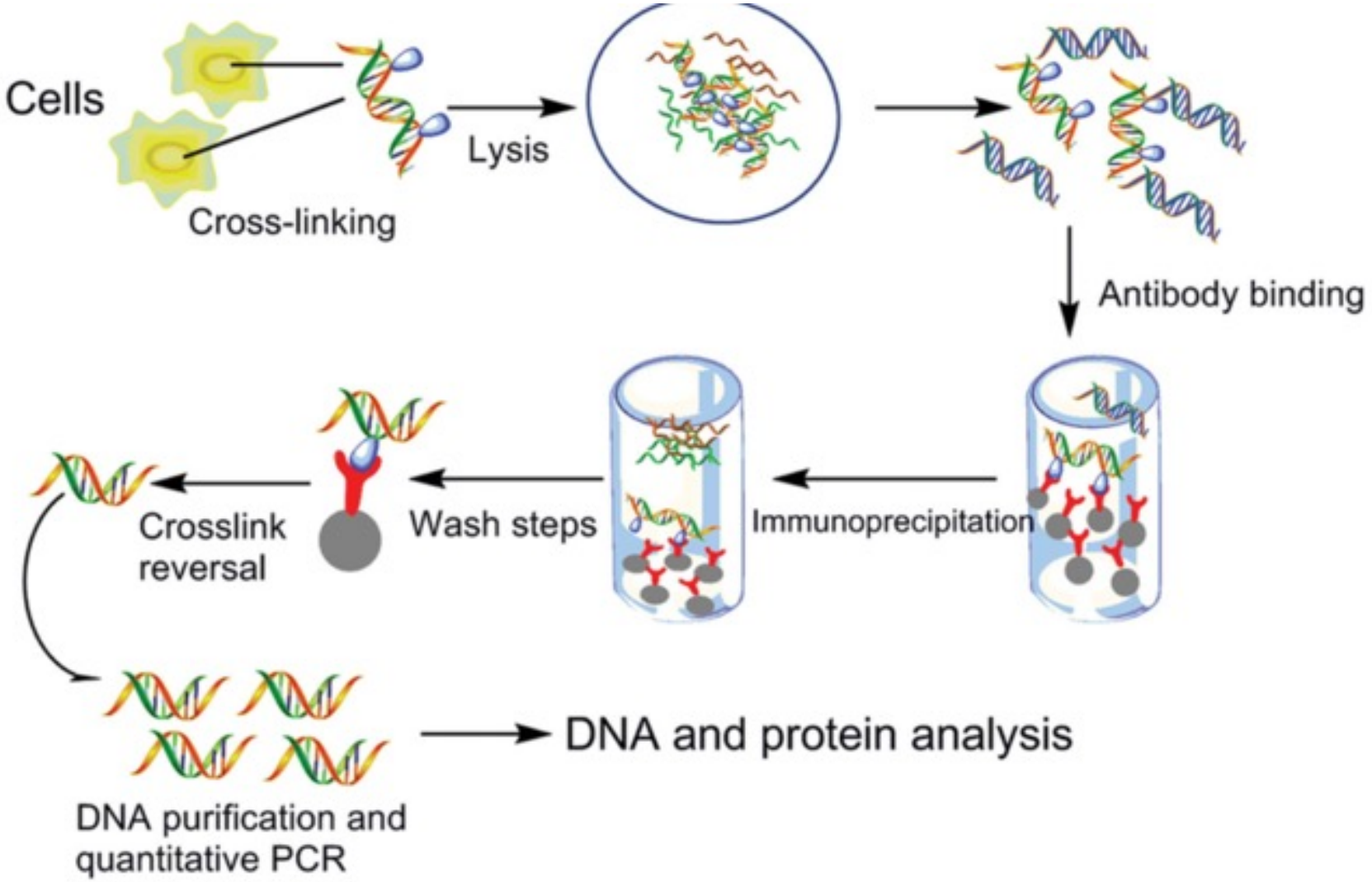


plants

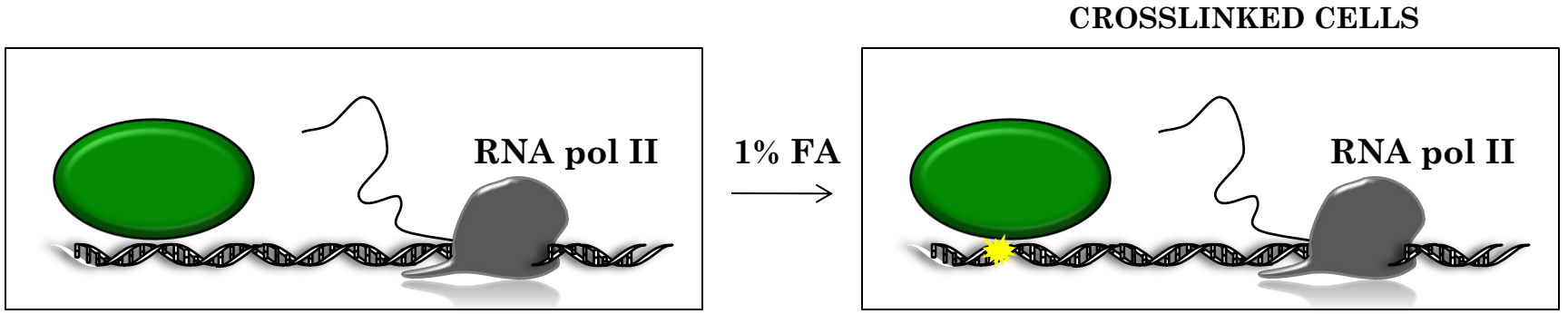
Protocollo di XChIP

1. **Crosslinking di cellule con la formaldeide in vivo**
2. **Lisi cellulare e precipitazione dell'intero estratto cellulare**
3. **Frammentazione della cromatina mediante sonicazione**
4. **Immunoprecipitazione dei frammenti di cromatina così ottenuti (incubazione con anticorpo)**
5. **Reverse cross-link mediante incubazione a 65° C, digestione con proteinasi, precipitazione del DNA**
6. **Analisi mediante PCR della frazione di DNA immunoprecipitato per determinare il livello di una sequenza target**




Cells
Cross-linking
Lysis
Antibody binding
Immunoprecipitation
Wash steps
Crosslink
reversal
DNA purification and
quantitative PCR
DNA and protein analysis

1- cross-linking con formaldeide



- FA si lega agli aminogruppi primari (ex: K in proteins, side chains of A,C,G in DNA)

- Cross link avviene sia dei legami DNA-proteina che proteina-proteina (distanza di circa 2A)

