

Lezione XXIX-XXX

martedì 6-XII-2011



D. Frezza corso di genomica

Laurea Magistrale Biotecnologia Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

Esami: I appello Martedì 31 Gennaio

II appello Martedì 7 Febbraio

III appello Martedì 28 Febbraio,

A gennaio esercitazioni se arrivano i soldi per farle

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.

Promotori coperti



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.

Figura 1

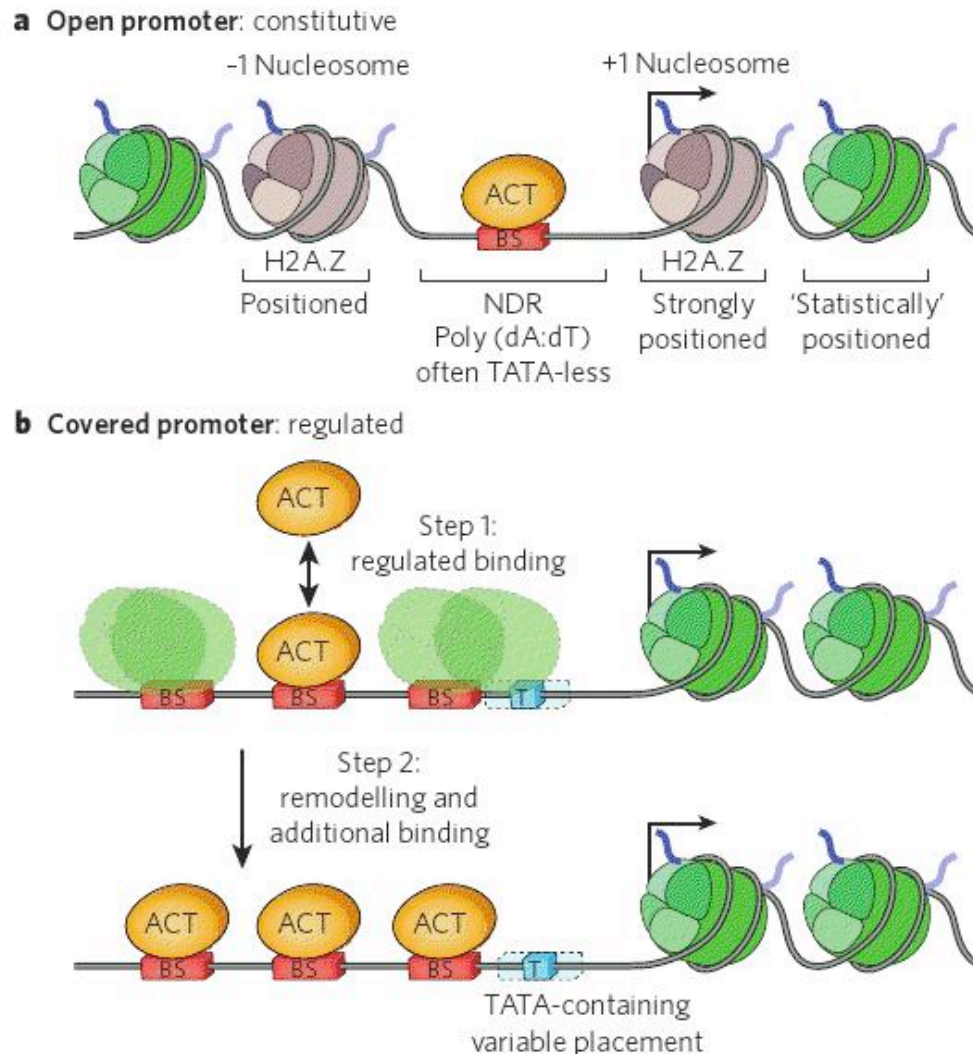


Figure 1 | Properties of open and covered promoters. a, Open promoters have a depleted proximal nucleosome adjacent to the transcription start site (TSS, black arrow; BS binding site) a feature common at constitutive genes. b, Covered promoters have a nucleosome adjacent to the TSS in their repressed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

esempi di promotore coperto



Un esempio tipico è il promotore di lievito del gene *PHO5* che ha un sito esposto per l'attivatore Pho4 tra due nucleosomi. Un lavoro recente su questo promotore mostra dinamiche diverse di risposta che si possono avere con piccole variazioni di collocamento e di siti di legame per Pho4 nell'architettura del promotore *PHO5*. Queste variazioni di architettura del promotore determinano la soglia iniziale per l'abbondanza del fattore Pho4 necessaria per occupare il promotore e cioè quanto Pho4 è necessario per l'attivazione iniziale. Solo promotori con siti ad alta affinità esposti sono occupati e accesi con livelli intermedi di Pho4, benchè l'affinità dei / del sito occupato (occluso) dal nucleosoma fissa il termine superiore del "range" dinamico di attivazione.

