

lezione 29-30

martedì 12 Gennaio 2010

corso di genomica

a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

corso di laurea specialistica
magistrale Biotecnologia

esami: 1 febbraio

22 febbraio

11 marzo

come si studia l'epigenetica

l'epigenoma è il risultato delle trasformazioni della cromatina che partecipano alle funzioni regolative del genoma

trasformazioni della cromatina e non del DNA (la sequenza nucleotidica resta immutata)

cosa può cambiare nella cromatina ?

gli istoni (trasformazioni biochimiche) metilazioni, acetilazioni ecc

spostamento dei nucleosomi

il DNA stesso per la metilazione della Citosina

le implicazioni sono molte

“Epigenetics” was first mentioned by Conrad Hal Waddington in 1942, and originally meant to describe the process by which genotype gives rise to phenotype, i.e. through causal interactions among genes (gene networks) and their products (Waddington, 1942 C.H. Waddington, L'épigénotype, Endeavour 1 (1942), pp.18–20. Waddington, 1942).

Chromatin, epigenetics and stem cells

Tim C. Roloff, b and Ulrike A. Nubera, Corresponding Author Contact Information, E-mail The Corresponding Author

aMax Planck Institute for Molecular Genetics, Ihnestr   73, D-14195 Berlin, Germany

European Journal of Cell Biology

Volume 84, Issues 2-3, 9 March 2005, Pages 123-135

l'epigenoma e l'epigenetica

epigenoma riguarda le trasformazioni del genoma a livello cellulare, epigenetica studia la trasmissibilità di queste trasformazioni nelle generazioni successive.

L'epigenoma

Articolo : The mammalian epigenome

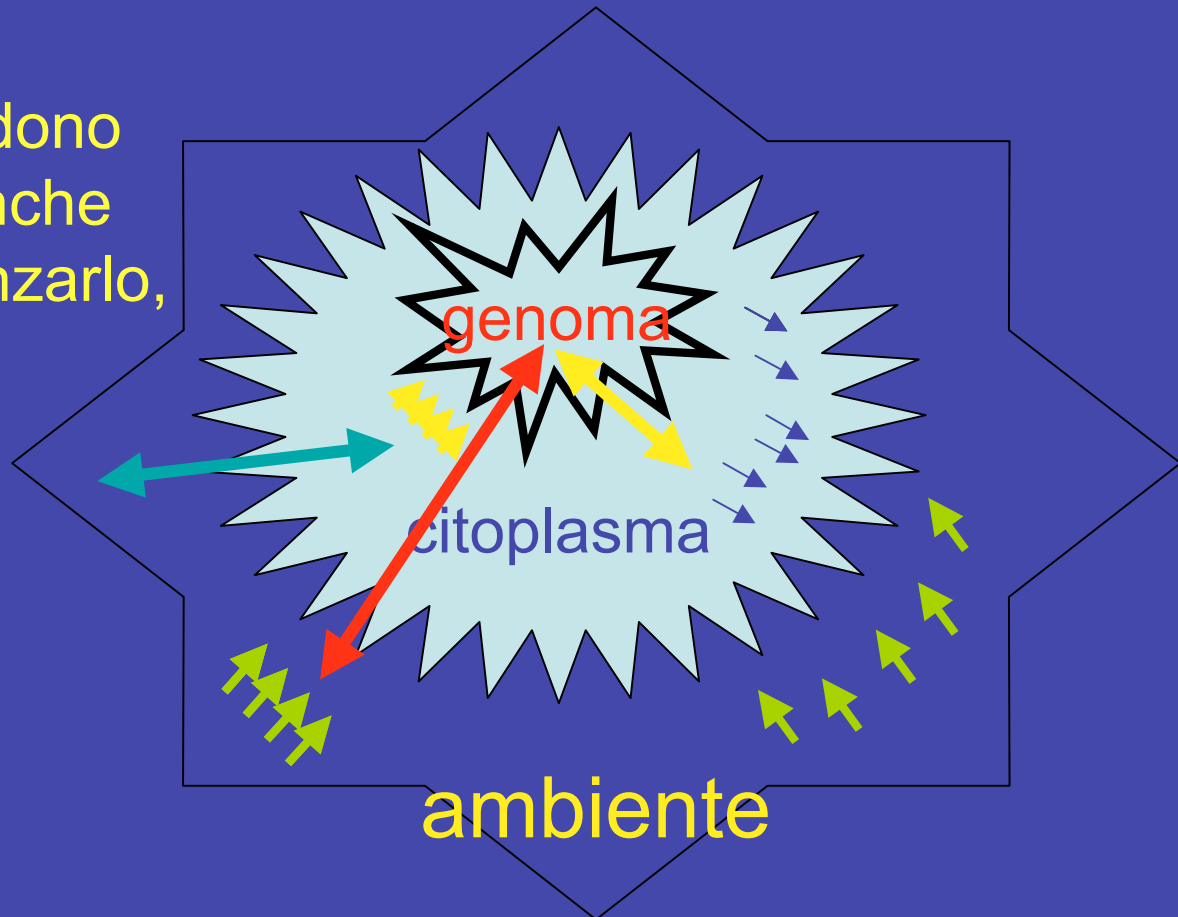
by Bradley E. Bernstein, Alex Meissner and Eric S. Lander

