

lezione 19-20

martedì 1 Dicembre 2009

corso di genomica

a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

corso di laurea specialistica
magistrale Biotecnologia

lezione 11 Dicembre sequenziamento shot-gun metodo
pyrofosfato 454 e 480 Roche. Dr.L.Rodriguez

lezione 15 Dicembre Programmi informatici per confronti
genomici. Dr.P. D'addabbo

The logic of chromatine architecture

Bradley R. Cairns

Nature vol 461, 10 September 2009, p.p.193-198

doi. 10.10.38 /nature08450

The regulation of gene transcription involves a dynamic balance between packaging regulatory sequences into chromatin and allowing transcriptional regulators access to these sequences. Access is restricted by the nucleosomes, but these can be repositioned or ejected by enzymes known as nucleosome remodellers. In addition, the DNA sequence can impart stiffness or curvature to the DNA, thereby affecting the position of nucleosomes on the DNA, influencing particular promoter 'architectures'. Recent genome-wide studies in yeast suggest that constitutive and regulated genes have architectures that differ in terms of nucleosome position, turnover, remodelling requirements and transcriptional noise.

Chromatine architecture and remodelling at promoters

DNA is wrapped around histone octamers to form nucleosomes
primarely structure of chromatine

nucleosomes compact DNA but restrict access to DNA binding
by transcription factors

balance { access
 { packaging chromatine packaging for gene regulation

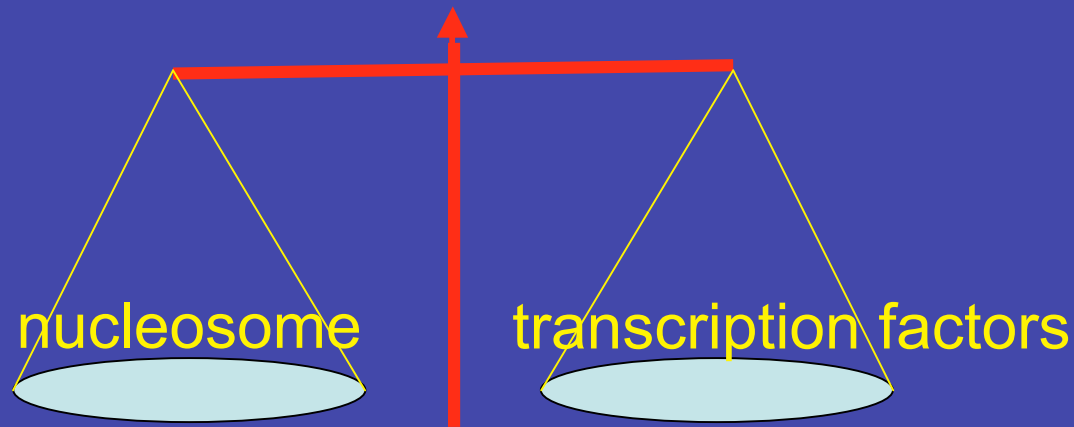
packaging shape for chromosome territories collocation

dynamic competition { nucleosomes
 { transcription / DNA binding factors



cis regulatory sequences / promoters

competition / balance



regulated by chromatin modifying, remodelling nucleosomes

reposition, reconfigure, eject nucleosome

= chromatin remodelling enzymes

generate, determines:

modification of promoters and cis regulating regions architecture

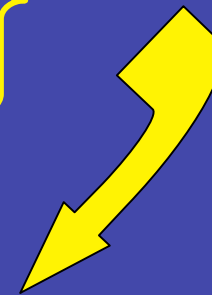
exposition of regulatory sites - activation in appropriate conditions

chromatine remodellers

create promoter architecture: density, composition, location of nucleosomes exposing and masking cis regulatory regions

WGA studies of nucleosome occupancy }

new computational approaches }



biophysical proprieties of promotor DNA

predict nucleosome positioning and density of repressed or repressed promoters: logic bases of remodelling and regulation of chromatine architecture of Pol II promoters

organismo di riferimento: lievito

lavori sul genoma di lievito contrapposizione :

- promotori costitutivi
- promotori altamente regolati

architetture diverse

WGA recenti sulla disposizione e dinamica dei nucleosomi mostrano in lievito una minoranza di geni con architettura dei promotori che portano una delle due strutture di riferimento (costitutive o regolate) e che hanno le due forme di regolazione.

