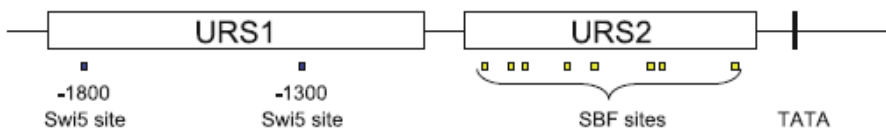


GUIA PROBLEMAS TRANSCRIPCION

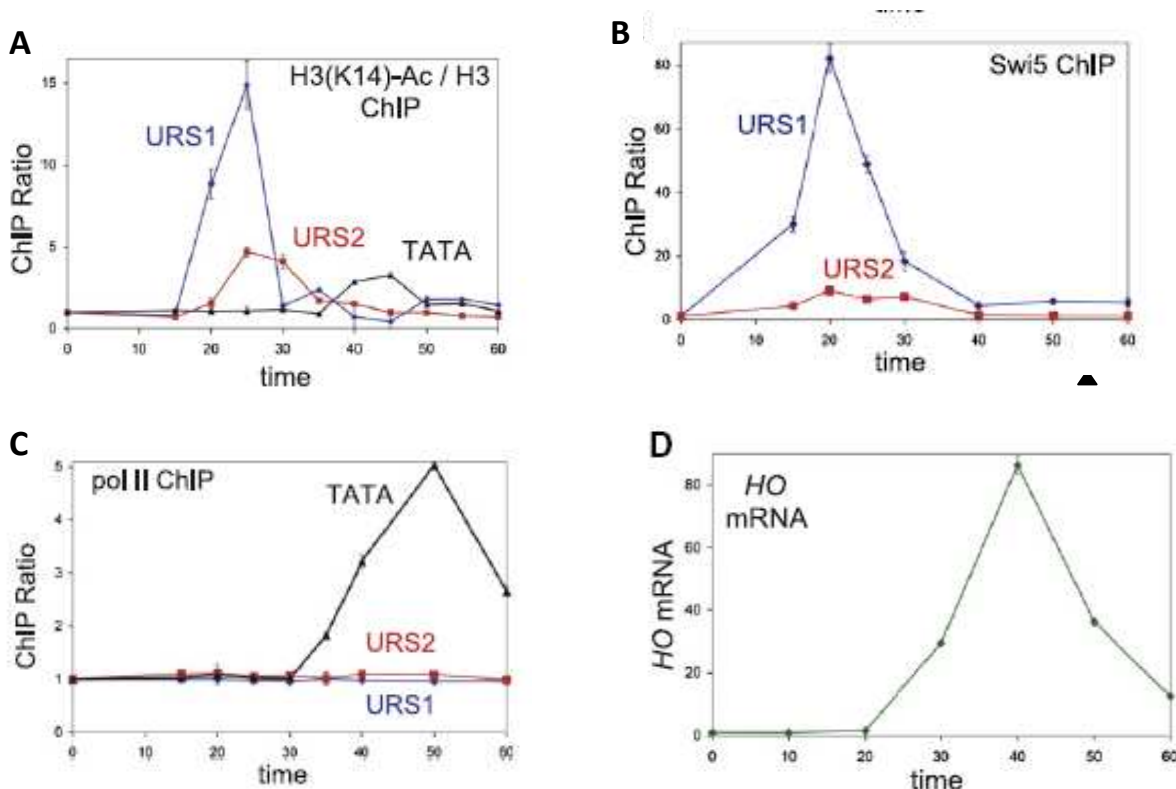
PROBLEMA 1

El gen HO en *Saccharomyces cerevisiae* codifica para una endonucleasa que permite el switch entre mating types α y α . HO se transcribe transientemente durante el ciclo celular en la fase G1 tardía y solamente en las células madres pero no en las células hijas. Se ha definido un orden de eventos que resulta en la transcripción de HO, los cuales comienzan con la fosforilación del factor Swi5 en la anafase tardía que permite su entrada al núcleo. El promotor presenta dos regiones denominadas URS1 (-1900 a -1000) y URS2 (-900 a -200). Cada uno con sitios de unión para los FT Swi5 y SBF respectivamente.



El objetivo de los experimentos que se presentan a continuación fue evaluar el mecanismo de activación del gen HO analizando también si la estructura de la cromatina es también transientemente rearrreglada durante el curso de la activación de HO. Dado que la activación de este gen es regulada durante el ciclo celular para estos ensayos se utilizaron células sincronizadas. Las células poseen el gen *cdc20* bajo el promotor GAL, (GALp::CDC20). Induciendo o no con Galactosa permite inducir o arrear el inicio del ciclo celular en las levaduras, ya que *cdc20* es un gen regulatorio del ciclo celular.

Figura 1



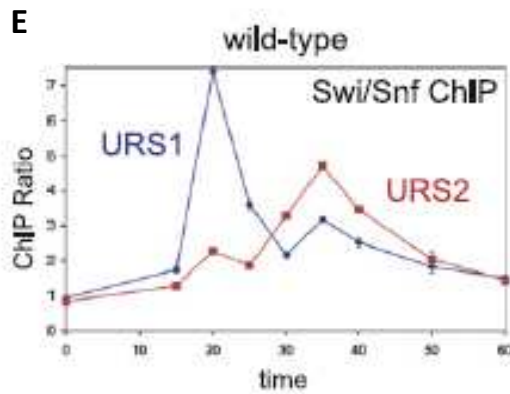


Figura 1

Análisis de ChIP en función del tiempo del desarresto del ciclo celular por agregado de galactosa: Células de levaduras (*GALp::CDC20*) fueron usados para los ChIPs de H3(K14)-Ac (A), Swi5 (B), Pol II (C), y Swi2/Snf2 (E). En (D) el mRNA de *HO* fue medido por RT-PCR. Los primers usados corresponden a zonas de URS1, URS2 o TATA. Los valores de los ChIP están normalizados al *input* (extracto de DNA total sin inmunoprecipitar) y a la señal de una región control alejada de las regiones de estudio.