generalizzazione di *PHO5* di lievito



Per estrapolazione è facile immaginare come le combinazioni dei siti per diversi attivatori aiuti a modulare i promotori a rispondere a segnali cellulari multipli. Un subset di fattori pionieri (come i recettori dei glucocorticoidi) non richiedono l'esposizione nel sito linker e possono legare i loro siti simili sulla faccia del nucleosoma dato che legano solo una faccia del DNA e accomodare la curvatura del DNA al nucleosoma. Questo permette il legame del promotore senza avere prescritte le posizioni del nucleosoma. Differenza di Pr. coperti da Pr scoperti nell'inizio di trascriz.: il fattore di inizio della trascrizione TBP (trans bind prot) è presente in tutti i promotori Pol II.

altre caratteristiche di promotore coperto



Promotori coperti differiscono da quelli scoperti per altre caratteristiche dell'inizio della trascrizione.

La TBP presente su tutti i promotori della Pol II è richiesta per promotori con e senza TATA box. La TATA box è presente nel ~20-25% di geni di lievito ed è più arricchita nei promotori coperti che non aperti e nei geni altamente regolati che non costitutivi (tab.1). Nel lievito la distanza della TATA box può variare da 25bp (nei vertebrati) a 125 bp. I pochi geni aperti con TATA box hanno abbastanza vicino il TSS entro 50bp e sicuramente dentro il NDR (nucl. deplet reg).

TATA box di promotore coperto



La Tata box nei promotori coperti può avere posizioni più variabili e di solito risiedono nell'angolo del nucleosoma prossimale procurando un blocco parziale fig 1.

Questa disposizione variabile aumenta la richiesta di intervento per il rimodellamento della cromatina per esporre la TATA box come per esporre i siti di legame ai fattori di trascrizione.

Nel promotore per PHO5 spostando la TATA box solo di poche basi dentro o fuori l'angolo del nucleosoma cambia molto la disponibilità al rimodellamento. Molti geni con TATA box usano il TBP binding complex che contengono TFIID. Promotori senza TATA box funzionano con complessi diversi contenenti TBP. Sono chiamati SAGA in lievito e complessi pCAF/GCN5 in umani.

complessi SAGA/pCAF



I complessi SAGA/pCAF contengono fattori multipli che interagiscono con i fattori di trascrizione di base e con proteine che modificano gli istoni come la Istone acetil transferase (HAT) Gcn5/pCAF. Queste attività possono modificare H2A.Z ed altri nucleosomi prossimi ai promotori per iniziare il movimento del nucleosoma o l'espulsione promuovendo la trascrizione costitutiva. La plasticità al rimodellamento è maggiore su promotori coperti.

L'intero repertorio di rimodellamento della cromatina e dei fattori modificatori (soprattutto di lievito) per lo più nei promotori coperti c'è maggior disponibilità ai fattori rimodellatori della cromatina che non in quelli aperti.

rimodellatori della cromatina specializzati



I rimodellatori, importanti a livello dei promotori, aiutano a costruire gli stati iniziali della cromatina e a catalizzare i passaggi negli stati alternativi della cromatina utilizzando energia dall'idrolisi di ATP, fig 2. I rimodellatori sono macchine specializzate multiproteiche che possono essere classificate per la funzione: rimodellatori che appartengono alla famiglia delle ISWI (eccetto NURF e Isw1b) aiutano nell'assemblaggio ed organizzazione della cromatina conducendo al distanziamento giusto dei nucleosomi. Quelli nella famiglia SWI/SNF provvedono all'accesso al DNA dei nucleosomi attraverso lo spostamento o espulsione dei nucleosomi e quelli della famiglia SWR1 ricostruiscono i nucleosomi inserendo la variante istonica H2A.Z nel nucleosoma rendendolo specializzato. Non si inserisce la discussione sulle famiglie di rimodellatori con funzione specializzata CHD ed INO80.

I rimodellatori ISW1



A parte NURF ed Isw1b la famiglia dei rimodellatori ISWI determinano l'organizzazione del nucleosoma spesso con la repressione. Spesso intervengono rimodellando i nucleosomi che mancano dell'acetilazione di H4K16 (Lysina 16 dell'istone H4) e confermano lo stato trascrizionale dei nucleosomi in regioni inattive. Regolano lo spazio dei nucleosomi "misurando" il DNA linker tra i nucleosomi e scorrendo i nucleosomi finchè il DNA linker non raggiunge la distanza fissata, creando la serie di nucleosomi a distanza uniforme.