Cell vol. 128 pp 669-681; 23 Febbr. 2007

Interazione genoma - ambiente

Ambiente si intende
l'ambiente cellulare
dell'organismo

- gli epidemiologi intendono
l'ambiente esterno e anche
questo potrebbe influenzarlo,
ma non solo a livello di
epigenoma
- noi ci interessiamo
dell'ambiente interno
all'organismo



Due aspetti interconnessi

- trasformazioni degli istoni della cromatina e metilazione del DNA
- I due aspetti considerati sono interconnessi

Queste trasformazioni influenzano il funzionamento del genoma tramite i cambiamenti della struttura della cromatina na non del contenuto del DNA (quindi epi-genetici)

La struttura della cromatina cambia

- Durante lo sviluppo
- Nei diversi tessuti

Alcuni cambiamenti possono essere ereditati quando coinvolgono le cellule germinali

Questi ultimi aspetti sono più difficili da analizzare

Rapporto tra CpG islands Istoni e differenza di espressione

- Metilazione e istoni H3

Molte osservazioni sono state fatte sulle differenze tra tessuti normali e tumorali

- queste differenze influenzano l'espressione genica

- Le differenze di espressione osservate in quei casi sono attribuite alla diversa accessibilità al DNA

Gli istoni del nucleosoma

- Sono soggetti a più di 100 tipi di modificazioni postrascrizionali

Includono : acetilazione

metilazione

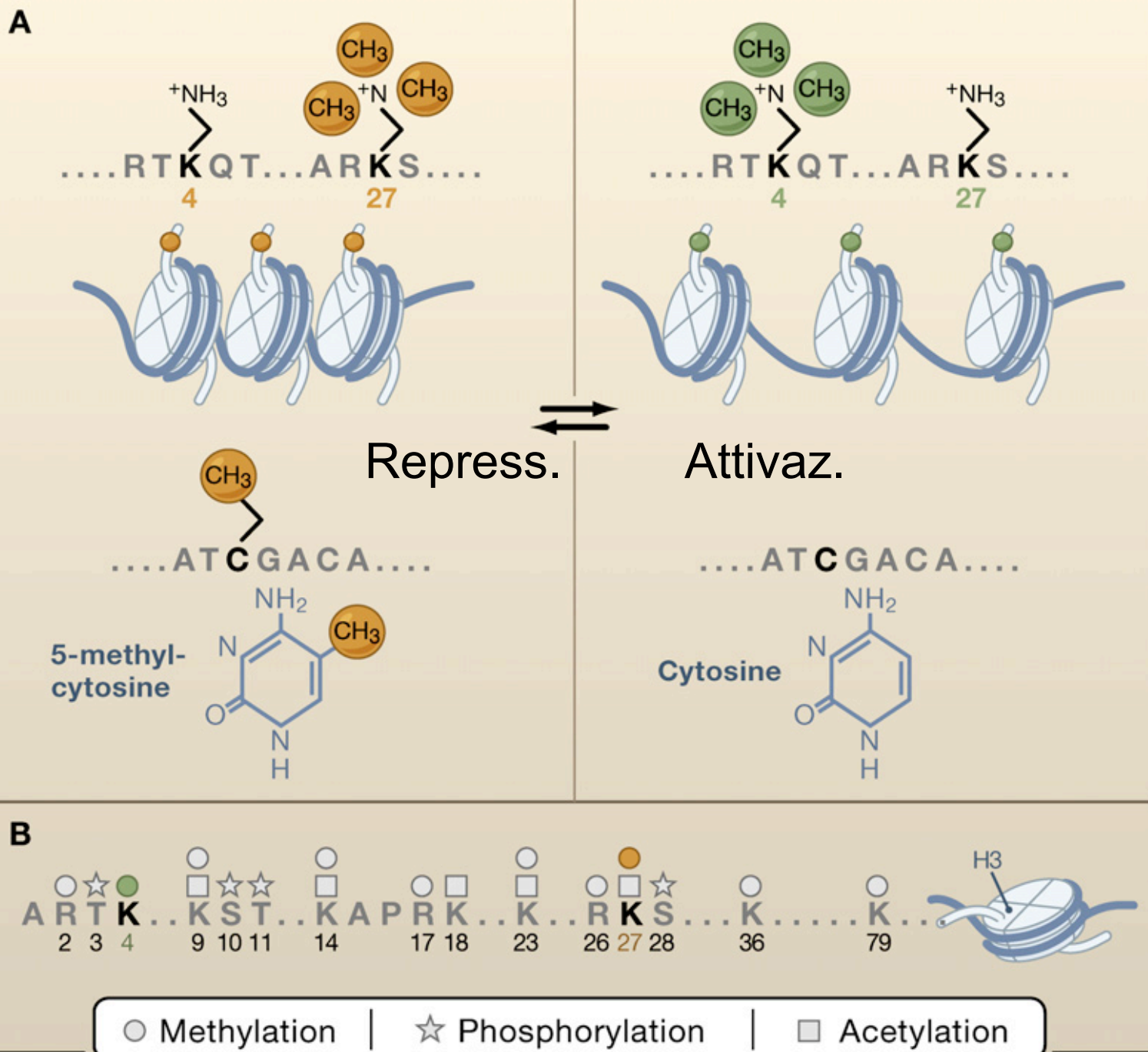
fosforilazione

glicosilazione

ubiquitinazione

e anche glut. transfer. (glutathionilati)

Principalmente in posizioni specifiche aminoterminali
delle code degli istoni



K lisina

A alanina

R arginina

S serina

P prolina

T treonina

Rapporto
tra istoni e
DNA

Metilazione istone H3

- H3K4 attivazione Recluta Chd1* = attivaz
- H3K27 repressione Recluta HP1** e Polycomb
compattano la cromatina

Diversa funzionalità con la metilazione in siti diversi

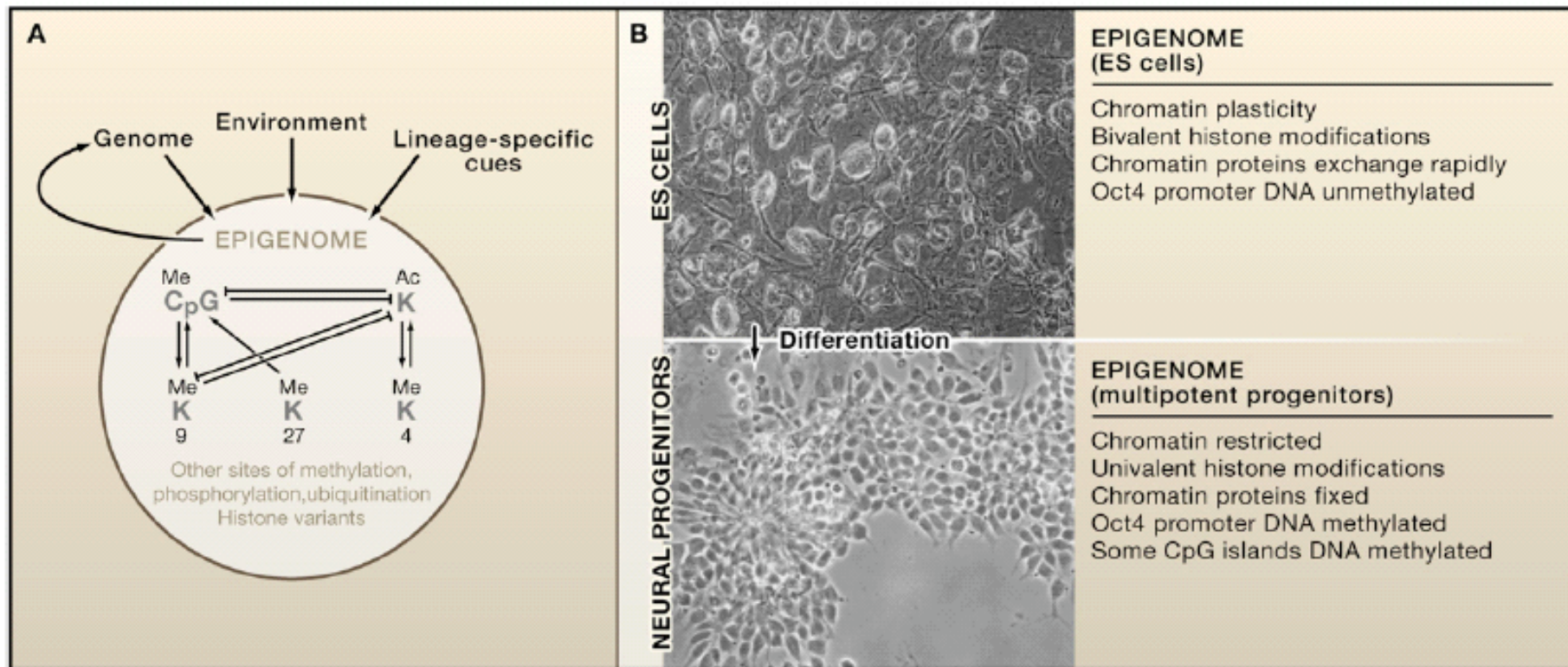
La lisina H3K27 trimetilata interagisce con Polycomb