- è solubile in acqua, penetra facilmente le membrane biologiche

- il legame è reversibile a 65° C

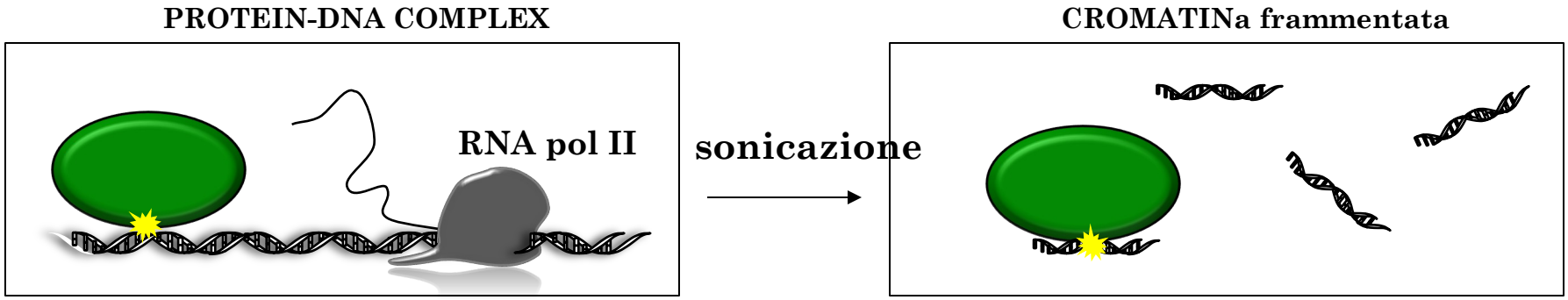
- 1% FA è la concentrazione normalmente utilizzata

- la durata del trattamento va ottimizzata (normalmente 5-10 min a RT)

Tempi più lunghi: cross linking proteina-proteina più esteso
riduzione dell'efficienza della frammentazione della cromatina
masking/modifica degli epitopi

- blocco della reazione con glicina 0.125M che fornisce un eccesso di ammino gruppi

Frammentazione della cromatina e purificazione



- dopo la lisi cellulare la cromatina viene isolata

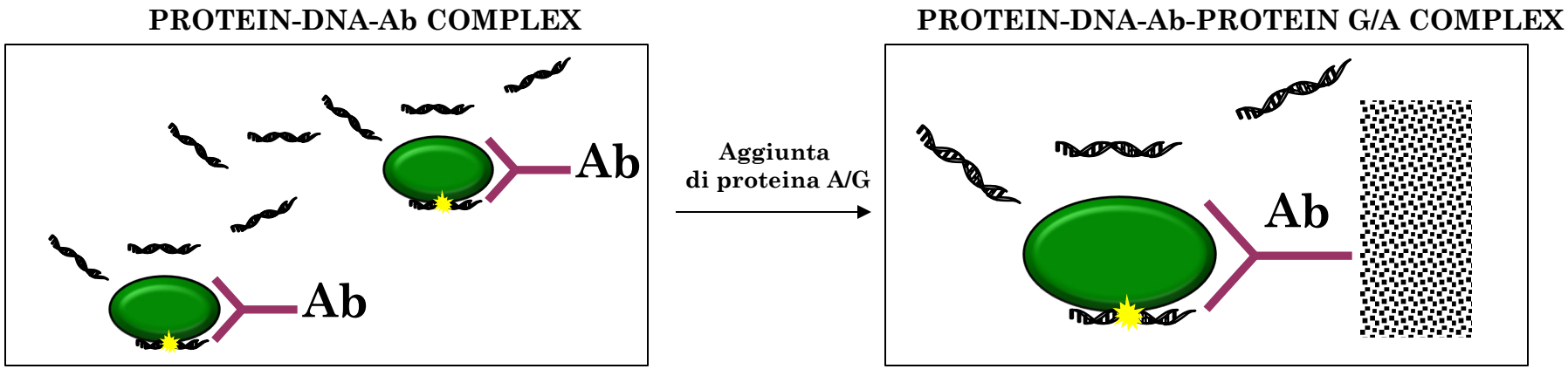
- la frammentazione è necessaria perché frammenti più piccoli di DNA forniscono una maggior risoluzione per il mapping e ridotto background nell'immuno precipitazione

- la sonicazione è il metodo d'elezione

Range dei frammenti:
0.5-1kB
ctrl su gel!!

500bp
300bp

Immunoprecipitazione



- La qualità dell'anticorpo è fondamentale in questa fase

- Deve riconoscere la proteina legata al DNA

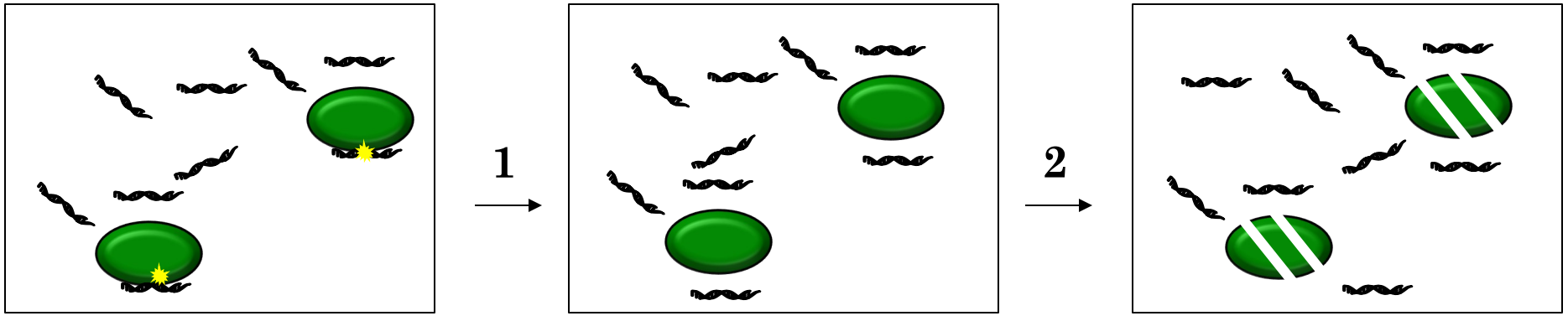
- Deve essere altamente specifico

- Necessaria una pre-taratura per ridurre il legame aspecifico

-Gli immunocomplessi sono poi precipitati con ProtG/A Sepharose (lega la regione Fc dell'anticorpo)

- lavaggi stringenti riducono il background

Reverse Crosslink, proteolisi e isolamento del DNA



- 1) Reverse crosslinks — incubazione a 65°C

- 2) digestione RNA e proteine — RNAse A + ProteinaseK

- 3) purificazione DNA — Phenol/Chloroform; Affinity column

- 4) analisi della frazione immunoprecipitata

Nota bene.....