Figura 2 rimodellamento

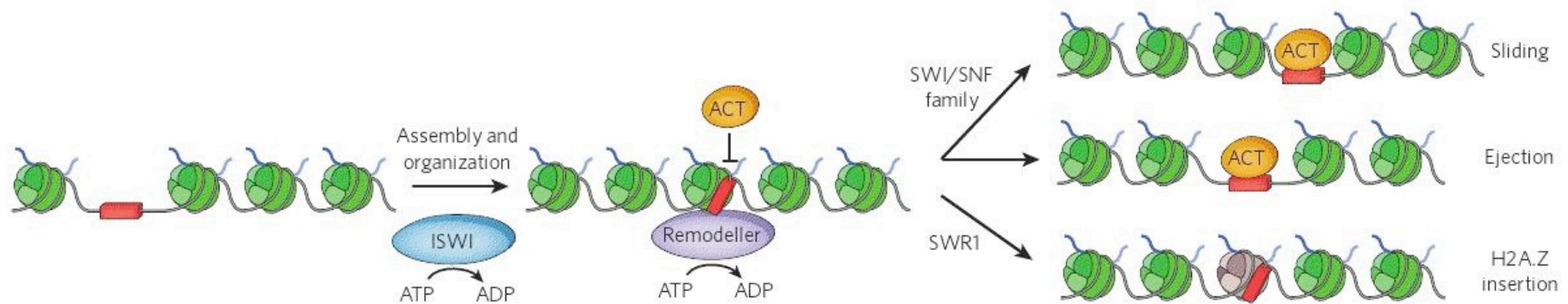


Figure 2 | Basic functions of chromatin remodellers in nucleosome dynamics.

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.

Isw2 in lievito



Isw2 si localizza al 3' del gene adiacente ai tRNAs e possibilmente anche al nucleosoma -1.
L'organizzazione della cromatina dovuta a Isw2 aiuta ad evitare la trascrizione antisenso nelle regioni intergeniche così come l'inizio da parte di Pol II in siti criptici, cosa che può accadere se la densità dei nucleosomi non è ottimale. Isw2 può spostare i nucleosomi in elementi a sequenze sfavorevoli che possono aiutare a stabilizzare la repressione.

l'esempio di *POT1* di lievito



Il promotore del gene di lievito *POT1* è “blended” mescolato con queste proprietà: è fortemente regolato ma con un tratto a sequenza poly (dA:dT) e siti cis-regolativi che nello stato represso parzialmente sovrappongono un nucleosoma. L'omissione di *Isw2* causa il movimento del nucleosoma fuori dalla sovrapposizione con la sequenza poly (dA:dT) verso una posizione favorita con sequenza sola (nuda). Questo movimento espone i siti di legame nel promotore ed è correlato con la derepressione parziale del gene. Azione repressiva di *Isw2*.

Il meccanismo dei rimodellatori



Certi promotori possono usare rimodellatori ISWI per muovere i nucleosomi in posizioni sfavorevoli del DNA che possono occludere i siti di legame di fattori di trascrizione o la TATA box e conferire lo stato di repressione.

Come può essere attivato un promotore simile in cellule normali in presenza di Isw2 ?

La modificazione della coda H4 può prevenire l'azione di Isw2 o attrarre un altro rimodellatore che sposta il nucleosoma fuori dal tratto di poly(dA:dT) esponendo un elemento cis-regolativo e permettendo l'attivazione.

I promotori coperti o scoperti sono regolati insieme ai rimodellatori e aiutano a capire come i promotori mescolati "blended" sono regolati con funzioni dei due tipi.

SWI/SNF rimodellatori



I rimodellatori delle famiglie SWI / SNF possono mettere e togliere i nucleosomi e le loro funzioni sono spesso correlate con la dis-organizzazione ed attivazione dei promotori. L'azione di acetilazione degli istoni è correlata con l'attività dei geni ed i rimodellatori SWI/SNF hanno domini che legano code acetilate attivando il targeting o l'attività in promotori che sono attivati. L'attività di SWI/SNF può essere necessaria ai promotori aperti per rimuovere i nucleosomi dalle sequenze poly(dA:dT) o dai promotori coperti o misti per mettere o levare i nucleosomi (area per studi futuri).