La lisina H3K9 di e trimetilata interagisce con HP1

*chromodomain helicase DNA binding protein 1

**heterochromatin protein 1

esempio schema SNC



didascalia figura

Figure 2. The Epigenome Is a Complete Description of “Heritable” Modifications to DNA and Histone Proteins as They Occur across the Genome (A) The epigenome’s makeup within a given cell is a function of genetic determinants, lineage-specific cues, and environment. The different chemical changes interact to form a complex regulatory network that modulates chromatin structure and genome function (Margueron et al., 2005). (B) Several lines of evidence suggest that the epigenome of pluripotent embryonic stem cells is uniquely plastic (Meshorer et al., 2006; Vire et al., 2006; and references in text). Cell 128, 669–681, February 23, 2007 ^a2007 Elsevier Inc. 671

ereditabilità

- Si intende nelle mitosi

Quindi non nelle generazioni successive di organismo se è multicellulare (a meno di organismi unicellulari - lievito)

H3K27 e H3K4 metilate sono catalizzate da:
Polycomb group PcG e
trithorax group trxG

Si dissociano durante la mitosi per essere ereditabili in organismi multicellulari devono passare le meiosi

ruolo degli isolatori

essendoci regioni attive e non, devono esistere dei confini

come sono fatti questi confini ?

chi li regola ?

da dove deve partire l'attivazione di una regione specifica ?

in che verso deve avvenire l'attivazione di una regione ?

sono stati trovati degli isolatori e l'enzima CTCF è uno di questi ed è molto studiato e forse il più importante

Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions.

The architecture of human chromosomes in interphase nuclei is still largely unknown. Microscopy studies have indicated that specific regions of chromosomes are located in close proximity to the nuclear lamina (NL). This has led to the idea that certain genomic elements may be attached to the NL, which may contribute to the spatial organization of chromosomes inside the nucleus. However, sequences in the human genome that interact with the NL in vivo have not been identified. Here we construct a high-resolution map of the interaction sites of the entire genome with NL components in human fibroblasts. This map shows that genome-lamina interactions occur through more than 1,300 sharply defined large domains 0.1-10 megabases in size. **These lamina-associated domains** (LADs) are typified by low gene-expression levels, indicating that LADs represent a repressive chromatin environment. The borders of LADs are demarcated by the insulator protein CTCF, by promoters that are oriented away from LADs, or by CpG islands, suggesting possible mechanisms of LAD confinement. Taken together, these results demonstrate that the human genome is divided into large, discrete domains that are units of chromosome organization within the nucleus.

Authors: Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, van Steensel B.