- quantità di materiale:

può essere critica, anche a seconda di come viene trattato

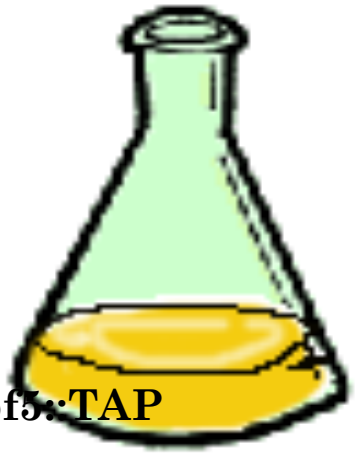
- qualità dell' anticorpo:

se è specifico è meglio purificato per affinità

- background DNA:

può dare percentuali anche elevate di falsi positivi

Cultura di lievito



Formaldehyde crosslinking

Glycine stop

Lisi cellulare con biglie di vetro

Sonicazione della cromatina

100µl aliquot (INPUT)

800µl aliquot

INPUT

Decrosslink

+Antibody-resin

IP

Immunoprecipitazione

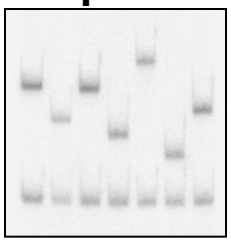
Lavaggi

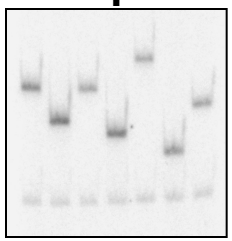
Decrosslink

Precipitazione DNA

100µl INPUT

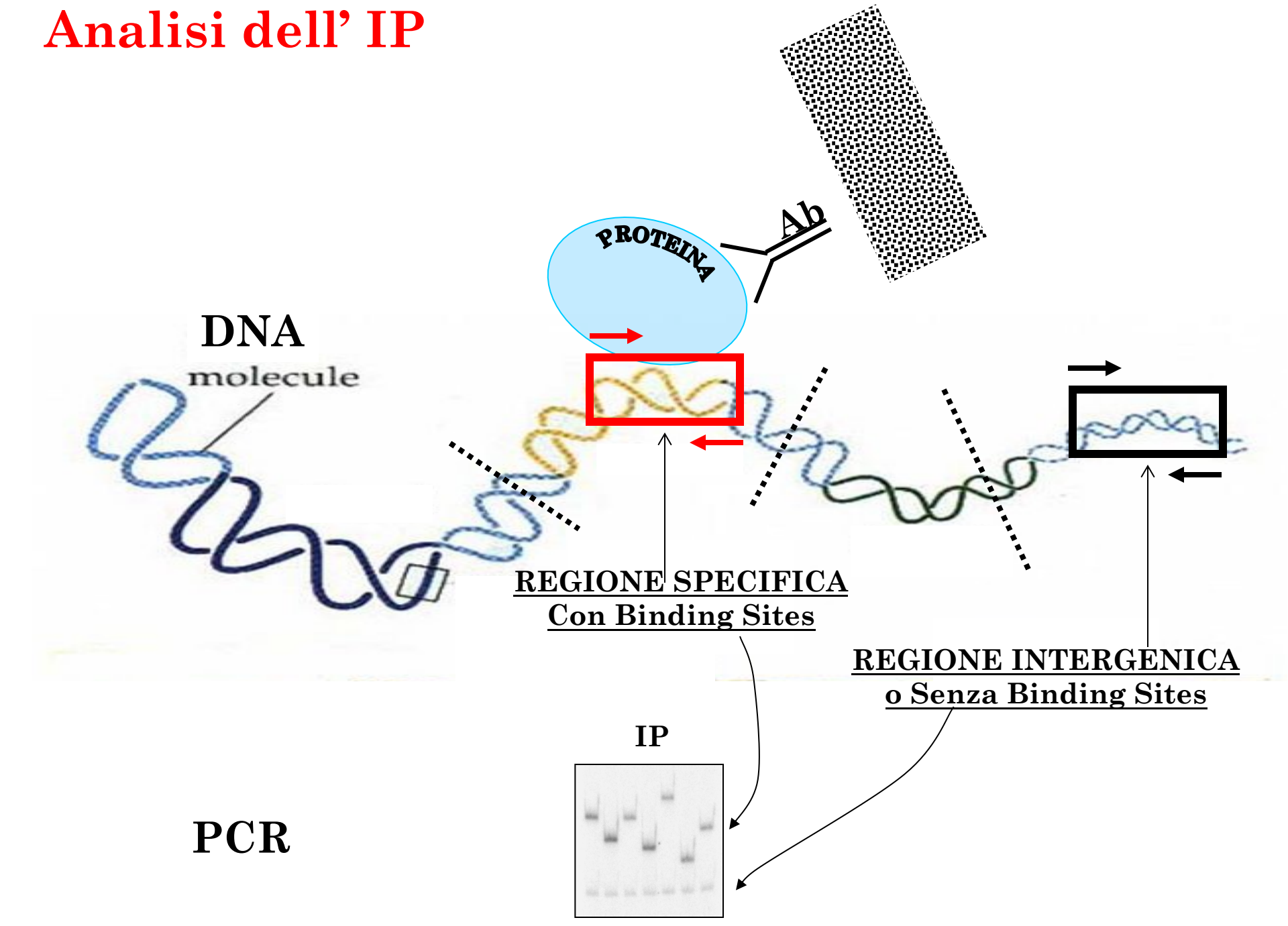
100µl IP



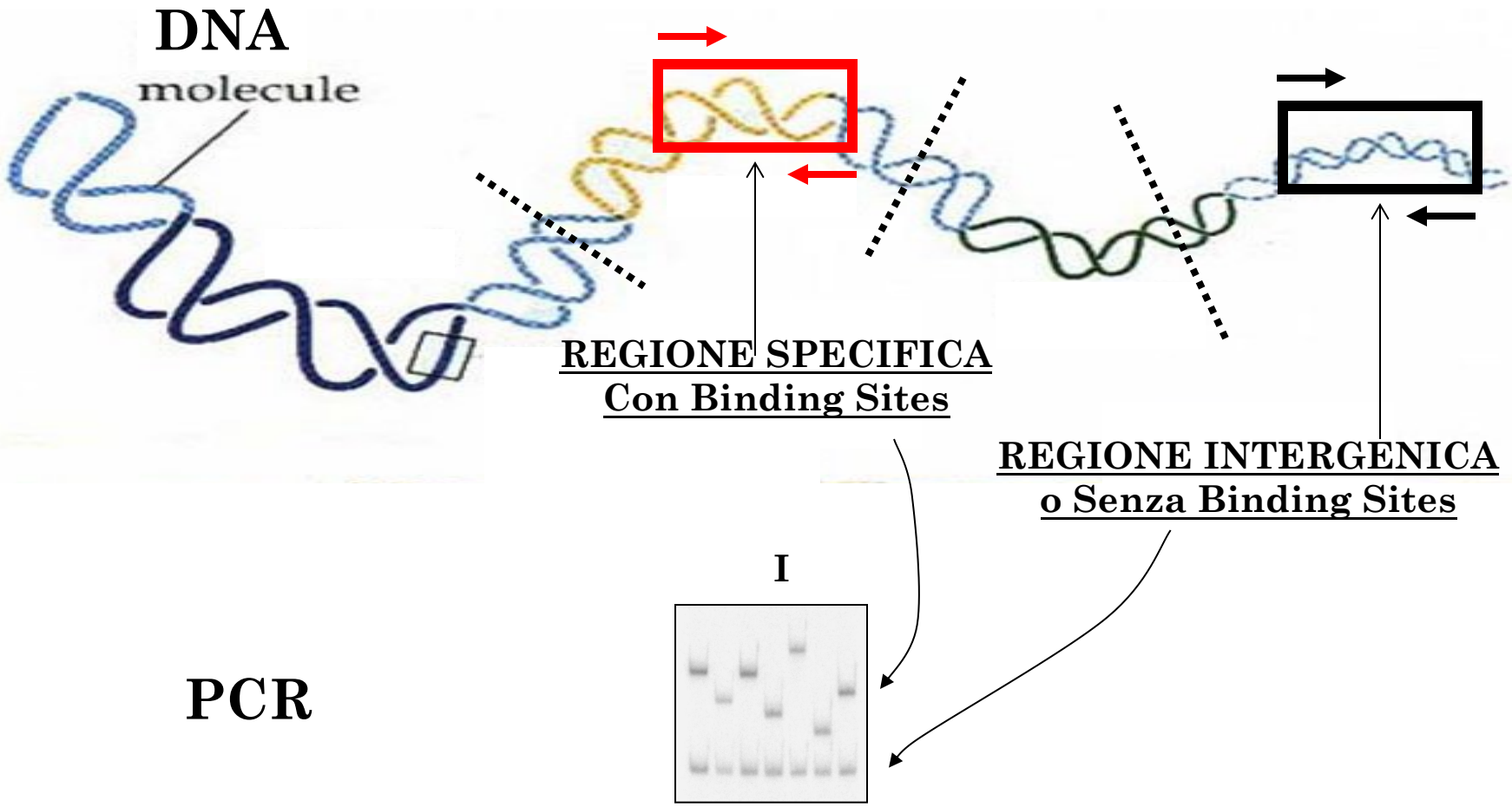


PCR

Analisi dell' IP



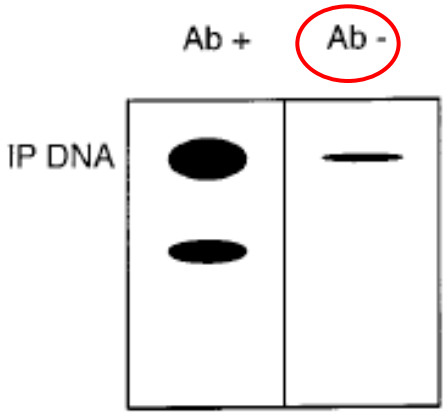
Analisi dell' INPUT



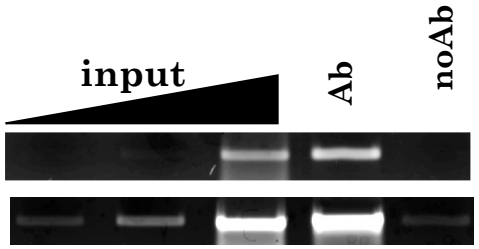
Analisi dell'IP

Slot-Blot

probe with known DNA sequences