inoltre evidenze di strutture mescolate (blended) che concentrano i due tipi di forme “contrastanti”.

le due strutture contrastanti estreme

collocazione e densità dei nucleosomi analizzati su molte specie e tipi di cellule

evidenze dal lievito (molto studiato, diverso dai mammiferi per il maggior numero di geni attivi contemporaneamente):

una minoranza di promotori con caratteristiche “aperte o coperte” con i due tipi estremi “costitutivi o regolati”

- La sequenza del DNA influenza il panorama della cromatina
- I nucleosomi bloccano l'accesso ai fattori di trascrizione
- I chaperoni istonici regolano la dinamica dei nucleosomi
- I rimodellatori della cromatina alterano i nucleosomi
- Fattori di trascrizione pionieri hanno “consensus” tra nucleosomi o sotto”
- I fattori di trascrizione reclutano i modificatori degli istoni
- H2A.Z sta in molti promotori e regola positivamente
- Il nucleosoma +1 regola inizio o pausa della Pol II

classico o barocco?

geni costitutivi e promotori aperti

competizione dinamica tra nucleosomi (istoni) e trans-factors

promotori costitutivi favoriscono il legame dei transc-fact a spese dei nucleosomi

geni costitutivi “open” con grandi regioni senza nucleosomi
circa 150 bp (NDR nucleosome deplet. regions) a monte del
TSS = transcription starting site, dove stanno cis- reg- regions
dette “nucleosome free” ma meglio “nucleosome deplet. reg.”

gradiente di eliminazione dei nucleosomi e non perdita totale o costitutiva.

struttura delle NDR

NDR contengono tratti di dA:dT seq che resistono al “bending” avvolgimento impediscono la formazione dei nucleosomi e stabilità

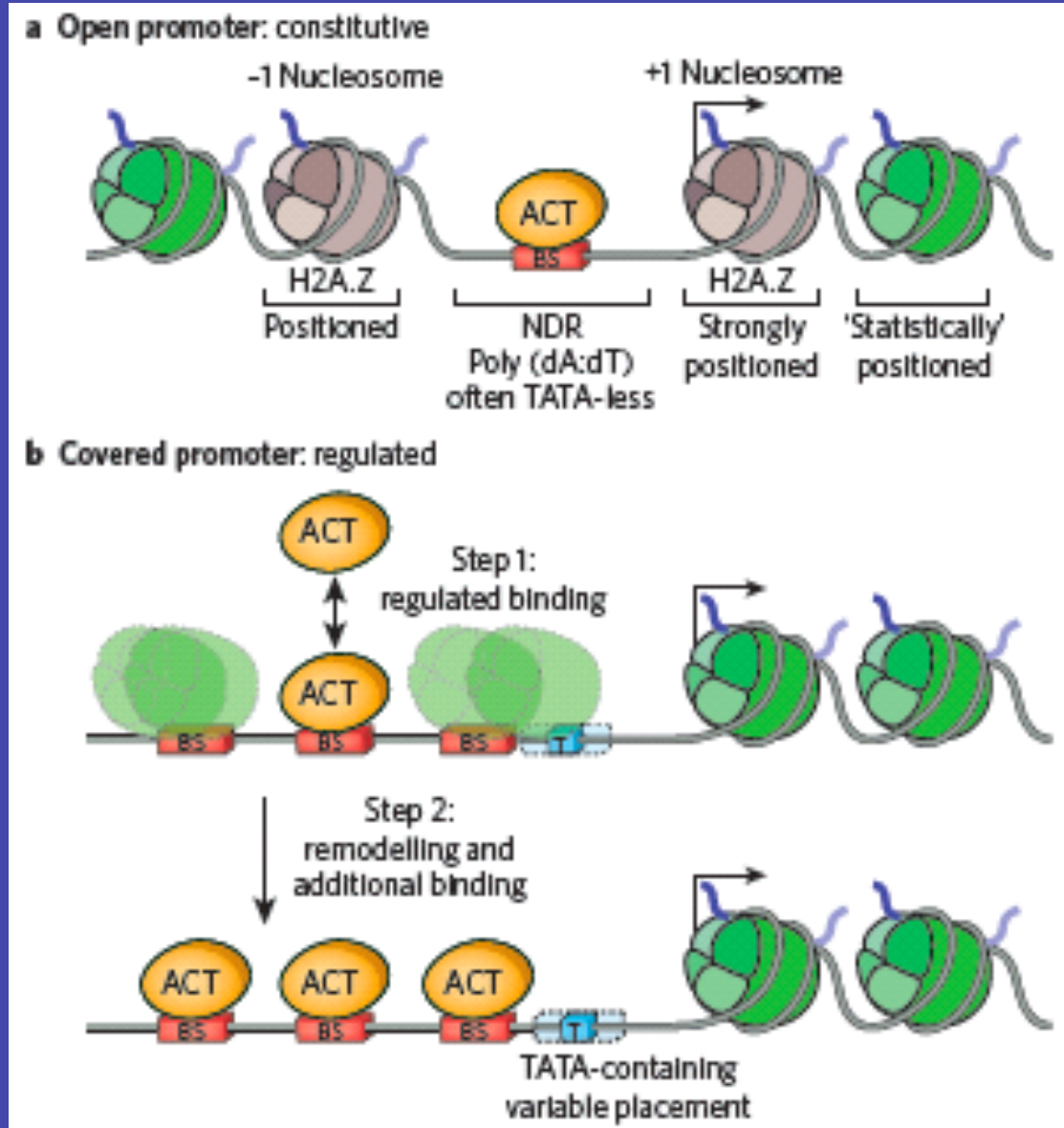
contrasto con coppie dinucleotidiche AA/TT ripetute ogni 10 bp
con dinucleotidi GC fuori fase di 5 bp: provocano curvatura favorevole alla formazione e stabilità dei nucleosomi,
oltre ~ 150bp servono come “nucleos. positioning seq.” (NPS)
poly dA:dT seq hanno più rilievo per la traslazione dei nucleos.

