

Lezione XXXI-XXXII

martedì 13-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

H2A.Z in drosofila e umani



In drosofila è assente in posizione -1 ed è prevalente in +1 del TSS 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'ecetilazione o la espulsione inducono attivazione.

meccanismi di attivazione con H2A.Z



In drosofila H2A.Z occupa siti in posizione +1 che correla con la stima della 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.

Regolazione tramite H2A.Z



Il funzionamento di H2A.Z può essere “avvelenato” (drogato) per regolare l’inizio della trascrizione in lievito (accesso al TSS), benchè in drosofila può aiutare l’elongazione o la pausa al nucleosoma +1. Un’altra considerazione è la temporalizzazione nel posizionamento di H2A.Z. I geni di lievito mettono H2A.Z nei geni repressi o basali, benchè in drosofila H2A.Z può essere inserito dopo il round iniziale di trascrizione per facilitare quelli successivi. Questo può sottolineare il fatto che H2A.Z è perso nel lievito durante l’attivazione mentre la sua abbondanza in drosofila accresce al sito +1. Però in tutti e due gli organismi la strategia è di promuovere la trascrizione anche se con meccanismi diversi.

altre caratteristiche di H2A.Z



Un'altra caratteristica dei nucleosomi con H2A.Z è la stabilità diversa che dipende dal sottotipo dell'istone H3 nel nucleosoma assemblato. I nucleosomi con H2A.Z sono più stabili di quelli con H2 coassemblato con il canonico H3, ma meno stabile quando assemblato con la variante H3.3. I nucleosomi con H3.3 sono inseriti nei geni che perdono i nucleosomi durante la trascrizione o il rimodellamento e perciò possono contenere il nucleosoma H2A.Z/H3.3 ibrido in posizione +1 dopo il primo round di trascrizione. Questo può spiegare perché i livelli di H2A.Z correlano con i livelli di trascrizione in drosofila. In questo caso il nucleosoma ibrido può promuovere il riinizio di un secondo round di trascrizione o l'elongazione da parte di Pol II nel round successivo di trascrizione. Invece il lievito ha solo H3.3 (H3 è l'ortologo canonico di H3.3 di vertebrato) rendendo instabili tutti i nucleosomi di lievito con H2A.Z rimarcando la loro perdita durante l'attivazione.

Instabilità di H2A.Z



L'instabilità di H2A.Z o l'acetilazione può rendere i nucleosomi con H2A.Z sensibili al movimento o l'espulsione dai rimodellatori della cromatina ed esporre più pienamente il promotore. Infine una domanda importante è come H2A.Z e SWR1 sono bersagliati ai nucleosomi del promotore in vivo, probabilmente con il contributo sia delle proteine che legano il DNA che le modificazioni istoniche. Come fanno a non sbagliare? C'è una gran parte della segnaletica a noi ignota.

Il rumore trascrizionale



Il rumore trascrizionale si riferisce alla variabilità della trascrizione di singoli alleli in una popolazione cellulare in crescita costante: geni con rumore basso mostrano espressione uniforme nella popolazione cellulare, mentre geni con rumore alto mostrano espressione variabile. I promotori coperti hanno un rumore molto più alto, una caratteristica trovata con studi sia a scala genomica (globale) che con l'analisi accurata (riduzionista) del gene di lievito PH05 (promotore coperto). I promotori coperti possono essere più rumorosi dei promotori aperti per la differenza relativa della struttura della cromatina tra gli stati basali o attivi. I promotori aperti hanno NDR abbondanti che coprono ed espongono i relativamente pochi siti di legame dei fattori di trascrizione.

Transizione dei promotori aperti



Il passaggio dei promotori aperti da espressione moderata costitutiva allo stato di attivazione alta può richiedere una deplezione nucleosomica moderata aggiuntiva alla NDR nei siti -1 e +1, e forse il legame di un fattore addizionale.

Per contrasto molti promotori coperti richiedono grandi cambiamenti per posizione dei nucleosomi e occupazione, con richiesta di rimodellatori della cromatina per permettere il legame pieno dei fattori di trascrizione. Alcuni promotori coperti possono essere bistabili con predisposizione a raffiche di trascrizione seguiti da periodi di repressione più che da trascrizione continua permessa dai promotori costitutivi. Nonostante il ruolo importante della cromatina ci sono anche altre fonti di rumore della regolazione con i segnali e regolazione di fattori di trascrizione.

fase e posizionamento



La maggior parte dei geni di lievito e dei metazoi hanno nella coding-region serie di nucleosomi in fase in cui i nucleosomi mostrano allineamento e spazio corrispondenti alla mappa fisica. Queste serie di nucleosomi in fase può prevenire l'inizio di trascrizione in siti criptici all'interno dei geni che potrebbero provocare prodotti tronchi (servizio di protezione). Le serie in fase tipicamente iniziano al nucleosoma +1 e decadono lentamente alla distanza ma non è chiaro come siano formate.

Ipòtesi del posizionamento



Due condizioni potrebbero determinare l'allineamento dei nucleosomi: a) un forte posizionamento di un nucleosoma, b) una regione libera da nucleosomi.

Ognuna di queste possibilità può determinare un limite-confine da cui il nucleosoma successivo acquisisce la fase, col risultato di una serie di nucleosomi con posizionamento statistico che decade in coerenza con la fase sulla distanza. I promotori aperti possono usare le regioni poly(dA:dT) fiancheggiate da forti elementi NPS(nucleos posit seq) al nucleosoma -1 e +1 per fissare questi due primi elementi come confine iniziale decisivo da cui poi tutti gli altri si aggiungono eventualmente in entrambe le direzioni senza bisogno di altre NPS aggiuntive.