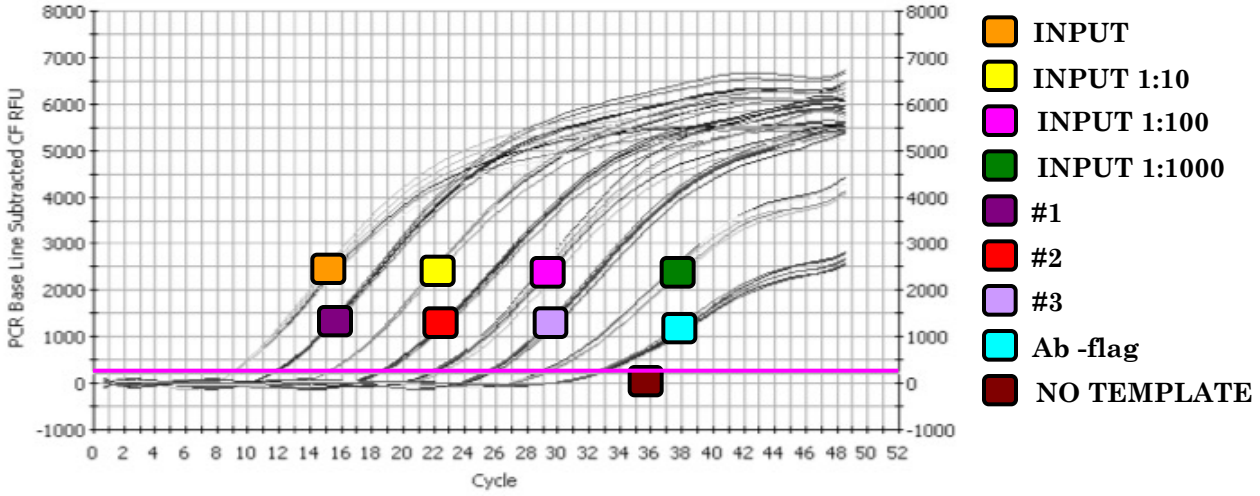
Semi quantitative PCR



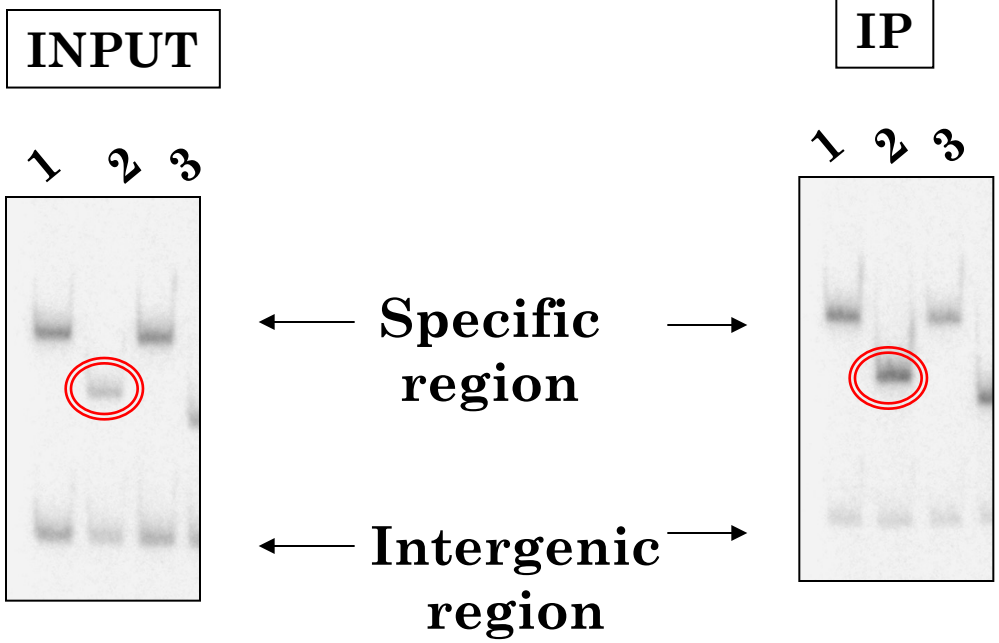
28 cicli

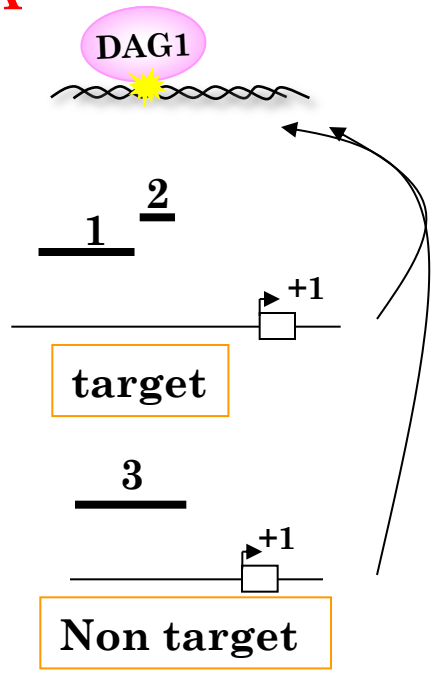
30 cicli

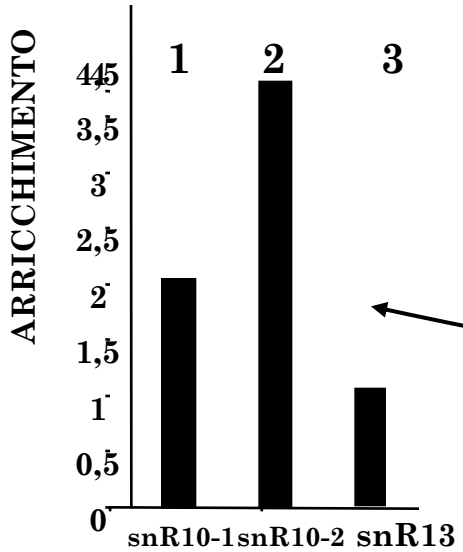
q-PCR



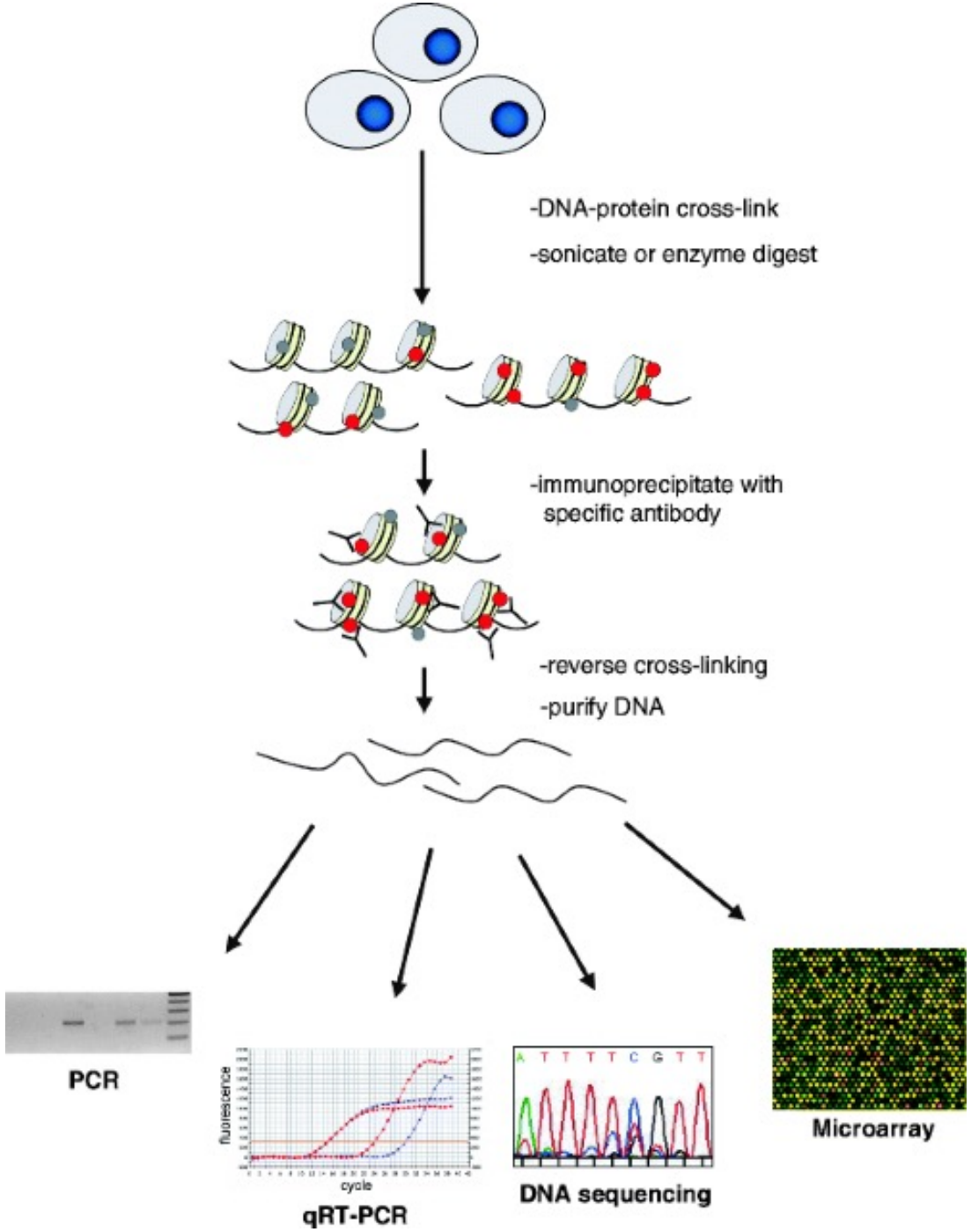
Analisi per PCR della frazione immunoprecipitata per determinare il livello della sequenza target di DNA







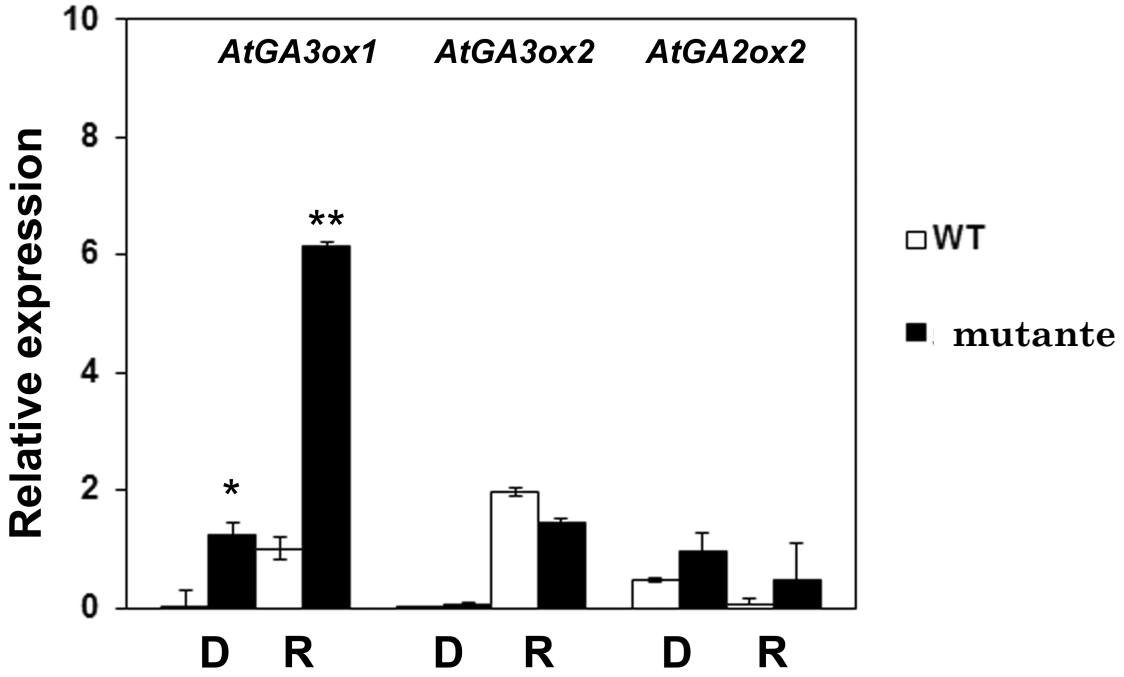
$$\text{ARRICCHIMENTO:}\quad \frac{(sp/int)^{IP}}{(sp/int)^{I}}$$