Nature. 2008 May 7. [Epub ahead of print]

Determinazione dell'organizzazione di domini cromosomici umani tramite la mappa dei siti di interazione con la lamina nucleare

L'architettura dei cromosomi (chrms) umani in interfase mostra con studi di microscopia che alcune regioni si trovano vicino alla lamina nucleare (LN). Questo ha fatto pensare che certe regioni siano proprio attaccate alla LN creando una organizzazione spaziale dei chrms all'interno del nucleo, però non si conoscono queste sequenze specifiche. In questo lavoro (olistico) si analizzano tutti i siti di legame del genoma con la LN. Questa mappa mostra che le interazioni si trovano in più di 1300 domini di circa 0.1-10 megabasi definiti nitidamente. I domini associati alla Lamina (LADs) sono tipizzati da bassa espressione e quindi di cromatina in ambiente represso. I limiti dei LADs sono definiti dalla presenza di CTCF, da promotori orientati distalmente dai LADs o da isole CpG che suggeriscono il meccanismo di confinamento dei LADs

Questi risultati globalmente dimostrano che il genoma umano è diviso in grandi domini discreti e definiti che sono unità di organizzazione cromosomiale all'interno del nucleo.

Effetti della citosina metilata

- Può promuovere
- o reprimere

il reclutamento di proteine regolatrici

Le proteine che legano CpG possono mediare la repressione con l'interazione delle acetilasi istoniche

Oppure escludere il legame di proteine come con CTCF con l'istone H19

Le isole CpG

- Presenti in regioni ricche di GC

Rappresentano lo 0.7% del genoma umano e contengono il 7% di dinucleotidi CpG

Lo stato demetilato delle CpG nella linea germinale suggerisce : il sistema di riparo di mismatch trova e corregge la deaminazione della Citosina (Uracile) ma non della metil-Citosina (Timina)

60% dei promotori umani hanno isole CpG

Si pensava che le isole CpG fossero tutte demetilate invece alcune sono rimetilate in maniera tessuto specifica nello sviluppo

Definizione di CpG

- Regione di ~ 200bp con contenuto G/C ~ 50%
- Rapporto osservate/attese 0.6
- Assenze di sequenze Alu

Correlano con geni tessuto specifici

Studi genomici del “Methylome” di differenza di metilazione tra CpG di isole e non in cellule normali e patologiche

Studio tramite sequenziamento col bisolfito
(Citosina diventa Uracile e mCitosina resta Citosina)

Sequenziamento col “Bisulfito”

- Principio: il bisulfito di sodio (sbianca e conserva il vino bianco dei castelli e fa venir mal di testa, non fa bene)

converte la Citosina non metilata in Uracile

Citosina non metilata si leggerà come Timina (PCR)
Citosina metilata resta Citosina

All'inizio studiata nel locus MHC

Il 9.2% delle 511 isole CpG analizzate era metilato

Il 50% dei CpG dei 5'UTR erano iper-metilate

70% dei siti hanno uguale profilo metilato in uomo e topo

studi su differenti stati di metilazione

- Cancro della mammella

Pattern di metilazione diverso a diversi stadi e tipi di tumore

Profili di metilazione nelle cellule staminali ES e differenziate

La media di metilazione trovata era del 35%

Studi su 150 geni

Alcuni studi concentrati sui cromosomi 6, 20, 22

Studi su larga scala (olistici) di modificazioni degli istoni

Metodologia tramite ChIP on chips (micro-array)
di oligonucleotidi

ChIP chromatin immunoprecipitation (di istoni o bind prot.)

Studi non su geni noti ma su unità trascrizionali e regolative lungo i cromosomi per definire i margini delle regioni genetiche con istoni modificati

Molto descrittivo dell' epigenoma

Acetilazione degli istoni

Locus B-globina : istoni acetilati associati ai promotori dei geni alla “locus control region”, e secondo lo sviluppo

Nelle cellule T ben 50'000 siti di acetilazione corrispondono a siti di inizio di trascrizione in isole CpG ricche in GC

Il 50% dei siti acetilati sono loci intergenici altamente conservati uomo / topo

Perché l'uomo sarebbe diverso dagli altri animali ?

perchè non riesce a pensare alla conservazione dell'ambiente in cui vive

Omologie acetilazione metilazione dell' istone H3

Porzioni non ripetitive dei chrms 21 e 22 e geni ortologhi
uomo - topo :

Acetilazione di H3 e trimetilazione H3K4 hanno pattern circa
identici in topo e uomo

Esiste una colocalizzazione dei vari attivatori di modificazione
degli istoni (conservazione nei mammiferi)

L'estensione del contributo di altre modificazioni con una
maggiore complessità funzionale della cromatina compreso il
codice istonico non è chiara