Figura 2

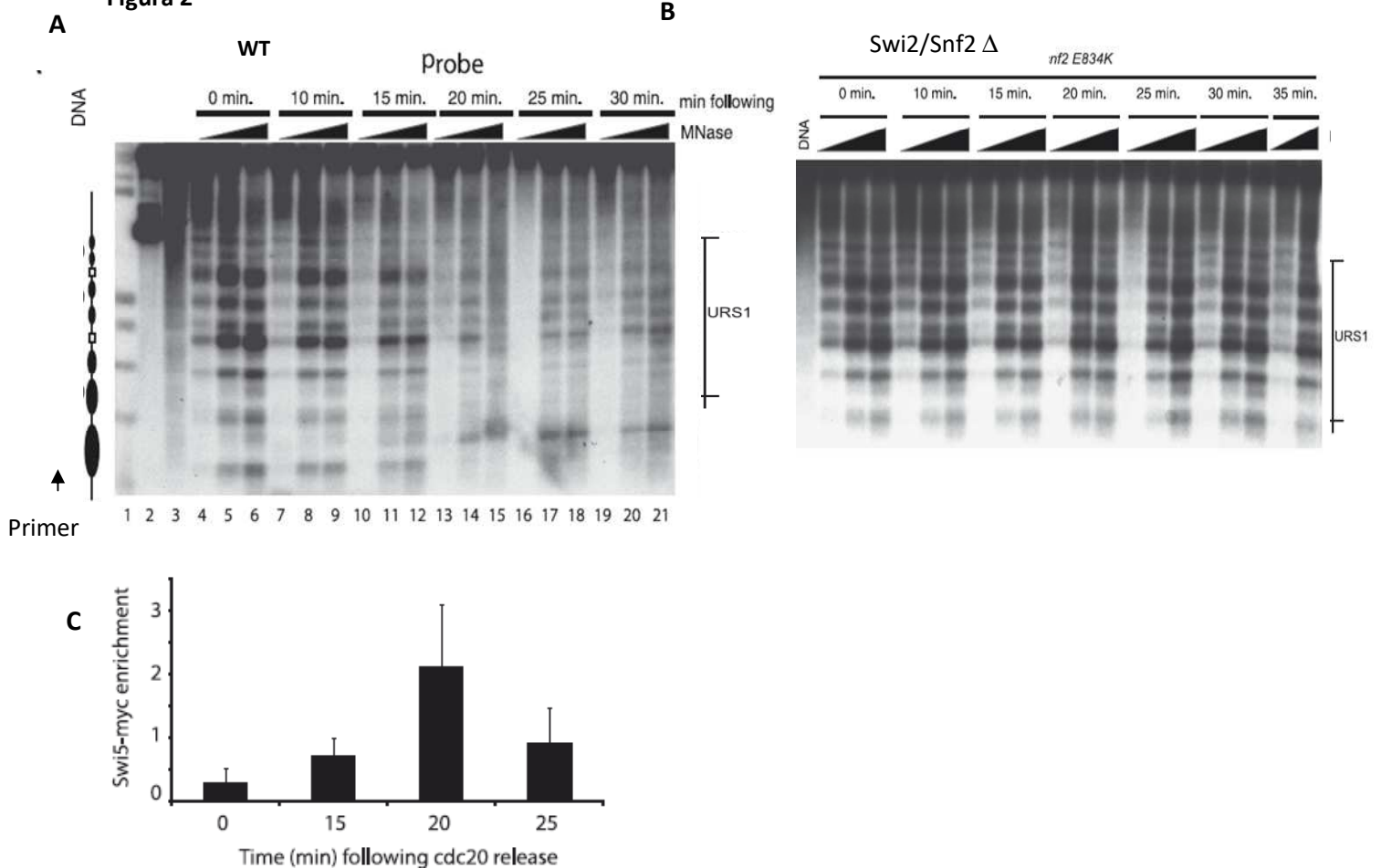


Figura 2

En células sincronizadas se realizó el análisis de la estructura de cromatina en la región URS1 por digestión con MNasa y marcado indirecto del extremo (indirect end labeling). Las células fueron

desarrestadas por el agregado de galactosa al medio para la inducción de *cdc20* y a los 0, 10, and 15 min se tomaron muestras que fueron procesadas para el análisis con MNasa. Panel A: células wt, Panel B células *swi2/snf2* mutante delta (subunidad ATPasa del complejo Swi/Snf de levaduras). La flecha mostrada en el lado izquierdo inferior del panel A corresponde al primer utilizado para el marcado del extremo (end labeling). El esquema presentado a la izquierda del panel A corresponde a la distribución de nucleosomas en la zona de análisis. Calle 3 DNA desnudo tratado con MNasa. Panel C corresponden a ensayos de ChIP para medir reclutamiento del factor de transcripción *swi5* respectivamente luego de la inducción con galactosa de *cdc20* en las células

Figura 3

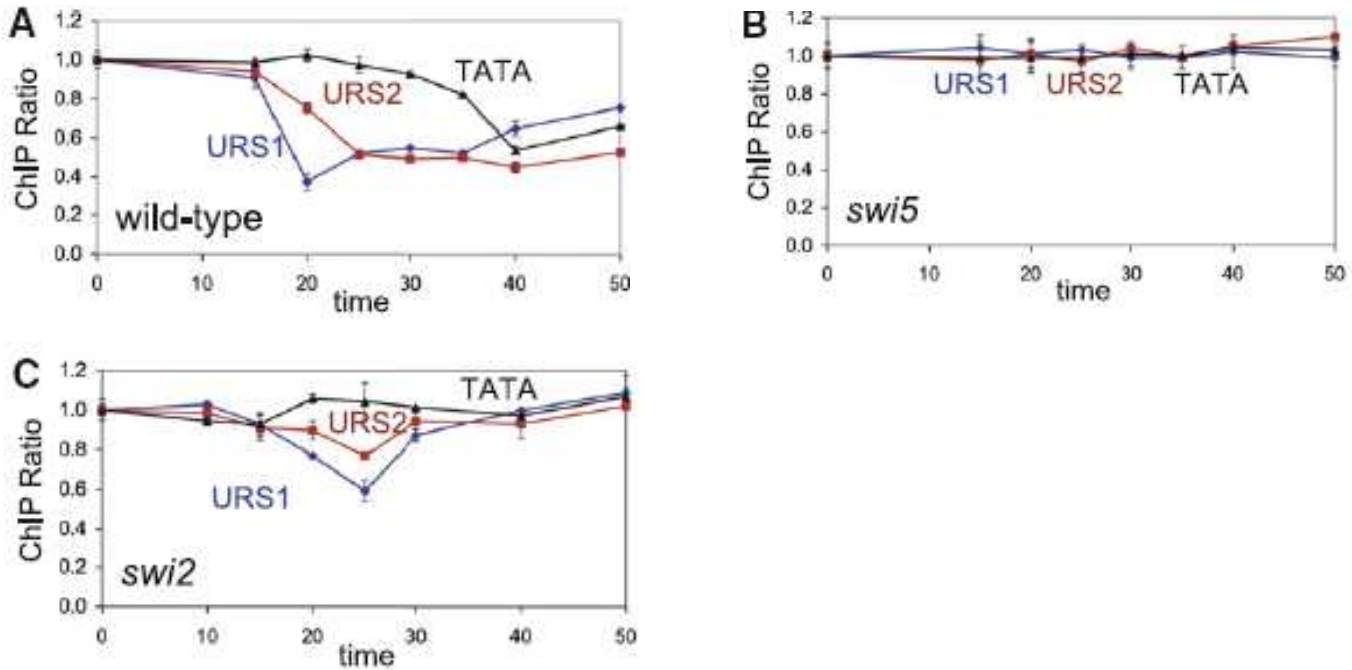


Figura 3

Análisis de ChIP de Histone H3 realizado usando células sincronizadas y para la PCR primers para las zonas correspondientes a URS1, URS2 y TATA en células wt (A), *Swi5* delta (B) y *Swi2* delta (C).

- 1- Analizar las figuras 1, 2, 3 sacando conclusiones de cada experimento. Hacer un esquema del posible mecanismo de regulación de la activación del gen HO.
- 2- Cómo se espera que sea la expresión del mRNA de OH en las mutantes *swi5* y *swi2/snf2* Δ?
- 3- Se puede saber con estos experimentos si la Pol II podría estar precargada en la zona de promotor proximal? Por qué? Cómo se podría probar o descartar que la Pol II este pausada en el promotor?