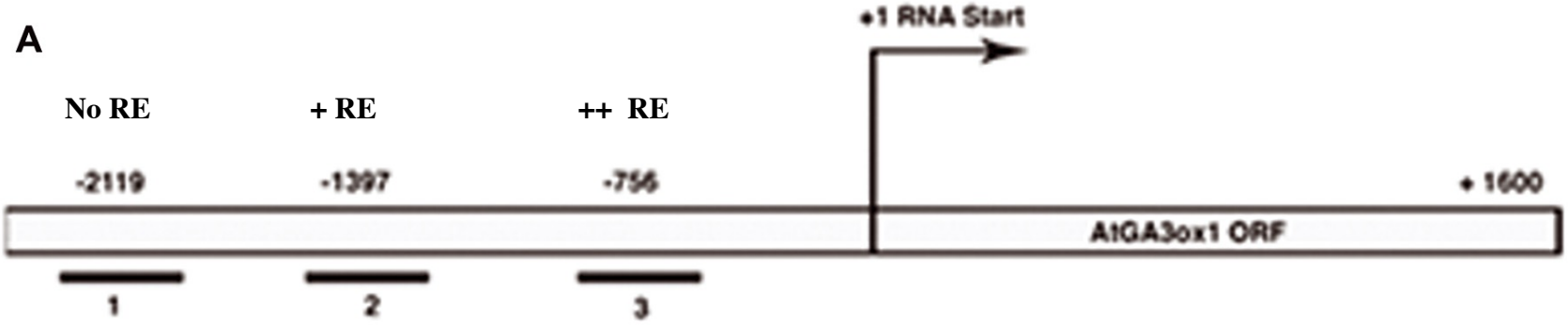

-DNA-protein cross-link
-sonicate or enzyme digest
-immunoprecipitate with specific antibody
-reverse cross-linking
-purify DNA
PCR
fluorescence
cycle
qRT-PCR
A T T T T C G T T
DNA sequencing
Microarray

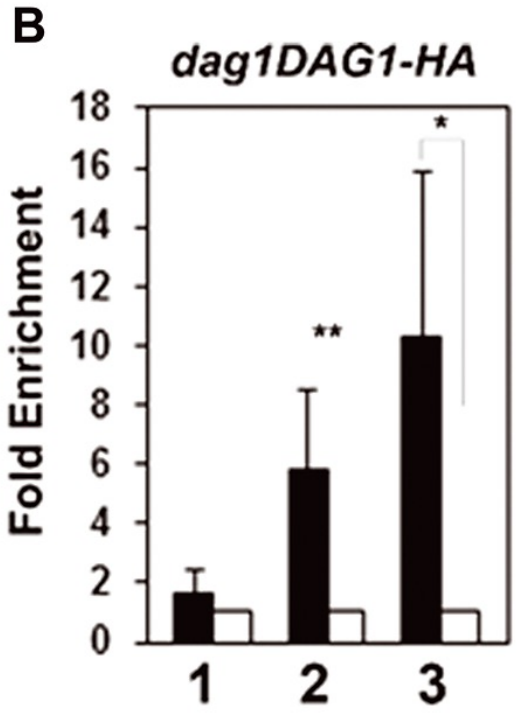
1° caso: analisi di un potenziale target

già noto……

analisi d'espressione tra mutante e wild type




A
+1 RNA Start
No RE
+ RE
++ RE
-2119
-1397
-756
+ 1600
AtGA3ox1 ORF
1
2
3


B
dag1DAG1-HA
Fold Enrichment
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
*
1
2
3

2° caso: identificazione genome- wide

Dei targets di un FT

ChIP-chip: ibridazione di un chip genomico con il DNA IP/Input come sonda

ChIP cloning: digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione per creare blunt ends e clonaggio dei frammenti precipitati con la ChIP in un plasmide.
Dispendioso e alto numero di falsi positivi

ChIP-Seq: sequenziamento mediante tecniche NGS del DNA dell'IP v/s Input

DamID-chip: usa DNA adenina metiltrasferasi per marcare le posizioni di interazione DNA-proteina, e non richiede anticorpo. Risoluzione inferiore rispetto alla ChIP-chip.

Metodi basati sulla ChIP per studiare la localizzazione di fattori su scala genomica

Method[a]	ChIP processing	Readout assay	Comments
ChIP-chip	Ligate linkers, amplify and fluorescently label fragments	Microarray hybridization	Tiling improves the specificity and accuracy of binding sites detection. Bias introduced by amplification and inability to interrogate repeat-masked regions.
ChIP-DSL	Anneal selected oligos, amplify and fluorescently label fragments	Microarray hybridization	More sensitive, but less cost-efficient than ChIP-chip; Bias introduced by the size of the DSL oligo pool, amplification and the inability to interrogate repeat-masked regions.
ChIP-cloning	Ligate linkers and clone whole ChIP fragments	Sequencing	Unbiased, but large-scale sequencing is needed to distinguish truly enriched sequences from background. Not cost-efficient.
ChIP-SAGE	Ligate linkers, create DNA tags, concatenate and clone tags	Sequencing	Unbiased, interrogates repeat-masked regions, but has lower resolution than related methods and requires extensive sequencing.
ChIP-PET	Clone ChIP fragments, generate, concatenate and clone PETs	Sequencing	Unbiased, localizes binding sites more precisely, interrogates repeat-masked regions, but requires extensive sequencing.
ChIP-Seq	Ligate linkers, amplify and generate clusters	Sequencing	No cloning involved, interrogates repeat-masked regions ,and is more quantitative and cost-efficient than other sequencing-based methods.