Posizionamento in fase con ISWI



Per questo modello potrebbero essere necessari rimodellatori della famiglia ISWI che agirebbero per il posizionamento regolare posizionando i nucleosomi in modo adeguato ed equamente distanziati. Il punto di partenza sarebbero i nucleosomi -1 e +1 rispettivamente nei promotori aperti e regioni codificanti.

posizione e pausa della Pol II



La Pol II fa pausa all'angolo del primo polisoma a valle del TSS in molti geni umani i quali mancano spesso del nucleosoma -1 (NDR umano). Questo genera la possibilità che il nucleosoma +1 sia coinvolto nel creare la pausa o il blocco fisico della progressione: a) regolando la presenza o meno del nucleosoma b) regolando l'attività di fattori che aiutano Pol II a superare la pausa.

Nelle cellule umane nei geni inattivi il nucleosoma +1 sta a ~10 bp a valle del TSS, mentre i geni attivi il nucleosoma +1 sta a ~40bp a valle del TSS, suggerendo che il nucleosoma +1 scorre come partecipe del cambiamento verso il processo di elongazione. Sistema dinamico.

Regolazione nucleosoma +1



Le modificazioni al nucleosoma +1 sono fortemente regolate, contiene alti livelli di metilazione di lysina 4 (H3K4me 3) che lega il dominio PHD (non PhD o pHD) nella subunità Taf3 di TFIID, è anche acetilato e lega la subunità Bdf1/2 di TFIID. Il fattore di trascrizione TFIID col nucleosoma +1 e Pol II potrebbero formare una unità funzionale entro la quale sono regolate l'inizio e l'elongazione.

Gli umani hanno la messa in fase dei nucleosomi nelle regioni codificanti specialmente ristretta ai geni con la Pol II attiva. Una possibilità è che questa unità funzionale serva come confine intorno al quale i nucleosomi sono posizionati di conseguenza dopo che Pol II riposa (pausa), forse col posizionamento statistico e ISWI in funzione, benchè vada provato.

Anche il ruolo dei rimodellatori nel regolare il nucleosoma +1 negli eucarioti superiori deve essere verificato sperimentalmente. (per ora verificato solo su lievito in cui si possono ottenere mutanti)

turnover dei nucleosomi del promotore



Un modello del promotore inattivo postula che siano entità statiche con nucleosomi immobili. Se fosse vero, sarebbe difficile per i fattori di trascrizione “pionieri” di trovare il sito nei promotori soprattutto se il sito risiede nell’angolo dei nucleosomi.

In lievito è stato dimostrato che ci sono nucleosomi caldi con un turn-over alto sia nello stato attivo che represso.

I nucleosomi dei promotori sono più caldi dei nucleosomi delle regioni codificanti anche in geni attivi con la Pol II che trascrive. Ciò suggerisce una attenzione forte sui modificatori e rimodellatori della cromatina. H2A.Z vicino al futuro TSS indurrebbe fortemente il turn-over dei nucleosomi permettendo l’ispezione dei fattori di trascrizione sui promotori ad una frequenza concordante.

acetilazione di H3K56



L'acetilazione di H3K56 è correlata fortemente con i nucleosomi caldi (ad alto turn-over). Una ipotesi attraente è che le modificazioni istoniche come H3K56 attraggano i rimodellatori e espulsori di nucleosomi della famiglia ISWI/SNF.

Infine i chaperoni (ciaperonine) degli istoni sono stati visti assistere sia la macchina di deposizione di nucleosomi indipendenti dalla replicazione che i rimodellatori durante la eliminazione (eviction) degli istoni. L'azione coordinata di rimodellatori e chaperoni sta sul fronte della dinamica di assemblaggio ed eliminazione istonica. Sistema altamente dinamico per tener pronta la cromatina alla attivazione o disattivazione in equilibrio instabile.

considerazioni finali



Negli ultimi 5 anni molti studi genome-wide e gene-specifici hanno rivelato nuovi aspetti e concetti della regolazione dell'architettura dei promotori.

- Importanza delle sequenze del DNA per la posizione dei nucleosomi.
- macchine della modificazione e rimodellamento della cromatina che ottimizzano lo stato iniziale di repressione o stato basale e passaggio allo stato attivo.
- l'ipotesi dello stato “avvelenato” (bloccato da una sostanza) del promotore represso è in buon accordo con i posizionamenti dei nucleosomi ed eliminazione, con le varianti istoniche e la presenza di Pol II in pausa nei metazoi. Tutti argomenti a favore della condizione della Pol II avvelenata.

struttura dinamica dell'architettura



Questa condizione di avvelenamento per mettere in pausa la Pol II è descritta (considerata) come struttura dinamica con un forte turn-over di nucleosomi.

È la precisa natura dello stato “avvelenato” (poised) che determina la necessità di altri elementi per la transizione allo stato attivo.

L'effetto delle proteine con l'enhancer a distanza sulla dinamica del promotore è un argomento di studio primario.

Il passaggio dei promotori da repressi ad attivi è stato studiato per decine di anni. Solo le possibilità di studio recenti per determinare simultaneamente gli aspetti dell'architettura dei promotori, modificazioni, composizione ad alta risoluzione spaziale e temporale, rivelano nuovi dettagli di questi passaggi e anche sugli enhancers.

Sono necessari studi di genetica per identificare le interazioni dipendenti e vedere quali fattori, modificazioni istoniche, movimenti nucleosomici siano induttori dei passaggi successivi. Capire queste interazioni faciliterà la comprensione della orchestrazione della regolazione dei promotori facenti parte della cromatina.