PROBLEMA 2

Entre las funciones que se han descrito para los lncRNAs esta que sirven como importantes reguladores de la tumorigenesis. Sin embargo, la regulación de la expresión de los lncRNAs en los tumores y los mecanismos involucrados en la tumorigenesis aún no se conocen. Entre las variantes de lncRNAs se encuentran aquellos que son transcritos a partir de enhancers (eRNAs).

La expresión del oncogen MYC es compleja y regulada en múltiples niveles que incluyen enhancers, factores de transcripción específicos y modificación de cromatina.

Figura 1

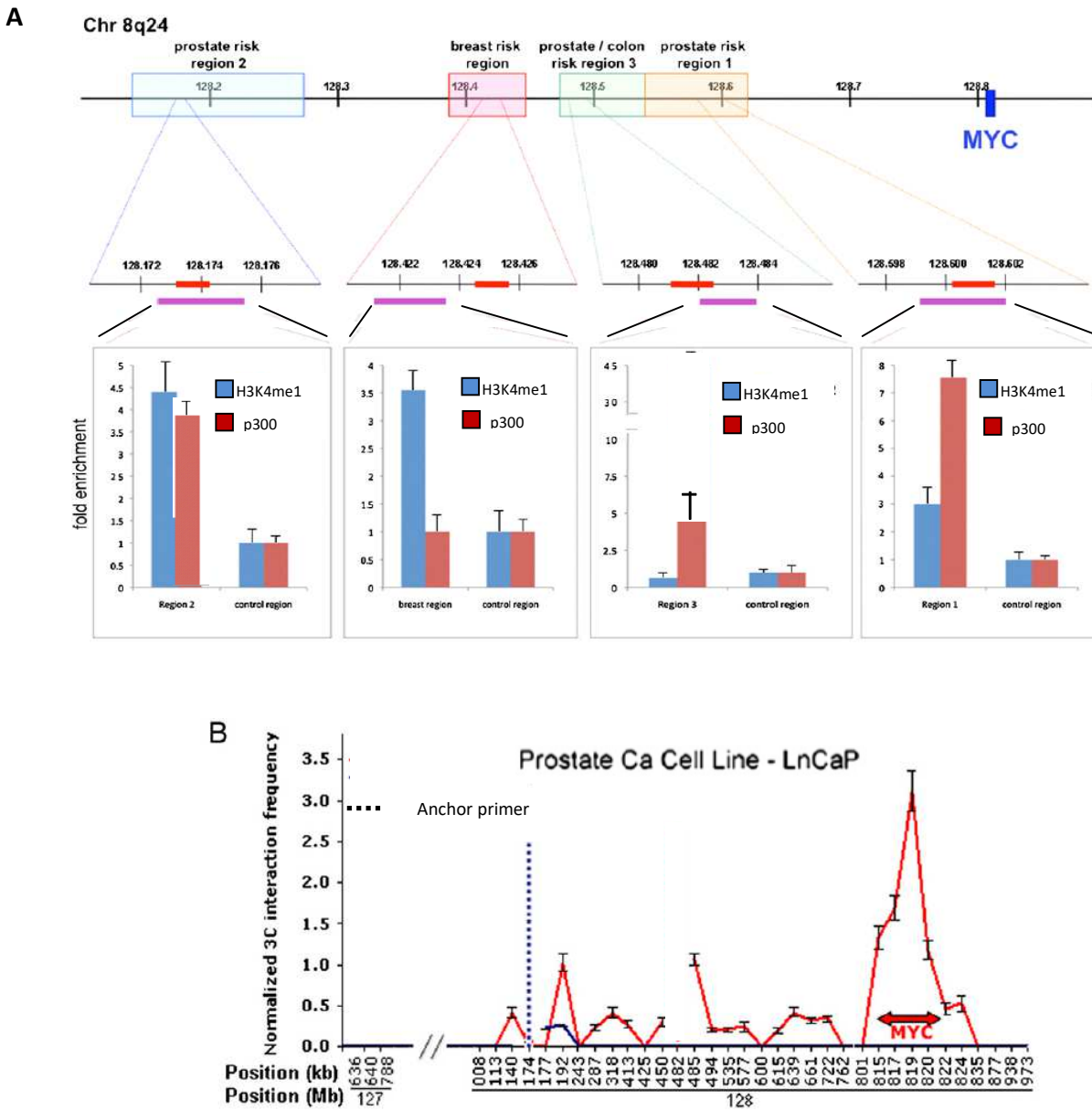
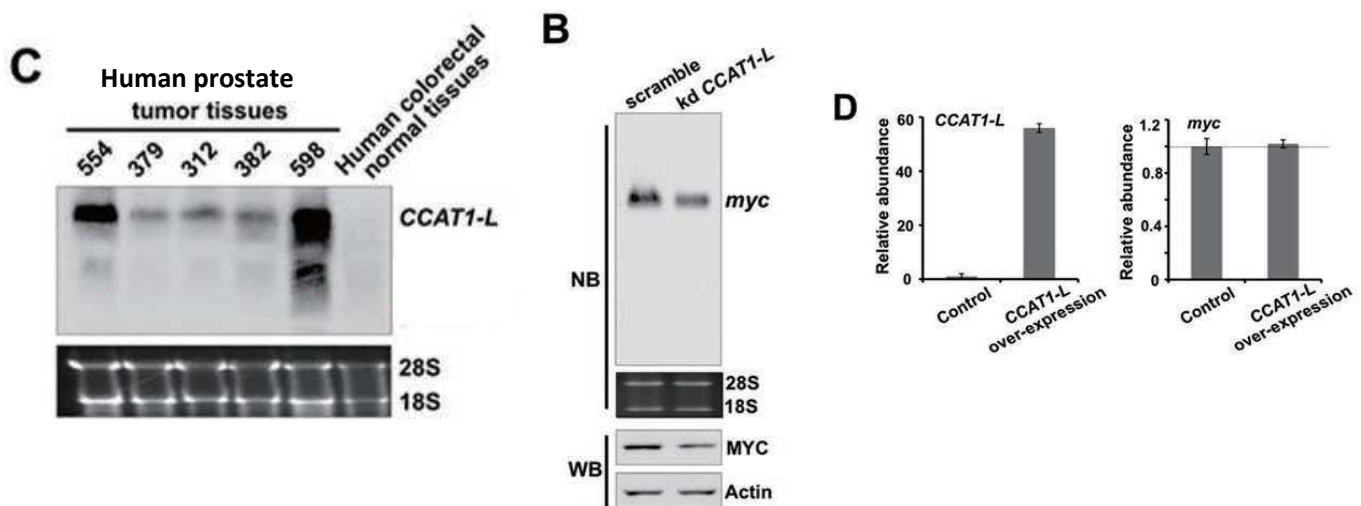


Figura 2



Leyenda Figuras

Figura 1: A) Cromosoma 8q24. Arriba, Región de 800 kb conteniendo regiones identificadas como región para cáncer de próstata, mama y colon y el loci del proto-oncogen MYC. Abajo, Veces de enriquecimiento por CHIP-qPCR para histona 3 lisina 4 monometilada (H3K4me1) y para p300, B) Región 8q24 y frecuencia de interacción 3C del loci de riesgo próstata cáncer región 2 (región constante) con cada fragmento indicado inclusive MYC. Eje x posición genómica (no está dibujado en escala)

Figura 2: C) Northern blot de la región cáncer prostata 2 con una sonda específica para detectar transcritos de la región, la sonda se denominó CCAT1-L A y se analizó en distintos tumores de cáncer de próstata B) Northern blot y Western blot de MYC en células HT29 con knockdown (usando siCCAT1-L) del transcripto detectado con la sonda CCAT1-L (al que se denominó CCAT1-L). si scramble, es siRNA control. 28S y 18S, RNAs ribosomales teñidos con Bromuro de Etidio. D) Sobreexpresión de un cDNA correspondiente al transcripto detectado con la sonda CCAT1-L usando un vector de expresión. Izquierda, RT-qPCR del transcripto CCAT1-L en células HCT116 transfectadas con el vector que sobreexpresa CCAT1-L. Derecha, RT-qPCR de MYC en las mismas células HCT116 transfectadas o no con el vector que sobreexpresa CCAT1-L.