modello di lievito per SWI/SNF



Di solito in lievito i rimodellatori della famiglia SWI/SNF sono posizionati al nucleosoma -1 in accordo con l'osservazione che i siti di legame per molti attivatori di condizioni specifiche stanno nel nucleosoma -1 nei geni regolati di lievito. Però come i rimodellatori legano sia nucleosomi avvolti che espulsi non sono scovati ai NDRs (nucleos deplet reg) con i metodi attuali. Forse perché rimuovono il loro substrato di legame cioè il nucleosoma. Perciò è possibile che questi rimodellatori aiutino a generare i NDR e regolare la loro occupazione e posizione al nucleosoma -1. In supporto l'analisi dei mutanti di RSC della famiglia SWI/SNF di lievito, questi mutanti rsc compromettono la densità nucleosomica ed il posizionamento dei promotori.

dibattito attuale



La domanda è se la sequenza del DNA o il rimodellamento della cromatina ed i fattori modificatori sono i più importanti motori della rimozione dei nucleosomi nei promotori.

Le mappe di occupazione dei nucleosomi “genome wide” ottenute con assemblaggio *in vitro* dei nucleosomi con DNA genomico di lievito mostrano NDRs nei promotori, ma queste NDRs non sono eliminate dai nucleosomi così come le NDRs *in vivo*. Questo lascia da dimostrare i ruoli per i rimodellatori, modificatori e varianti nel formare NDRs.

Anche i ruoli per i membri della famiglia SWI/SNF nel reprimere i geni è stata rilevata e sarebbe interessante capire se la dis-organizzazione dei nucleosomi induca il legame di repressori ai siti cis-acting negli enhancers e promotori.

impegno futuro



Una sfida futura sarà studiare entrambe i rimoddelatori SWI/SNF ed ISWI ed isolare in vivo i prodotti intermedi per avere l'evidenza diretta del coinvolgimento del rimodellatore nell'inserire o espellere particolari nucleosomi.

SWR1 e le proprietà dei nucleosomi H2A.Z



La variante istonica H2A.Z cambia rispetto ad H2A nella sequenza aminoterminale ed anche in residui chiave interni che possono influenzare le interazioni con se stesso ed il tetramero H3/H4 nel nucleosoma determinandone l'instabilità. H2A.Z è assemblato in particolari nucleosomi di promotori rimpiazzando H2A canonico in una maniera indipendente dalla replicazione in una reazione prodotta dai rimodellatori della famiglia SWR1. C'è una variazione nel collocamento di H2A.Z nel promotore in organismi diversi e nel suo ruolo specifico benchè alcuni temi sono comuni e conservati. Nel lievito H2A.Z (htz1) occupa in molti geni perlopiù la posizione nel nucleosoma -1 e +1 con minor frequenza al +2. È molto arricchito in promotori senza TATA ma non è esclusivo per promotori aperti, (molti blended lo hanno).

H2A.Z in drosofila e umani



In drosofila è assente in posizione -1 ed è prevalente in +1 e perciò spesso scade nella regione codificante.

In umani è localizzato al promotore e più spesso che in lievito si estende tra -3 e +3 in geni a bassa espressione.

Nelle piante si trova nel promotore dove attiva la trascrizione ed è reciproco alla metilazione del DNA.

Studi funzionali corroborano l'ipotesi che H2A.Z sono coinvolti con l'attivazione e che i nucleosomi con H2A.Z sono persi dai geni in cui cresce la trascrizione come nell'uomo in cui si perde fortemente in posizione -1.

Comunque l'acetilazione di H2A.Z aumenta con l'attivazione. Questo indica che in lievito ed uomo i geni inattivi o costitutivi contengono alti livelli di H2A.Z e tutti e due con l'acetilazione o la espulsione comportano attivazione.

meccanismi di attivazione con H2A.Z



Per contrasto in drosofila H2A.Z occupa siti in posizione +1 che correla con la stima di trascrizione.

A prima vista queste osservazioni contrastanti indicano strategie molto diverse di H2A.Z. Alternativamente H2A.Z può promuovere l'attivazione con meccanismi diversi secondo le differenze di ogni organismo nell'uso del TSS e del nucleosoma +1 per la regolazione genica. Nel lievito il TSS è piazzato all'interno del nucleosoma +1, benchè drosofila tende ad avere TSS nel NDR (50-75 bp a monte del nucleosoma +1). Inoltre i geni repressi di drosofila spesso hanno Pol II già presente vicino al TSS che può essere coinvolta trascrizionalmente ma messa in pausa nel passaggio verso l'elongazione. La messa in pausa è molto meno frequente nel lievito.