I promotori aperti spesso hanno questi due tipi di sequenze:
tratti poly dA:dT centrali che elimina il legame ai nucleos,
fiancheggiati da NPS = a nucleosomi -1 e +1

vedi figura 1

NDR= nucleosome depleted region

fig 1. position of nucleosomes



legend to figure 1

Figure 1 | Properties of open and covered promoters. a, Open promoters have a depleted proximal nucleosome adjacent to the transcription start site (TSS, black arrow), a feature common at constitutive genes. b, Covered promoters have a nucleosome adjacent to the TSS in their repressed state, a feature common at highly regulated genes. The figure depicts features more common in each contrasting promoter type, but most yeast genes blend the features shown to provide appropriate regulation. Green nucleosomes contain canonical H2A, whereas brown nucleosomes bear H2A.Z. Binding sites (BS) for transcriptional activators (ACT) are shown. These are mainly exposed for open promoters and mainly occluded by nucleosomes (in the repressed state) at covered promoters. Covered promoters typically have nucleosome positioning sequence elements of varying strength and locations that help define nucleosome positions (faded green) and promoter architecture. NDR, nucleosome-depleted region.

perchè -1 e +1

nei geni umani/mammiferi il nucleosoma -1 sta prima del TSS

(minor numero di geni NDR rispetto ai lieviti, perchè il numero di geni costitutivi è minore rispetto al n. totale mentre il lievito ne ha molti accesi ad ogni ciclo anche per minor differenziamento di cellule)

il posizionamento di una regione che esclude un nucleosoma e una che lo inserisce serve come fine (sharp) confine che elimina l'invasione di nucleosomi nel NDR

molta affidabilità della predittività dell'analisi in silicio, corrispondenza tra vera posizione e computazionale dei nucleosomi sui NPS e tratti poly dA:dT

-1 e +1 posiz. di nucleos. nei promotori aperti = regola forte

modelli computazionali usano informazioni dalla ricostituzione in vitro di nucleosomi per predire la posizione di nucleosomi in vivo:

Kaplan N. et al. Nature vol 458, 362-366 (2009).

open promoters

- le consensus x i fattori di trascrizione stanno a volte sulle NDR non sepolte dai nucleosomi lontane a monte,
- l'esposizione sulle NDR facilita il legame degli attivatori e la trascr. espressione genica.

in lievito sono associati a geni essenziali e legati da attivatori che a loro volta sono essenziali per la sopravvivenza