Preguntas

Analizar las figuras 1 y 2, contestando las siguientes preguntas

- 1) Teniendo en cuenta los resultados de la figura 1, Qué función tendría la región 2? Que análisis funcional se podría hacer para probarlo?
- 2) Qué es el transcripto CCAT1-L y qué función cumpliría?
- 3) Especular como serían los perfiles 3C de la figura 1 hechos en las condiciones B y D de la figura 2, que información me permitiría conocer en cuanto a la participación del transcripto CCAT1-L en la formación de estructuras regulatorias?
- 4) Diseñar un abordaje para definir si la región 2 participa en la regulación de la expresión de otros loci y en la formación de estructuras regulatorias de la expresión.

PROBLEMA 3

Las plantas son organismos sensibles que tienen la habilidad de responder rápidamente a variaciones del ambiente para su adaptación y supervivencia. Se ha comenzado a conocer a partir de estudios recientes que la expresión de genes que responden a estrés son regulados a través de cambios en modificaciones de las histonas. Ejemplos de estos genes son los que responden a las sequías, alta salinidad, o shock térmico. Para genes que se inducen bajo shock de frío como *OsDREB1b*, los factores de transcripción (DREBs) se unen a los elementos "Dehydration responsive element" (DRE/CRT) presentes en sus promotores. En este trabajo se estudia el mecanismo de activación de los genes *OsDREB* en semillas de arroz durante esta condición de estrés

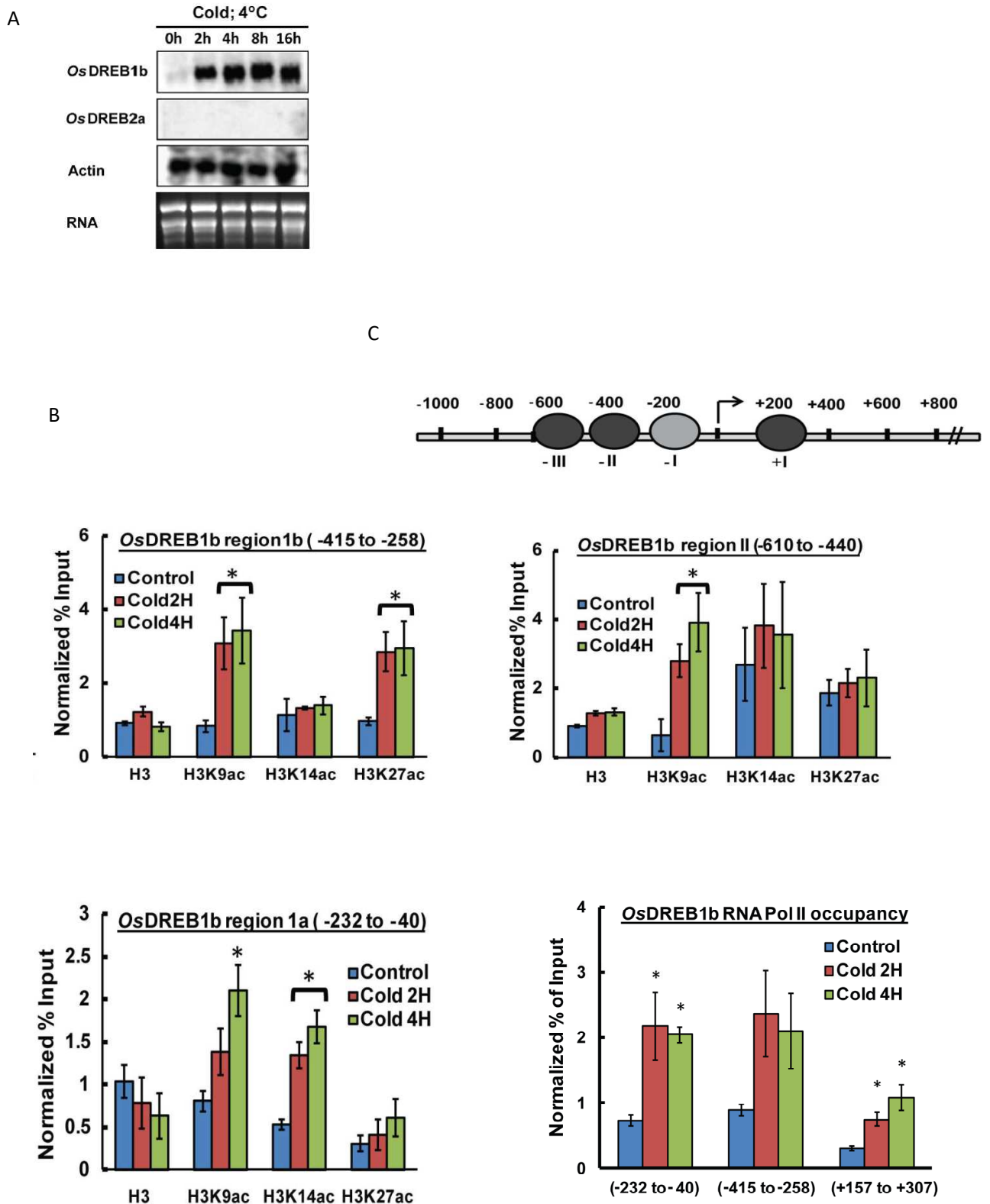


Figura: A) Análisis de los transcriptos de los genes OsDREB1b y OsDREB2a por northern blot de RNA purificado a partir de semillas de arroz sometidas por 2,4,8 o 16 hs a 4°C.
 B) Análisis por CHIP de las modificaciones de H3 durante el estrés por frío (control y tratamiento por 2h y 4h)
 C) Mapa de posición de nucleosomas en la región del promotor y 5' del locus OsDREB1b

- Pregunta a)** Analizar la figura panel A y B. Sacar conclusiones integrando los cambios en las modificaciones, la ocupancia de la Pol II y los resultados del Northern-blot.
b) Diseñar un experimento que permita demostrar el posicionamiento de los nucleosomas indicado en el esquema y que demuestre que en la activación transcripcional del locus OsDREB1b hay remodelado de la cromatina. Explicar la metodología elegida, y control/es elegidos.
c) Diseñar otro experimento para demostrar que alguna región a distancia pueda estar regulando la región del locus OsDREB1b, y que la regulación es estrés dependiente.
d) Dado que es un gen que está respondiendo al estrés, podría ser que la Pol II estuviera pausada? Como lo demostraría?

