

# Lezione XXVII-XXVIII

giovedì 1-XII-2011

corso di genomica

Laurea Magistrale Biotecnologia Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

libro consigliato Zanichelli “Introduz. alla genomica” di  
Arthur M.Lesk

D. Frezza

# Salti di grandezza scalare di analisi



Capacità di analisi limitate della cromatina, o macro con FISH o molecolare con Hi-C (3-4-5 C). Metilazione siti G-C, istoni H3 ecc., resequencing (polimorfismi). Per ora è mancante un livello intermedio di analisi per correlare posizione ed attività diretta per esempio per capire dove e come agiscono i geni omeotici. Definizione nello spazio tempo durante lo sviluppo. La definizione dei somiti per ora è come se sfuggisse ad avere un modello con un criterio definibile per descriverne il funzionamento ad un livello alto e generale. Il livello di definizione è di morfologia e biologia cellulare/molecolare con topi transgenici. Chi controlla chi nella gerarchia fino all'ultimo passaggio fatto poi dai fattori di trascrizione, ma possibile solo se la cromatina si è disposta nella posizione giusta. Il confinamento nel nucleo come avvenga è assolutamente un mistero, si è visto che esiste e ben definito con i vari lavori visti fino ad ora. Adesso passiamo ad un livello più basso non infimo.

# The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters



**Abstract:** 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<sup>1</sup>. 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.

# Riassunto articolo Cairns Nature



Bradley R.Cairns, Nature vol 461, 10 Sept.2009, pp 193-198

la regolazione della trascrizione genica comporta un equilibrio dinamico tra sequenze regolative dell'impacchettamento della cromatina ed accesso dei regolatori che permettono la trascrizione di queste sequenze. L'accesso è limitato dai nucleosomi, ma possono essere riposizionati o espulsi da enzimi chiamati rimodellatori dei nucleosomi. Inoltre la sequenza del DNA può dare rigidità o curvatura influenzando la posizione del nucleosoma sul DNA e particolarmente l'architettura del promotore. I recenti studi wide-genome nel lievito suggeriscono che i geni costitutivi o regolati hanno architetture che differiscono in termini di posizione dei nucleosomi, turnover, necessità di rimodellamento e rumore di trascrizione (trascrizione di fondo).

# Struttura -nucleosoma DNA



Il DNA eucariotico è avvolto intorno agli istoni per formare il nucleosoma che è la struttura primaria della cromatina. I nucleosomi impacchettano il genoma ma restringono l'accesso alle "binding prot" come i fattori di trascrizione. C'è un equilibrio da battere tra l'impacchettamento e l'accessibilità. Le cellule imbastiscono la via con cui si impacchetta la cromatina per modulare la regolazione genica. Questa competizione dinamica coinvolge l'equilibrio della cromatina con regioni cis-regolatorie, fattori di trascrizione e nucleosomi. Enzimi che competono con i nucleosomi li modificano in modo covalente (chromatin modifiers) e enzimi che li riposizionano e riconfigurano o espellono i nucleosomi (chromatin remodellers). Questi fattori insieme aiutano a creare l'architettura del promotore, definita come densità, composizione e posizionamento del nucleosoma relativamente ai siti cis-regolativi più importanti.

# recent WG studies



Collocazione dei nucleosomi studiata con WGS ed approcci computazionali hanno rinforzato l'ipotesi che le proprietà bio-fisiche del DNA-promotore servono a configurare il panorama del posizionamento dei nucleosomi e la densità ai promotori attivi e repressi. Nel lavoro si prende in considerazione questo equilibrio e si descrive la logica di base per la regolazione ed il rimodellamento della cromatina per i promotori della RNAPolimerasi II (Pol II).

Studio sul lievito che ha mostrato una sostanziale minoranza di geni che si conformano ad una architettura contrastante di promotori che stimolano geni regolati o costitutivi.

# approcci recenti



Descrizione delle architetture contrastanti costituite da strumenti (attrezzi) diversi usati per costruire e regolare questi promotori così come quelli misti (“blended” simili ai due sistemi) che incorporano forme delle due architetture contrastanti.

# Promotori ad architettura contrastante



La collocazione e densità dei nucleosomi e varianti degli stessi sono stati determinati in tutto il genoma di parecchi organismi e tipi cellulari (biblio articolo). Gli studi su lievito indicano che alcuni promotori (minoritari) possono essere classificati in due categorie architettoniche contrastanti : aperti e coperti che controllano due tipi di geni, costitutivi ed altamente regolati (tavola 1 e figura 1).