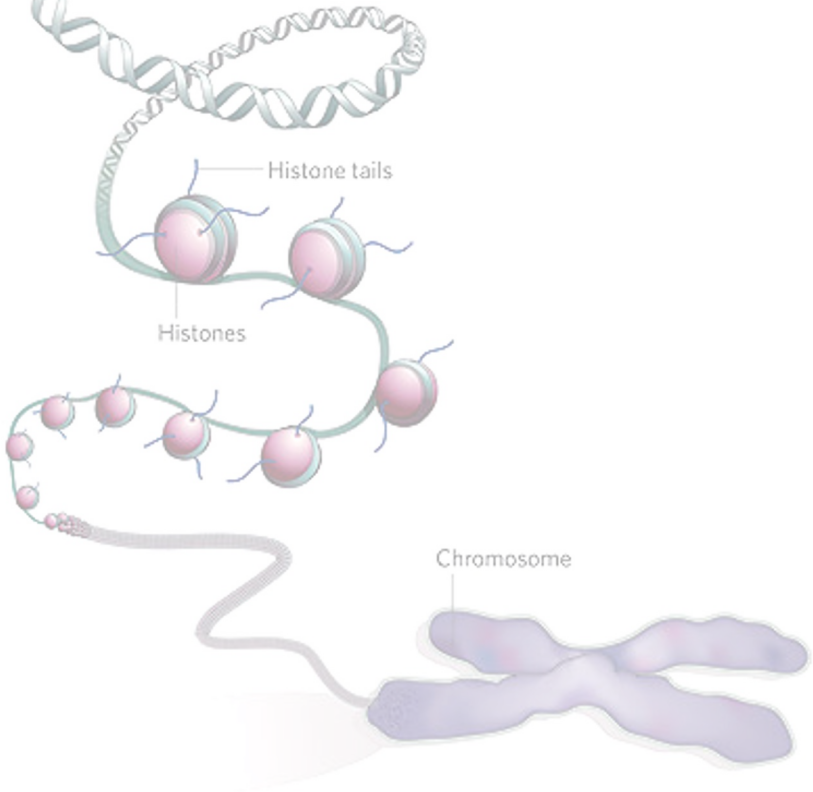
ChIP on chip

Genome wide location analysis

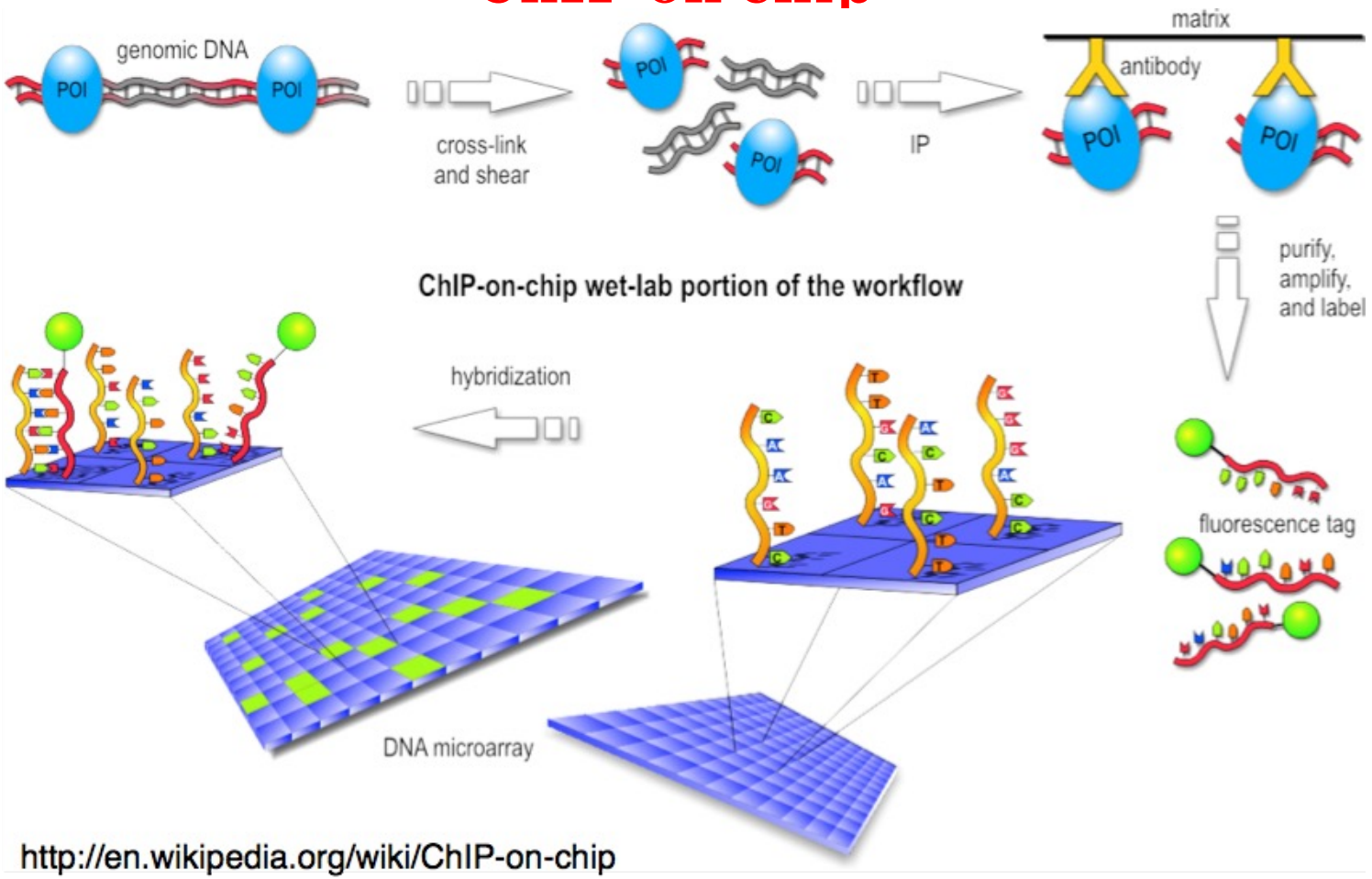
Mapping in vivo delle interazioni genoma-proteine

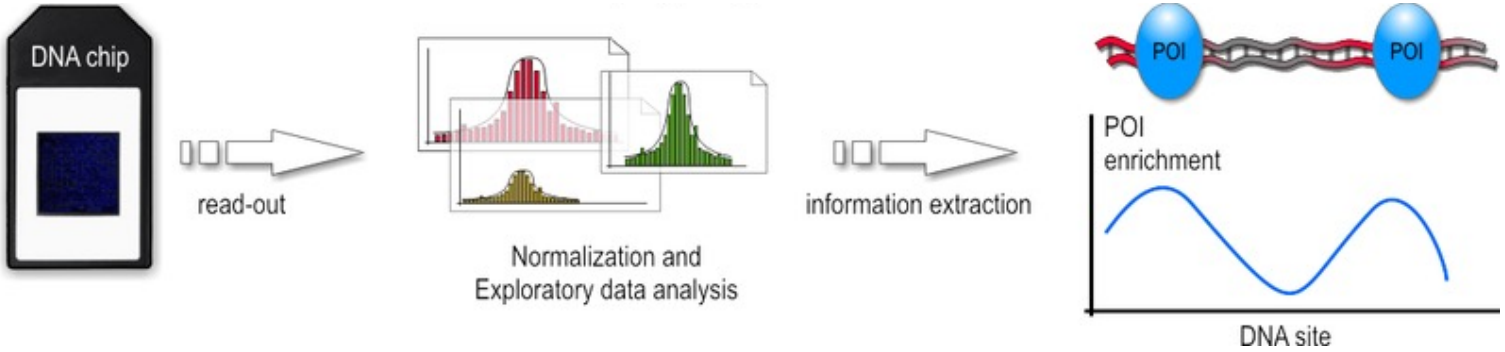
Identificzione di nuovi geni target

Costruzione di network regolativi trascrizionali



ChIP on chip


genomic DNA
POI
POI
cross-link
and shear
POI
POI
IP
matrix
antibody
POI
POI
purify,
amplify,
and label
ChIP-on-chip wet-lab portion of the workflow
hybridization
fluorescence tag
DNA microarray
http://en.wikipedia.org/wiki/ChIP-on-chip