PROBLEMA 4

El cluster GAL de levaduras incluye tres genes: GAL1, GAL7, and GAL10, que son necesarios para el metabolismo de galactosa. Estos genes son muy regulados por la disponibilidad de fuente de carbono en el medio. Los genes se activan en presencia de galactosa y se reprimen con glucosa. La región UAS tiene sitios para la unión del factor de transcripción GAL4
 Con el **objetivo** de estudiar el mecanismo de regulación de expresión de estos genes se analizó el grado de metilación de la H3K4 bajo condiciones represivas y de activación

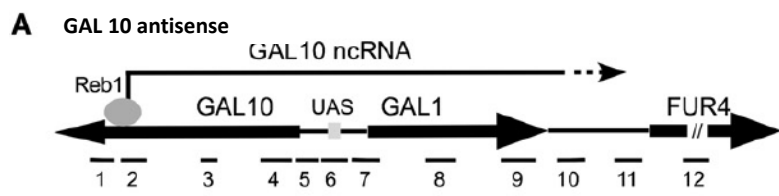
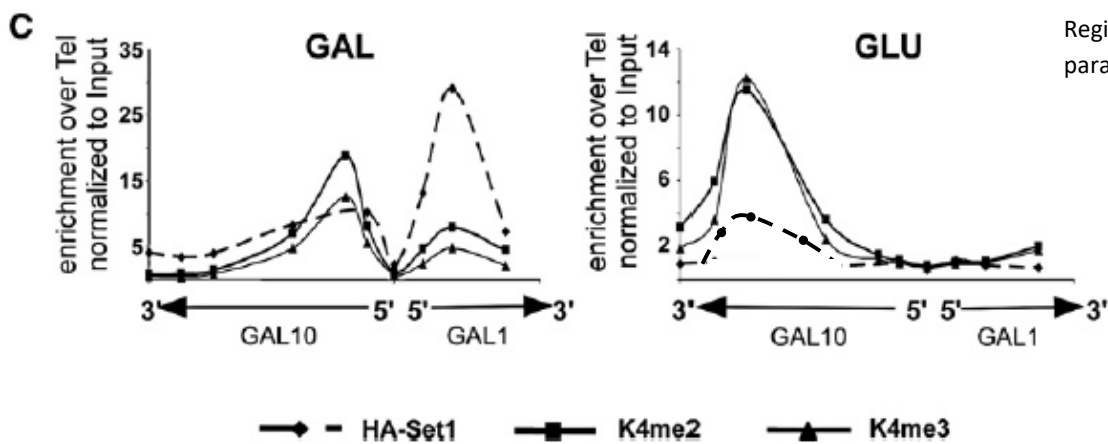


Fig 1. A) Esquema del locus GAL mostrando localización de primers usados en los ensayos **B)** ChIP para detectar metilación de H3 K4 y unión de HA-Set1 (Set1, metilasa, con tag HA). Células crecidas en medio con galactosa (GAL) o glucosa (GLU).



Región Tel usada como control para relativizar resultados

Pregunta 1

Analizar los resultados. ¿Es esperable que en la región 3' codificante del gen GAL10 la K4H3 esté trimetilada? Con qué regiones de un gen y en que estado (transcripcionalmente activas o reprimidas) se asocia esta modificación?

ANTECEDENTE: La región 3' del gen Gal10 presenta sitios de hipersensibilidad a DNAasaI.

Pregunta 2

¿Con que se asocian estos sitios? Qué información pueden dar?

De un análisis *in silico* surge la posible presencia de elementos para la unión de la proteína **Reb1** que luego se prueba experimentalmente con ChIP su unión en dicha región en distintas cepas.

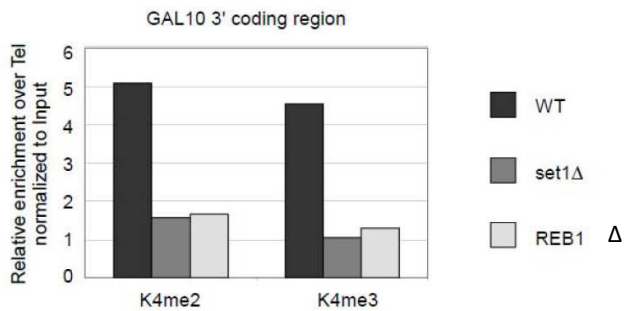


Fig. 2: A) H3 K4 metilación en la región codificante de GAL10 analizado por ChIP en cepas, wt set1Δ y Reb1 Δ. Células crecidas en GLU

Cuál es la relación entre la metilasa Set1 y Reb1?

Buscando la funcionalidad de Reb1, se realizaron northern blots de RNA de las cepas wild-type y Reb1 Δ crecidas en glucosa and galactosa que fueron revelados con sondas para las cadenas sense y antisense

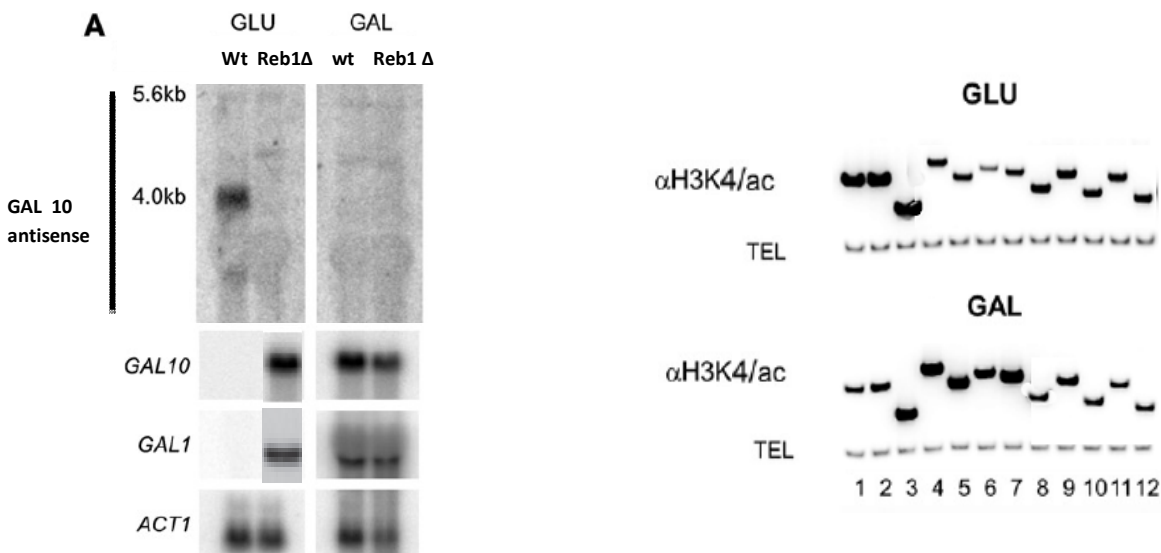


Fig. 3A) Northernblots de RNA de cepas wild-type y Reb1 Δ crecidas en medio con glucosa o galactosa. Probes: GAL10sense, GAL10 antisense, GAL1, ACT1. **B)** Análisis por ChIP de acetilación H3K4 de células crecidas en Glucosa (GLU) o Galactosa GAL10 (GAL). La PCR se realizó con los primers indicados en el esquema de figura 1A y con primers para región telomérica primer (TEL) como control.

