

Analisi del metiloma

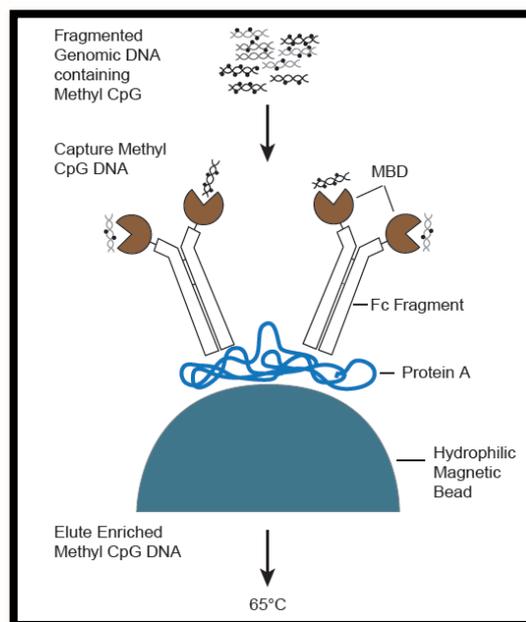
Obiettivi

La metilazione del DNA è un processo biochimico fondamentale per lo sviluppo fisiologico dell'organismo e per la differenziazione cellulare negli organismi superiori. Nei tessuti adulti la metilazione si concentra a livello dei dinucleotidi CpG, raggruppati in isole (*CpG islands*) poste al 5' di regioni regolatorie, *CpG shores* (situate a <2Kb dalle isole), e *CpG shelves* (poste a <2kb dagli *shores*). La distribuzione delle citosine metilate nel genoma ha un ruolo nel controllo epigenetico dell'espressione genica e le alterazioni dei livelli di metilazione del DNA (iper- o ipometilazione) sono implicate in diversi processi alla base di cancro, senescenza cellulare, malattie genetiche, invecchiamento.

Procedura

La fase di arricchimento delle regioni metilate può essere ottimizzata ed eseguita da Genomnia, oppure può essere messa a punto e realizzata nel laboratorio del cliente. In quest'ultimo caso si precisa che, come richiesto dal protocollo di costruzione delle librerie di frammenti Ion Torrent, è necessario che il DNA arricchito per regioni metilate sia sotto forma di doppio filamento (dsDNA). Il personale di Genomnia è a disposizione per eventuali suggerimenti tecnico-scientifici che permettano di soddisfare tale requisito.

La strategia adottata viene definita come *methyl-CpG binding domain* (MBD) e permette di concentrare il sequenziamento solo sulle regioni del genoma interessate dal processo di metilazione. L'immagine sottostante fornisce una rappresentazione grafica di quanto di seguito descritto.



In generale, il metodo *MBD pull-down* sfrutta le proprietà funzionali del dominio MBD presente in numerose proteine facenti parte di complessi cromatinici per catturare le regioni di DNA in cui le citosine del dinucleotide CpG sono metilate.

Come mostrato in figura, nel sistema da noi scelto il dominio MBD della proteina umana MBD2 è fuso alla coda Fc della IgG1 umana. Quest'ultima interagisce con la proteina A presente sulla superficie di biglie idrofiliche paramagnetiche. Dato che il frammento Fc è un dimero e che ad ogni proteina A possono legarsi due unità dimeriche di Fc, per ogni molecola di proteina A sono messi a disposizione per l'interazione con i frammenti di DNA metilato quattro domini MBD, aumentando di conseguenza l'affinità di legame.

Il DNA genomico viene inizialmente ridotto in frammenti da 50-500 bp (con la maggior parte delle molecole aventi dimensioni di circa 200 bp), e successivamente le regioni CpG metilate vengono catturate in modo selettivo grazie alla procedura sopra descritta. Il DNA a doppio filamento arricchito è quindi eluito mediante incubazione a 65°C ed utilizzato come template per produrre una libreria di frammenti. Il sequenziamento è realizzato su piattaforma Ion Torrent S5, con reads da 200 bp e una profondità di circa 20 milioni di sequenze per campione.

Quantità di campione necessaria

Nella tabella sottostante sono riportate le quantità di DNA richieste per eseguire l'analisi di MBD-seq a partire da campioni di DNA genomico totale o da campioni di DNA già sottoposto alla procedura di arricchimento. Nel caso di quantità di DNA inferiori ai valori minimi indicati, Genomnia è comunque disponibile a valutare con il cliente la fattibilità dell'esperimento, collaborando per l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali.

Materiale di partenza	Quantità (ng)
DNA genomico	500 - 5000
DNA arricchito in zone metilate (MBD)	10 - 100

Analisi Bioinformatica

L'analisi bioinformatica di esperimenti di metilazione è disponibile in due livelli diversi.

Nell'analisi bioinformatica di primo livello [MBD-BF01], dapprima allineiamo le sequenze al genoma di riferimento ed elaboriamo le statistiche di mappaggio. Generiamo metriche di qualità e diagnostiche di arricchimento in formato testuale e grafico ed identifichiamo tramite una procedura proprietaria basata sul pacchetto analitico Bioconductor MEDIPS le regioni genomiche metilate.

Nell'analisi bioinformatica di secondo livello [MBD-BF02] identifichiamo regioni differenzialmente metilate in concordanza alle comparazioni associate al progetto. Viene poi eseguita una annotazione a livello di struttura genica delle regioni differenzialmente metilate, seguita dall'analisi funzionale dei geni differenzialmente metilati.

Nell'analisi bioinformatica di terzo livello [MBD-BF03], eseguiamo tutte le analisi descritte in MBD-BF01. In aggiunta, stimiamo la metilazione delle sequenze trasponibili ad elevata ridondanza (LINE, SINE) e conduciamo un'analisi differenziale di metilazione nelle famiglie di repeat seguendo le comparazioni associate al progetto.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. Catalogo
QC: Controllo di qualità e dimensioni di DNA MBD/CHIP arricchito	DNA05
QC: controllo di qualità di preparazioni di DNA	DNA06
Arricchimento per MBD da DNA genomico	MBD
Preparazione di libreria DNA con codice a barre	LDb
Sequenziamento forward 200 bp tags con codice a barre	SEQI200B
Analisi Bioinformatica I: Metilazione (identificazione delle regioni metilate)	MBD-BF01
Analisi Bioinformatica II: Metilazione (analisi di metilazione differenziale)	MBD-BF02
Analisi Bioinformatica III: Metilazione (analisi differenziale delle LINE/SINE)	MBD-BF03