Queste architetture sono ai due estremi della regolazione mentre molti promotori hanno configurazioni miste delle due ed inoltre con strategie più complesse per raggiungere una regolazione buona ed articolata. Ciò nonostante è utile discutere di queste due architetture estreme contrastanti per capire la logica (meccanismi) dell'architettura di promotori per poi capire come e perché altri promotori possano mescolare gli attributi di questi archetipi per modulare la loro regolazione.

# Definizioni della box 1



- La sequenza del DNA influenza la panoramica della cromatina
- I nucleosomi bloccano l'accesso dei fattori di trascrizione al DNA
- le chaperonine istoniche regolano la dinamica dei nucleosomi
- i rimodellatori della cromatina alterano i nucleosomi
- i fattori di trascrizione pionieri hanno un tipico sito di legame sia in una regione col nucleosoma tolto o tra nucleosomi posizionati
- fattori di trascrizione reclutano i modificatori di istoni
- H2A.Z risiede in molti promotori e regola positivamente
- il nucleosoma +1 può aiutare a regolare sia l'inizio che la pausa della Pol II del promotore vicino.

# Geni costitutivi con promotori aperti



C'è una competizione dinamica tra i nucleosomi ed i fattori di trascrizione in molti promotori. Però i geni costitutivi hanno strutture che favoriscono il legame dei fattori di trascrizione a spese del nucleosoma (fig 1).

Chiamiamo questi promotori “aperti”. I geni costitutivi hanno tipicamente regioni di ~150bp con deplezione di nucleosomi (NDR nucleosome depleted region) subito prima 5' del siti di inizio di trascrizione (TSS transcr. start site) in cui risiede il sito chiave con la sequenza cis-regolatoria. Questa regione è stata chiamata “regione libera da nucleosoma” ma essendoci un gradiente di deplezione più che una perdita totale è più appropriato il termine di deplezione anziché perdita. La NDR contiene dei tratti di poly dA:dT che resistono alla piegatura per respingere la formazione e stabilità del nucleosoma.

Al contrario la sequenza con AA/TT dinucleotidi ripetuti ogni 10 bp con GC dinucleotidi fuori fase di 5 bp, impongono una curvatura favorevole alla formazione e stabilità del nucleosoma e se si estende su una regione di ~150bp può funzionare come NPS (nucleosome position sequence).

# Struttura dei promotori aperti I



Però il tratto poly dA:dT è considerato più importante nella traslazione del NPS. I promotori aperti spesso combinano queste sequenze in una struttura tripartita: al centro dA:dT (nucleosome binding site) che distoglie, sfavorisce il legame al nucleosoma, fiancheggiato da due NPS (nucleosome positioning seq.) che aiutano a fissare la posizione dei due nucleosomi fiancheggianti chiamati in lievito nucleosomi -1 e +1 vedi fig 1. Per i geni umani il -1 nucl. è posizionato direttamente a monte del TSS. La giustapposizione del sito di esclusione e di posizionamento aiuta a creare dei confini ai nucleosomi eccezionalmente definiti che eliminano l'invadenza dei nucleosomi nella NDR (Nucl. Depl. Reg). La posizione +1 e -1 del nucleosoma nei promotori aperti coincide abbastanza precisamente con la predizione con programmi di computer preparati con tratti NPS e/o poly dA:dT. I modelli computazionali più recenti usano informazioni dalla ricostituzione dei nucleosomi su tutto il DNA genomico *in vitro* per predire la posizione della maggior parte dei nucleosomi *in vivo*. Ciò sottolinea il grande avanzamento nella predizione computazionale. La risoluzione in lievito è maggiore forse perché viene trascritto un maggior numero più geni nel ciclo cellulare.

# struttura dei promotori aperti II



I siti di binding per gli attivatori trascrizionali nella NDR stessa non sepolti sotto i nucleosomi lontani a monte e la loro esposizione nella NDR promuovono il legame di attivazione e l'espressione genica. I promotori di lievito spesso legati a geni essenziali sono legati da attivatori che a loro volta sono essenziali. Ci sono altre due strutture correlate ai promotori aperti: un nucleosoma con una variante di istone H2A = H2A.Z (chiamato Htz1 in lievito) al nucleosoma -1 o +1 e una scarsità di sequenze TATA (il sito per la TATA binding prot. TBP) vedi tab 1 e fig 1.