PcG proteins in epigenetic maintenance

Le proteine PcG nel mantenimento epigenetico

Le proteine Polycomb essenziali per mantenere le ES

Richieste per mantenere la pluripotenza delle ES
fortemente represses dopo il differenziamento

Il complesso repressivo 2 PRC2 catalizza la metilazione di H3K27

PRC1 lega H3K27 metilato e media il compattamento della cromatina

Studi di ChIP on chips per mappare siti di legame PRC2* su cellule staminali umane

* polycomb repressive complex

Con microarrays si possono mappare migliaia di siti in una sola volta

Trovati più di 1000 geni target*

La maggiorparte con H3K27 trimetilato

*Comprendenti molti geni regolatori come geni homeo-box

Studio simile per mappare siti PRC1 e PRC2 su ES murine

Bracken et al 2006, dimostrato che con siRNA knock-down si dereprimevano alcuni subsets di geni controllati dalla metilazione istonica mediata da PRC1 e PRC

Regioni di metilazione H3K27

L'estensione delle regioni di metilazione H3K27 e legame dei complessi PcG

Arriva a 35 Kb per geni regolatori dello sviluppo

Ridotte e circoscritte per altri tipi di geni (Lee et al 2006, JBC)

Questi domini attivatori sono anche occupati da trxG con la proteina MLL1 (mixed lineage leukemia 1)

Domini arricchiti anche da H3K27 che marcano geni repressi e H3K4 trimetilati che marcano geni attivi

Il pattern identifica i diversi tipi cellulari

Memoria epigenetica

I domini di cromatina teoricamente identificano una forte memoria epigenetica per mantenere espressione o repressione di geni critici specifici di linea

Mentre le modificazioni istoniche di singoli punti potrebbero essere persi alle mitosi per segregazione random

Si ipotizza che i grandi domini siano ereditati in blocco nelle cellule figlie su tutti e due i filamenti favorendo modificazioni simili sugli istoni depositati (legati alla cromatina)

Molti di questi studi derivano da Drosophila

Regioni bivalenti

Con studi Chip on chip

Overlap di regioni con metilazione sia di H3K4 che H3K27 su stessi loci e stessi cromosomi (Bernstein, 2006)

Apparentemente contraddittorio (attivaz. repress.)

Altri studi di colocalizzazioni sono simili in cellule pluripotenti ES murine (Azuara et al 2006)

Queste regioni bivalenti sono a struttura aperta per lo stato di replicazione early atipica per la cromatina associata a PcG

Forse le regioni bivalenti non sono solo di cellule ES ma anche di linfociti T

da Genoma a Epigenoma

Table 1. Genome to Epigenome

Genetic Feature	Epigenetic Feature	Correlation of Genetic and Epigenetic Feature		Notation
		ES Cells	Differentiated Cells	
CpG islands	DNA methylation-free	Strong	Moderate	Genomic principles suggest CpG islands methylation-free, yet some are methylated in differentiated cells
CpG islands	H3K4 methylation	Strong	Moderate	In differentiated cells, some CpG islands lose H3K4 methylation
Transposon-free regions	H3K27 methylation	Strong	Moderate	In differentiated cells, some transposon-free regions lose H3K27 methylation, while other regions gain this mark
Conserved noncoding elements	H3K27 methylation	Variable	Variable	Domains of PcG proteins and H3K27 methylation coincide with clusters of highly conserved noncoding elements
Repetitive elements	DNA methylation	Strong	Strong	Repetitive elements silenced by DNA methylation
Repetitive elements	H3K9, H3K27, H4K20 methylation	Variable	Variable	Dependent on repeat class and developmental stage

Correlations between genetic and epigenetic features are shown for pluripotent ES cells and differentiated cells. The correlations tend to be more significant in ES cells, suggesting a potentially important role for DNA sequence in defining the newly reprogrammed epigenome (see text for references).

Ruolo della sequenza del DNA

In cellule staminali ES associazione tra strutture genomiche e pattern di metilazione di istoni

Coincidenza tra CpG islands e metilazione H3K4

Relazione casuale tra complessi trxG che catalizzano metilazione H3K4 che contengono domini che legano dinucleotidi CpG non metilati (cioè espressi)

Siti di inizio di trascrizione con domini H3K4 metilati coincidono con regioni di più di 10Kb quasi senza trasposoni