- nucleosomi con Histone H2A variante H2A-Z (Htz1 in lievito) al nucleosoma -1 e al +1
- scarsa presenza di seq.TATA (siti di legame per la TATA bind. prot. TBP)

promotori di geni regolati

allo stato represso TSS spesso sono coperti dai nucleosomi e anche i siti di binding degli attivatori di trascrizione.

sono chiamati “covered promoters” meglio di “closed”
(i nucleosomi coprono e non chiudono i promotori vicini)

nei promotori coperti i nucleosomi competono con i fattori di trascrizione per occupare i siti di legame cis-regolatori chiave

promotori più affidabili dei costitutivi aperti nel rimodellamento della cromatina e nell'aiuto agli enzimi modificanti per scoprire i siti cis per permetterne l'attività.

tipica presenza di siti NPS di forza varia per aiutare il posizionamento dei Nucl. sui siti di legame dei trans-factors

TSS transcription start site; NPS nucleosome positioning site

almeno un sito esposto

- c'è almeno un sito tipico esposto per un fattore di trascr. nella regione di legame tra due nucleosomi c'è almeno un sito di binding o parzialmente esposto
- questo sito esposto permette ad un fattore di trasc. di funzionare da pioniere per l'accesso al promotore
- modificazione della cromatina e “remodelling” è richiesta per esporre gli altri siti necessari ancora nascosti dai nucleosomi
- modello a due passaggi
- esempio classico il promotore del gene PHO5 di lievito (phosphate pathway gene)

promotore di PHO5

- esposto un sito per l'attivatore Pho4 tra due nucleosomi contiene altri siti di Pho4 sotto i nucleosomi
- sensibilità di modulazione di risposta all'induzione a seguito del collocamento diverso e legame di Pho4 nell'architettura del promotore PHO5
- modulazione dovuta all'abbondanza del Pho4 che determina la soglia iniziale dopo il legame del sito esposto
- solo siti esposti ad alta affinità sono occupati ed accesi con concentrazione media del fattore Pho4
- l'affinità dei siti coperti sta all'estremità opposta (bassa)

altri fattori pionieri

recettore dei glucocorticoidi non ha bisogno di esporre nel linker del nucleosoma il sito di legame, invece i siti simili (cognate) sulla faccia del nucleosoma legano una sola faccia del DNA e accomodano la curvatura del nucleosoma

questo permette il legame al promotore senza avere una posizione prestabilita sul nucleosoma

altre differenze dai promotori scoperti

TBP transcription initiation factor presente su promot. Pol II richiesto sia su siti TATA + che TATA -

- TATA box in lievito presente ~ in 20-25% dei geni
- più presente nei promotori coperti e altamente regolati rispetto ai costitutivi
- distanza TATAbox da TSS ~ 25-125bp nei vertebrati
- TATA in promot. scoperti sta in NDR e vicina al TSS ~50bp
- TATA in promot coperti sta in posiz. variabili e tipicamente all'angolo prossimale del nucleosoma con blocco parziale

TATA parzialmente coperto

la parziale copertura della TATA box implica un rimodellamento della cromatina per l'esposizione (come per transcr.factor sites)

movimento della TATA box di PHO5 poche basi all'interno o esterno del nucleosoma cambia (reliance) la dipendenza dal rimodellamento della cromatina

Geni con TATA box usano TBP nel complesso TFIID

Geni senza TATA box fanno assegnamento ad un complesso contenente TBP diverso = SAGA*(lievito);

-*pCAF/GCN5 in umani = molti fattori che interagiscono con fattori di trascrizione basali e modificatori di Istoni come HAT=histone acetyl transferase Gen5/pCAF

- induzione di H2A.Z- movimento nucleosoma- espulsione e trascrizione costitutiva

rimodellatori specializzati della cromatina

i rimodellatori della cromatina essenziali per costruire lo stato iniziale delle cromat. e le transizioni agli stati alternativi usando idrolisi di ATP

rimodellatori = macchine multiproteiche chiamate secondo le funzioni: ISWI family (eccetto NURF e Isw1b) x l'assemblaggio, organizzazione e collocamento spaziale

- SWI/SNF family - accesso ai nucleosomi e movimento del DNA o espulsione
- SWR1 family - ricostruzione dei nucleosomi con inserimento della variante H2A.Z specializzando il nucleosoma
- CHD e INO80 sono altri rimodellatori