- a) **Qué sería el transcripto detectado con la sonda antisense GAL10?**
- b) **Qué función cumpliría?**
- c) **Cómo se relaciona la síntesis del transcripto antisense con las modificaciones post-traduccionales analizadas, metilación y acetilación?, Podría este transcripto estar regulando el grado de acetilación de K4H3, Cómo?**
- d) **Qué función tiene Reb1?**

PROBLEMA 5

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una potente citoquina que interviene en las respuestas inflamatorias inducidas a través de la señalización del factor nuclear de transcripción NF- κ B (formado por las subunidades p65/p50). Cuando se activa este factor de transcripción se transloca al núcleo regulando la expresión de cientos de genes. En este trabajo se desea correlacionar la regulación de la expresión génica por TNF α y el posicionamiento nucleosomal en respuesta al estímulo de la citoquina. Utilizan como modelo células HUVECs, células endoteliales de cordón umbilical.

A Strategy

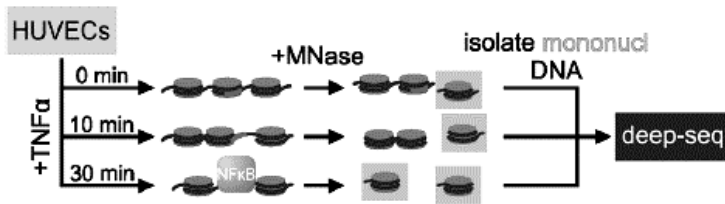


Figura 1: Estrategia células HUVECs crecidas depletadas de suero y estimuladas TNF α (0, 10, 30 min), fueron luego tratadas con MNasa (nucleasa micrococcal) y luego el DNA secuenciado a gran escala

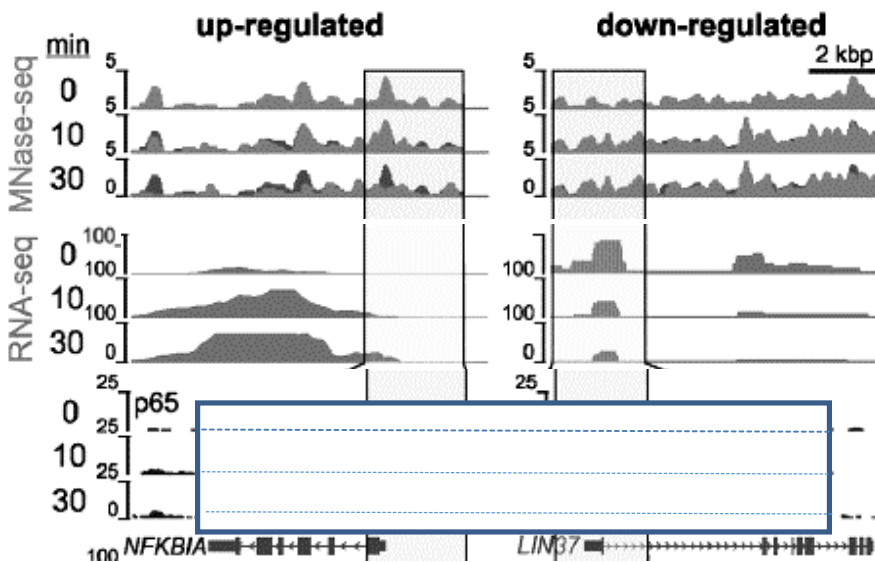


Figura 2: Panel superior, Perfiles (ejes verticales - lecturas/millon) para genes típicos up- o down-regulados obtenidos de MNase-seq (gris claro, corresponde al perfil de 0-min, 10- y 30-min). Superpuesto para facilitar la comparación está el perfil de 0 min), **Panel medio**, RNA-seq de las mismas regiones, **Panel inferior**: a completar. Por último están marcado los dos genes correspondientes a las zonas analizadas. Las flechas indican el sentido de transcripción.

PREGUNTAS

- 1- Analizar los perfiles de la Figura 2, explicando que se infiere de cada uno de ellos.
- 2- Completar el panel inferior, indicando que abordaje debería realizar para determinar a nivel genómico los sitios de unión de NF- κ B, y como esperaría que sean los perfiles para los dos tipos de genes mostrados.
- 3- Dibujar los perfiles esperados de ocupancia de nucleosomas para los análisis de metagen (promedio de genes) para genes upregulados, downregulados y constitutivos, sin y con estimulación con TNF α por 30 min.
- 4- Diseñar un abordaje para la búsqueda e identificación de enhancers que puedan estar upregulando la actividad de los genes que responden a TNF α y NF- κ B.. Indicar estrategia y controles. Dibujar el resultado esperado para un ejemplo de enhancer. Finalmente elegir uno de estos genes y demostrar que una conformación de la cromatina de alto orden entre el enhancer y regiones del gen permiten su transcripción y están mantenidas por alguna molécula que la estabiliza. Diseñar la estrategia experimental indicando los controles a realizar.

ROBLEMA 6

H2A.Z es una variante de la altamente conservada canónica histona H2A, con solo un 60% de conservación de identidad. H2A.Z está enriquecida en los promotores de los genes, y también en otras regiones regulatorias, generalmente ejerciendo un rol positivo sobre la transcripción. En el contexto de la tumorigenesis, H2A.Z está sobrepresado in cáncer de mama, próstata, y vejiga, donde en algunos casos se detectó que regula la proliferación. La histona H2A.Z presenta dos variante, H2AZ.1 y H2AZ.2. En este trabajo se reporta el rol de H2A.Z en melanoma.

Figura 1

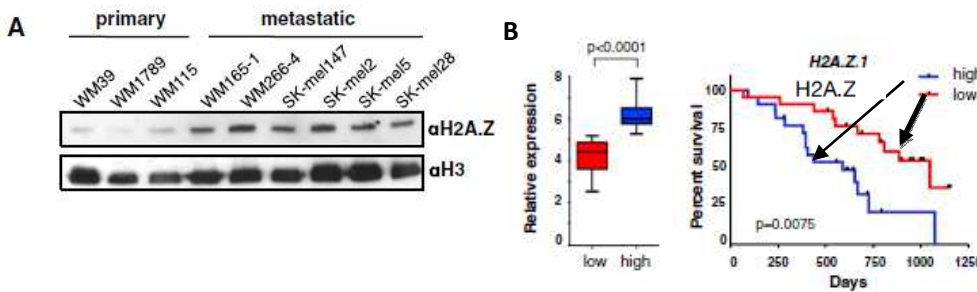


Figura 1

A. Chromatina extraída de líneas celulares primarias y metastásicas probadas con anti-H2A.Z a; anti-H3 fue usado como control.