# Tab 1 caratteristiche di promotori aperti o coperti



**Table 1 | Attributes correlated with open or covered promoters**

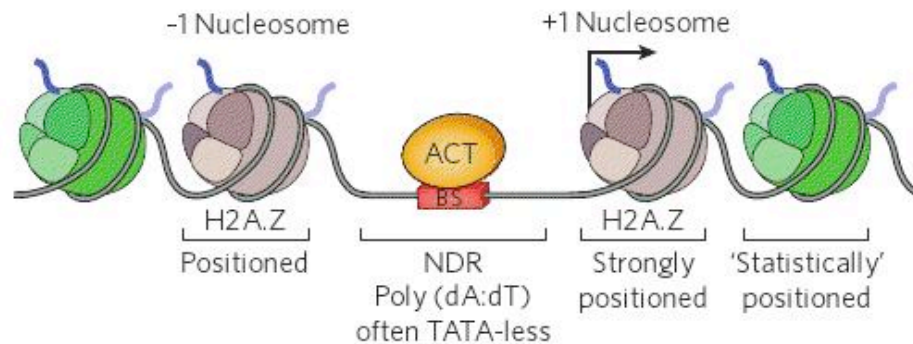
| Promoter type | Poly(dA:dT) tracts | Many TF binding sites | TATA box | H2A.Z variant | Histone turnover | Transcriptional plasticity | Transcriptional noise | Chromatin regulation | Condition regulation | Essential genes |
|---------------|--------------------|-----------------------|----------|---------------|------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| Open          | ++                 | –                     | --       | ++            | –                | --                         | –                     | –                    | –                    | ++              |
| Covered       | --                 | ++                    | ++       | –             | ++               | ++                         | ++                    | +                    | ++                   | –               |

Correlations: ++, strongly positive; +, moderately positive; –, moderately negative; --, strongly negative. TF, transcription factor.

# Figura 1



## a Open promoter: constitutive



## b Covered promoter: regulated

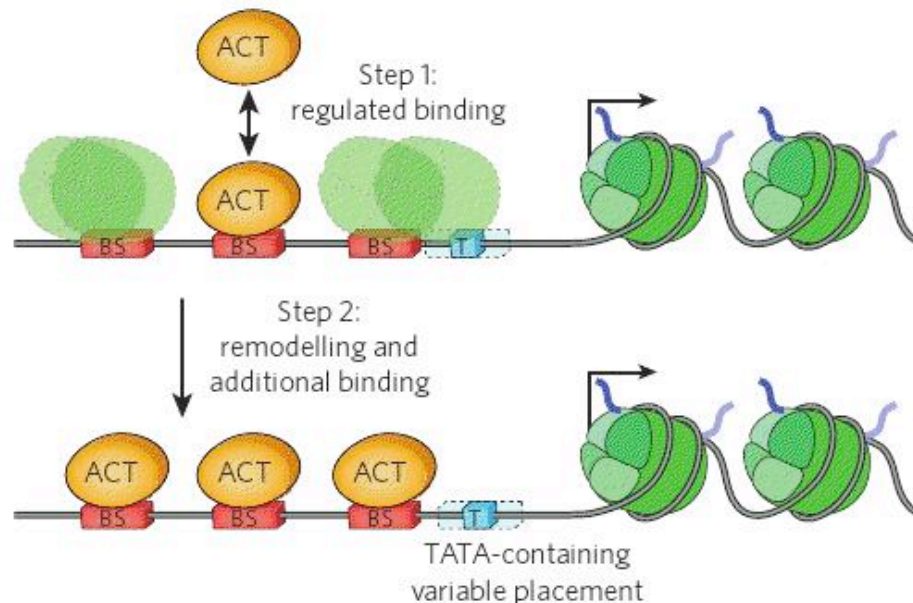


Figure 1 | Properties of open and covered promoters. a, Open promoters have a depleted proximal nucleosome adjacent to the transcription start site (TSS, black arrow; BS binding site) a feature common at constitutive genes. b, Covered promoters have a nucleosome adjacent to the TSS in their repressed state, a feature common at highly regulated genes.

# Legend to figure 1



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.

# Geni regolati con promotore coperto



I geni regolati nello stato represso di solito hanno il TSS e le regioni fiancheggianti con la maggior parte dei siti di legame per gli attivatori coperti da nucleosomi. Questi promotori li chiamiamo coperti, più intuitivo che non chiusi, visto che il nucleosoma copre il promotore prossimale. I nucleosomi effettivamente competono nei promotori coperti con i fattori di trascrizione per occupare i siti di legame chiave delle regioni cis-regolatorie rendendo più sicuri i promotori coperti di quelli aperti nel rimodellamento della cromatina. Gli enzimi modificanti sono facilitati ad aiutare a scoprire i siti cis-acting per permetterne l'attività. I promotori coperti contengono sequenze di posizionamento nucleosomico NPS (fig1). Almeno un sito di binding è tipicamente esposto nel DNA di unione tra due nucleosomi. Questo sito esposto permette ad un fattore di trascrizione "pioniere" di accedere al promotore. Modificazioni e rimodellamento della cromatina sono probabilmente richieste per esporre gli altri siti addizionali sotto il nucleosoma secondo il modello a due passaggi.