ISWI rimodellatori organizzano nucleosomi

- rimodellamento dei nucleosomi che non hanno acetilazione: H4K16 = Lys 16 dell'istone H4 (attività su regioni inattive)
- spaziamento dei nucleosomi misurando lo spazio del DNA tra un nucleosoma e l'altro facendolo scivolare fino alla distanza giusta
- posiziona la serie di nucleosomi a distanze uniformi
- Isw2 organizza la cromatina di lievito per evitare
 - a) la trascrizione antisenso nelle regioni intergeniche;
 - b) la Pol II da trascrivere da siti di inizio criptici se non è ottimizzata la posizione dei nucleosomi
- Isw2 può spostare i nucleosomi in sequenze di DNA non favorevoli e producono repressione.

Promotore Pot1 di lievito

esempio di promotore “blended” misto :

- altamente regolato
- contiene poly dA:dT
- regioni cis-regolatorie che allo stato represso sovrappongono a nucleosomi

l'eliminazione di Isw2 fa muovere i nucleosomi dai poly dA:dT verso un collocamento che scopre una sequenza ed espone un Binding Site nel promotore e dereprime parzialmente il G.

indica che alcuni promotori usano ISW1 come rimodellatore che spostano i nucleos. in zone sfavorevoli occludendo TATA box e promotore ai fattori di trascrizione

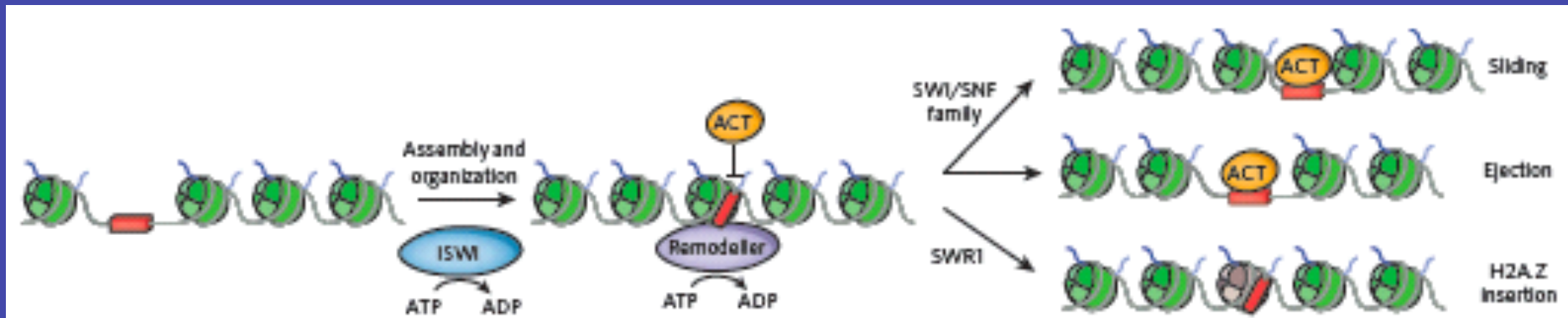
quale meccanismo

come può essere attivato un promotore simile in presenza di Isw2 (repressore: muove i nucleosomi verso DNA non permissivo)

modificazione della coda di H4 previene rimodellamento di Isw2 o fa attaccare un rimodellatore differente che sposta i nucleosomi da poly dA:dT esponendo la regione cis-acting attivando il gene

questa regolazione di operatori misti (coperti e scoperti) avviene tramite rimodellatori che spostano i nucleosomi e permettono di interpretare i diversi passaggi da + a -

Figure 2



Basic functions of chromatin remodellers in nucleosome dynamics. Remodellers use ATP hydrolysis to alter nucleosomes and are specialized for certain tasks. Most remodellers of the ISWI family (except NURF and Isw1b) help conduct chromatin assembly and organization and provide consistent spacing of nucleosomes. This organization can cover a binding site (red) for a transcriptional activator (ACT). SWI/SNF-family remodellers provide access to binding sites in nucleosomal DNA, mainly through nucleosome movement or ejection. SWR1-family remodellers reconstruct nucleosomes by inserting the histone variant H2A.Z into nucleosomes, specializing their composition. This can create an unstable nucleosome in certain compositional and temporal contexts, and might lead to ejection, sliding or reconstruction at promoters.