B. Sobrevida de pacientes con melanoma. Se analizó el nivel el mRNA de H2AZ.1 en los pacientes. Y se clasifico en alto y bajo (panel izquierda). Sobrevida de pacientes analizados en panel izquierdo (panel derecho)

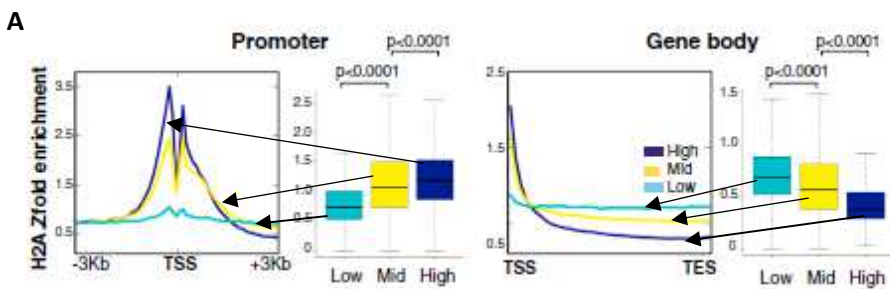


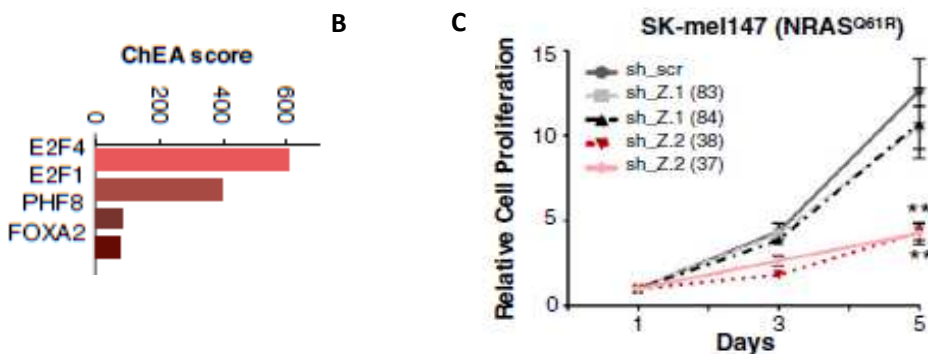
Figura 2

A. Enriquecimiento de H2A.Z, medido por ChIP-seq (panel izquierdo de cada parte del gen, promotor o cuerpo de gen). Niveles de expresión de mRNA. (panel derecho de cada parte del gen). Genes fueron divididos en alto (top 25%), medio (middle 50%), y bajo (bottom 25%) según los niveles del mRNA de los datos RNA-seq.

B. Análisis de enriquecimiento de ChIP (ChEA2) en genes identificados en A (clase 1). ChEA2 database contiene datos ChIP-seq de 200 factores de transcripción de 221 publicaciones

C. Ensayo de proliferación en células SK-mel147 (células melanoma malignas) depletadas de H2A.Z (con shRNA, shZ.1.83, shZ.1.84, shZ.2.38 y shZ.2.37)

Los genes identificados en A corresponden a genes del ciclo celular



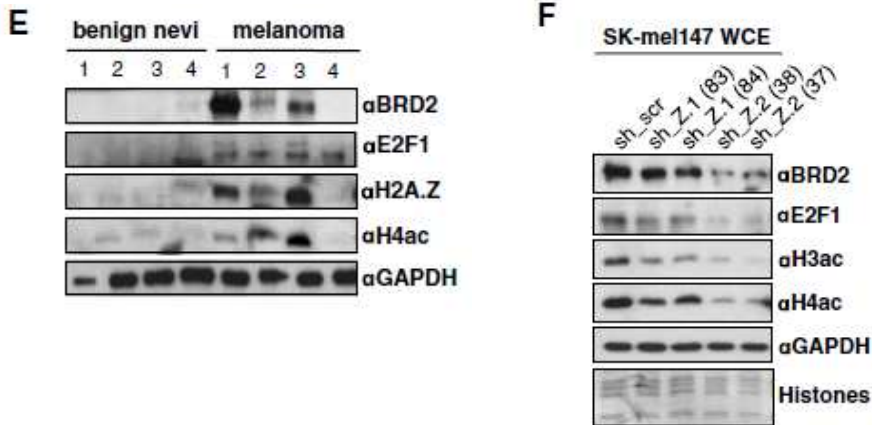


Figura 3: (E) Extractos de células de benign nevi (melanocitos no malignos) and células metastásicas de melanoma probadas con anti-BRD2, anti-E2F1, anti-H2A.Z, and anti-H4ac ; GAPDH usado como control **(F)** Extractos de células de células SK-mel147 (células melanoma malignas) depletadas de H2A.Z con si RNA (sh.sc: siRNA control scramble; sh_Z.1(83): si RNA contra H2A.Z al igual que los otros sh con distinto número) analizadas por western blot para BRD2, E2F1, H3ac, y H4ac. GAPDH control. BRD2: proteína scaffold que se une a Histona acetilada en K y funciona reclutando a la cromatina enzimas modificadoras y TFs, acoplado acetilación a transcripción.

PREGUNTAS

- 1) Analizar las figuras 1,2 y 3 sacando las conclusiones correspondientes en cada caso. Tiene la misma función H2AZ.1 que H2AZ.2?
- 2) En base a los resultados de la figura 3 proponer una estrategia para analizar a nivel genómico la unión de EIF2, BRD2, H2AZ y dibujar los resultados esperados a modo de heatmap correlacionando con el grado de expresión de genes. Dibujar además una región mostrando uno de los genes identificados y el perfil de veces de enriquecimiento para BRD2, E2F1, y H2A.Z y RNA-seq. en esa región
- 3) Si los genes a los que se vio asociada esta regulación corresponden a genes del ciclo celular de células de melanoma en proliferación, Como esperaría que se encuentren los promotores de dichos genes en una situación de arresto G1/S? Dibujar un modelo mostrando nucleosomas, TF, proteína BRD2, grado de acetilación de histonas, presencia de H2aZ.
- 4) Proponer un abordaje experimental para encontrar posibles enhancers de todos estos genes de ciclo celular que poseen H2AZ en sus promotores.

PROBLEMA 7

La importancia de los enhancers en la regulación de la expresión génica está bien establecida. En este trabajo se estudia en células de cáncer de mama la respuesta transcripcional del receptor de estrógenos (ER- α) unido a 17 β -estradiol (E2) y la relación con enhancers en genes E2 upregulados. Haciendo experimentos de ChIP-Seq utilizando para la inmunoprecipitación de la cromatina anticuerpos contra ER- α en células MCF-7 (cáncer de mama) tratadas 1 h con E2 se revelaron en el genoma sitios de unión del receptor, de los cuales solo 902 estaban sobre promotores y 7.174 se unían a sitios que podrían ser potenciales enhancers (Figura 1A primer panel). En el trabajo se realizaron los siguientes experimentos

Analizar los siguientes resultados indicando el objetivo y las conclusiones que se pueden sacar de los mismos