DNA chip
read-out
Normalization and
Exploratory data analysis
information extraction
POI
POI
POI
enrichment
DNA site

-Necessità di molto materiale di partenza (IP e INPUT)

-In alternativà è possibile amplificare il materiale di partenza (possibile PCR bias specie in mammiferi, causa sequenze ripetute)

-DNA genomico come INPUT

-Necessarie almeno 3 repliche biologiche e diversi controlli sperimentali (transformed cell lines v/s empty vector cell lines)

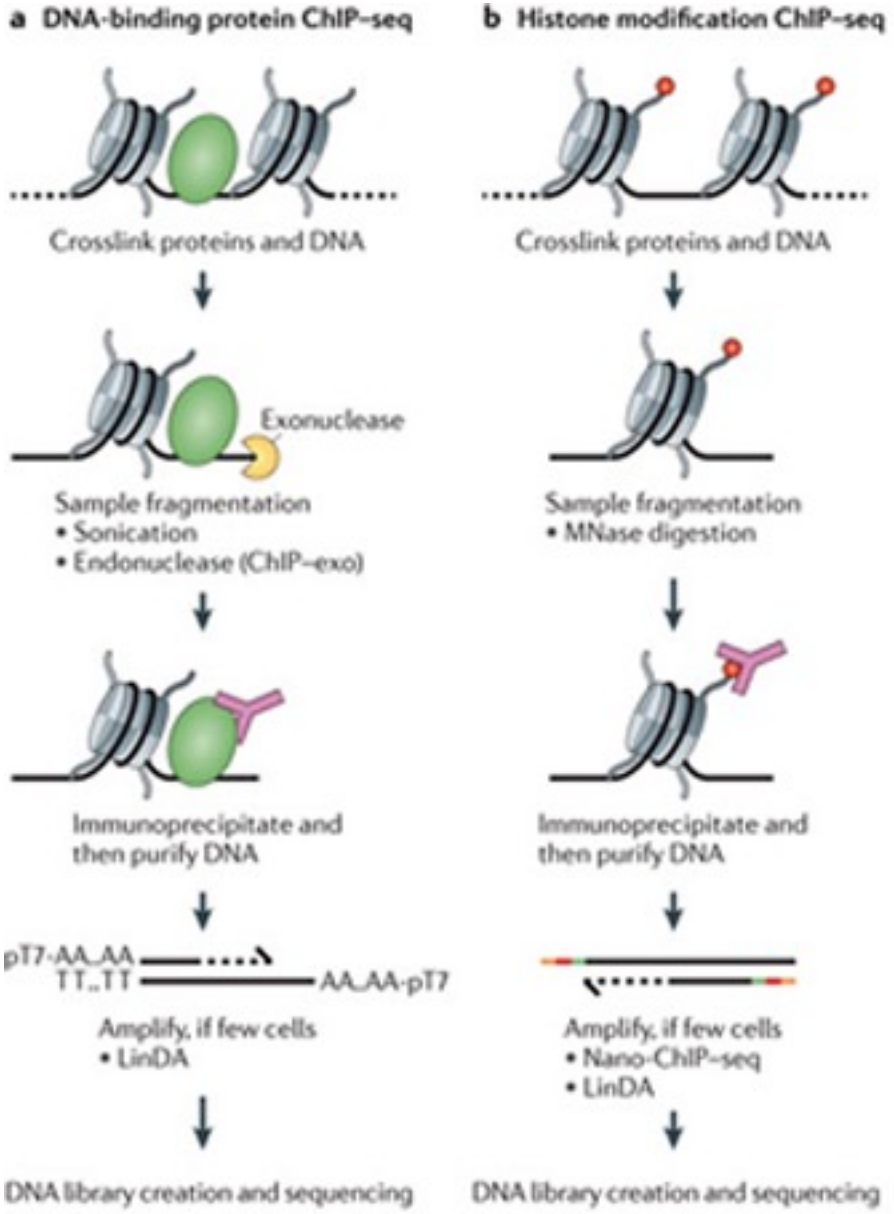
Genome-wide ChIP on ChIP

Per:

- Identificare la distribuzione delle modificazioni istoniche utilizzando Abs contro le diverse modificazioni

- Usare la ChIP on ChIP per mappare gli enzimi che effettuano queste modificazioni istoniche

ChIP-seq e dintorni



a) ChIP-seq standard, o con uso di endonucleasi al posto di sonicazione o esonucleasi. Utile per lo studio dei Binding Sites dei fattori di trascrizione

b) ChIP-seq per identificare le modificazioni istoniche, uso della nucleasi micrococcale (MNase)

Nature Reviews | Genetics

Esperimento di ChIP-seq

-i campioni: *dag1DAG1-HA*, *dag1* (controllo negativo)

- **3 repliche biologiche**
- **IP v/s Input**

Cosa facciamo con i risultati di una ChIP-seq??

- Verifica riproducibilità

- Analisi localizzazione cromosomica (promotore, introne, sequenza intergenica??)

- Analisi presenza dei RE (sequenza di legame del FT)

- Real time sul mutante v/s WT

Reference genes are an internal reaction control that have sequences different than the target

A reliable reference should:

show expression level unaffected by experimental factors.

show minimal variability in its expression between tissues and physiological states of the organism.

show a similar threshold cycle with gene of interest.

It seems that the perfect fulfillment of these conditions are the basic metabolism genes (called Housekeeping Genes–HKGs) which, by definition, being involved in processes essential for the survival of cells, must be expressed in a stable and non-regulated constant level and in fact they were first to be examined as reference genes

This was always questioned, even at the time of forming the assumption since many of them participate not only in basic metabolic processes and what seems to be perfect in one experiment does not guarantee its functionality in another.

Normalization is important in real-time qRT-PCR analysis because of the need to compensate for intra- and inter-kinetic RT-PCR variations. Such variations may be due, for example, to the difference in amount of starting material between the samples, difference in RNA integrity, cDNA sample loading variation, or difference in RT efficiency.

One of the most popular methods is normalizing a target gene expression to the ribosomal RNAs (rRNA) ARGHHHHHHH.

GAPDH is one of the most commonly used reference genes. The use of GAPDH in many studies brings good results, in others it is not recommended due to variability of expression caused by exhibition to the specified experimental factors. This casts into question its classification as a HKG, because this may suggest that it is involved not only in the fundamental processes of cells but might also be significantly influenced by other processes induced during the experiment.

GAPDH in plant studies sometimes GADPH is chosen and with very good application in some species, and unreliable in others.

Under different environmental conditions, sometimes extreme, known as abiotic stress to which plant adapts in different ways and degrees, there are influence on the expression of certain genes, including ubiquitous GAPDH not directly associated with such response. In the case of Lolium temulentum where a set of stress factors was applied GAPDH expression level increased under treatment of heat stress, or when exposed to UV light. On the other hand, exposing tomato to light stress treatment had no significant effect on the expression of GAPDH, but low temperatures and lack of nitrogen were the source of such change.