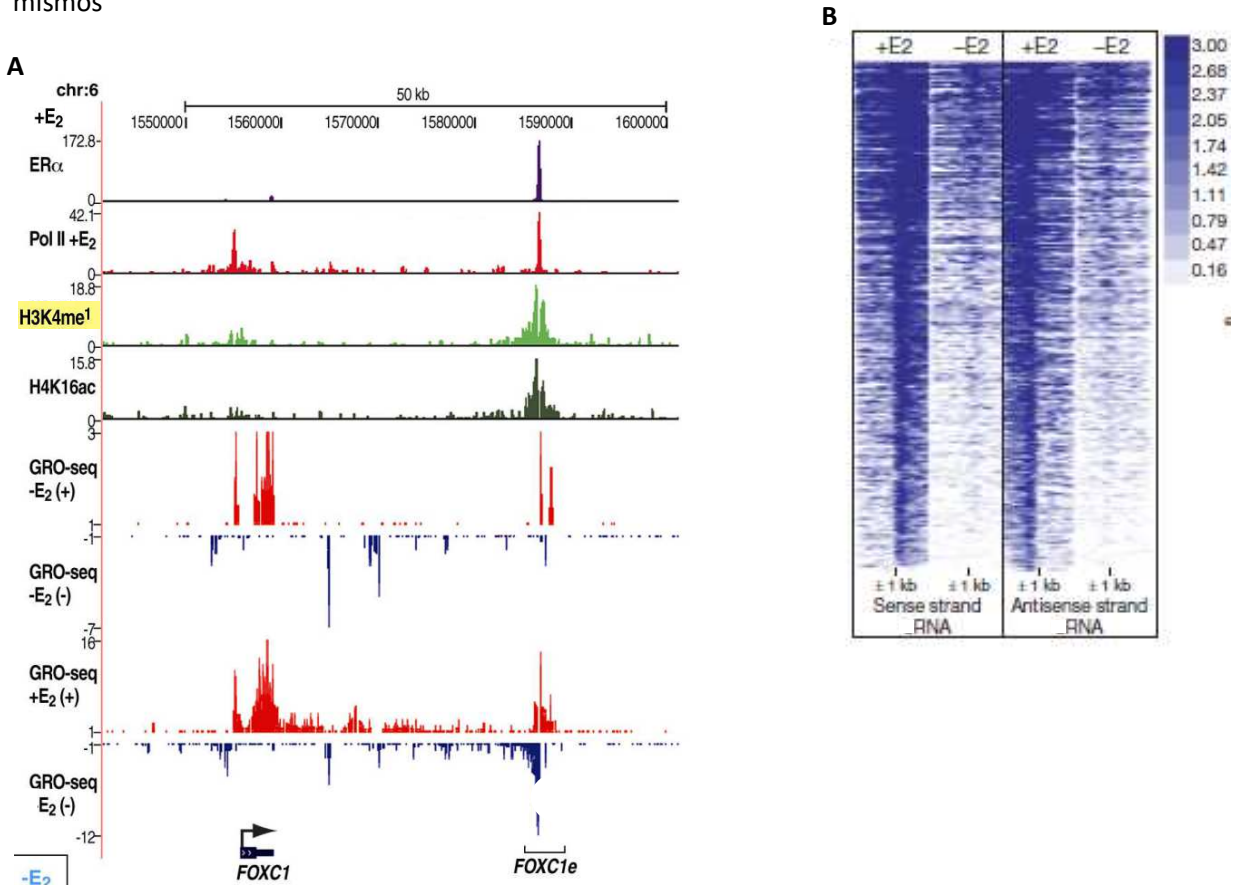


Figura 1 A) ChIP-seq para cada ER- α , Pol II (+E2), H3K4me1, H4K16ac, y GRO-seq sentido y antisentido de células tratadas +/- E2. (se muestra un ejemplo de un gen: FOXC1). B) Heatmap de los datos de GRO-seq en los posibles enhancers en células tratadas E2 (+E2) o no tratadas con E2 (-E2).

Se eligieron algunos genes upregulados para seguir trabajando y analizar el rol en la transcripción de las regiones enhancers

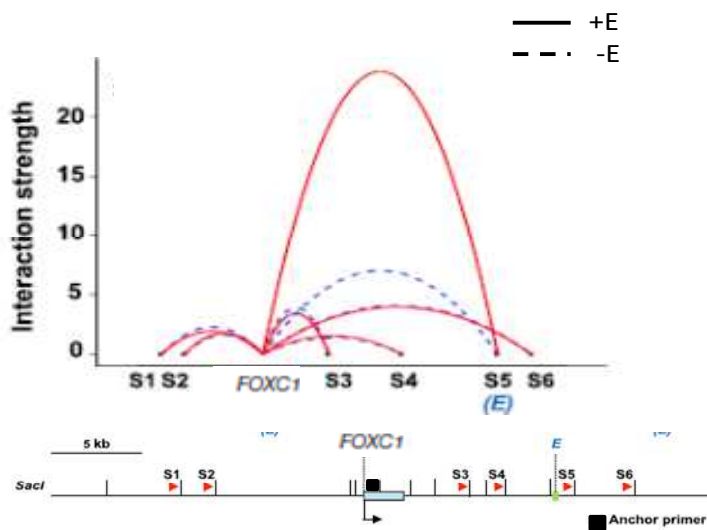


Figura 2: Análisis 3C del locus FOXC1 y su región FOXC1e (E). En la figura están indicados el primer anchor (fijo) y el resto de los primers, el ensayo se realizó a partir de células tratadas (+E) o no tratadas (-E) con E2.

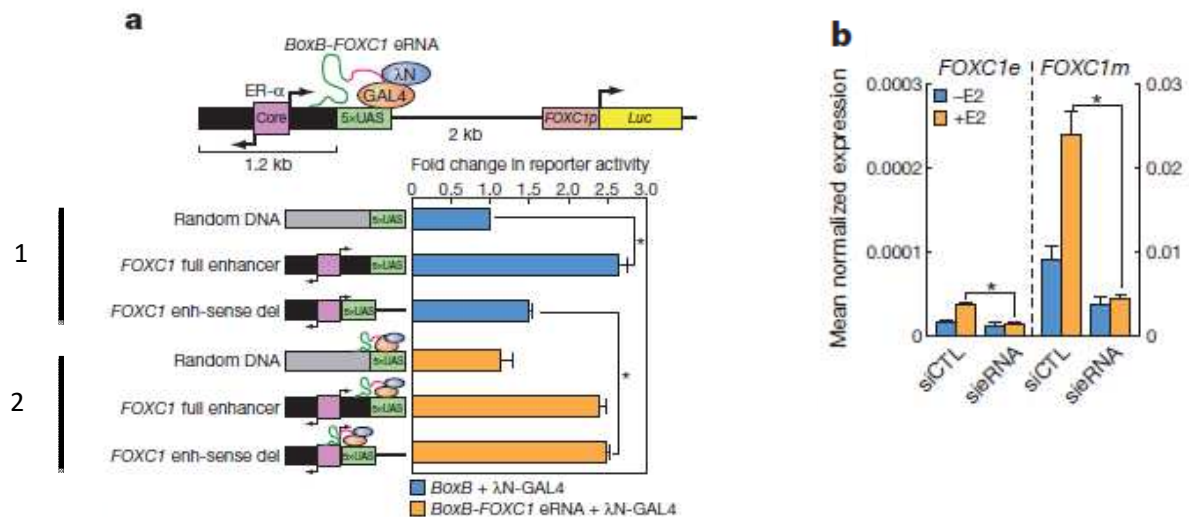


Figura 3. A) Ensayo reportero GAL4–BoxB. El gráfico de barras muestra la actividad Luc en células tratadas con E2 (24 h). Las células de las tres barras superiores (1) fueron transfectadas solamente con el vector reportero. Las células de las tres barras inferiores (2) fueron transfectadas con un vector que permite la expresión de un RNA quimérico entre el eRNA sense de FOXC1 enhancer y el RNA viral BoxB que se une a la proteína λN, otro vector que expresa el factor de transcripción quimérico Gal4-λN y con un tercer vector reportero que posee una región UAS con sitios de unión a Gal4. El UAS está ubicado río abajo del FOXC1 enhancer (1,2Kb); FOXC1 enh-sense del: construcción con una delección B) RT-qPCR para FOXC1 eRNAs (sense) y las correspondientes regiones codificantes. 'e' y 'm' después del nombre del gen indican eRNA y mRNA de cada gen respectivamente en células tratadas (+E) o no tratadas (-E) con E2. CTL, control