UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

Scienze Biologiche

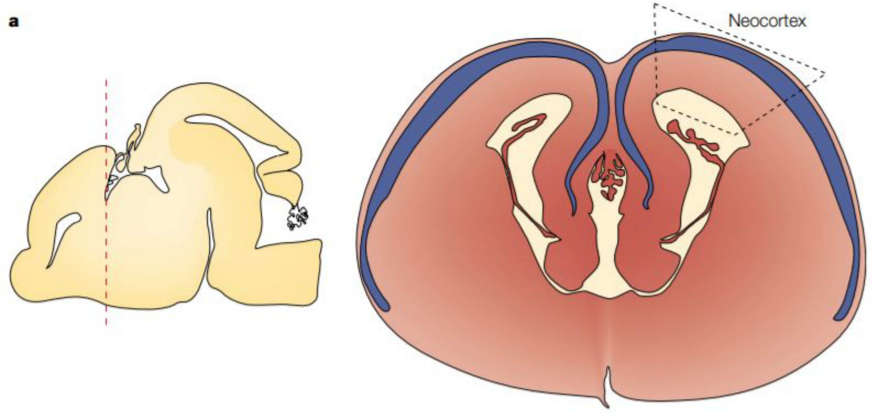
Il ruolo di HuR e di altre "RNA Binding Proteins" nei meccanismi post-trascrizionali coinvolti nel neurosviluppo in condizioni fisiologiche e patologiche.

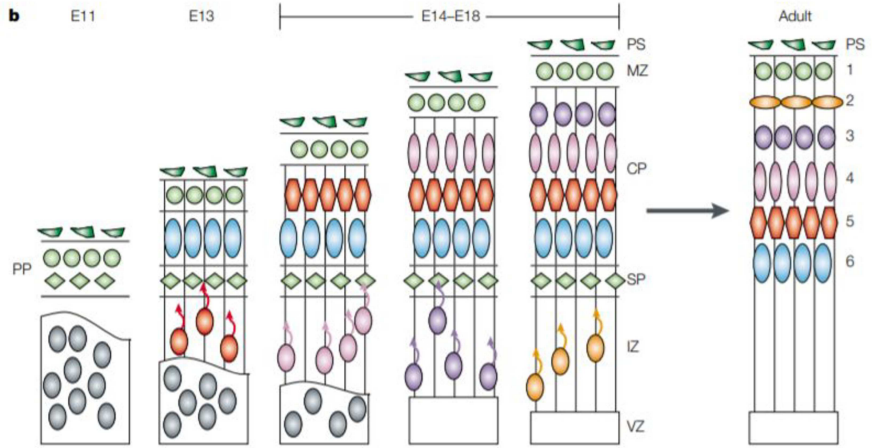
The role of HuR and other RNA Binding Proteins in post-transcriptional mechanisms involved in neurodevelopment in physiological and pathological conditions.

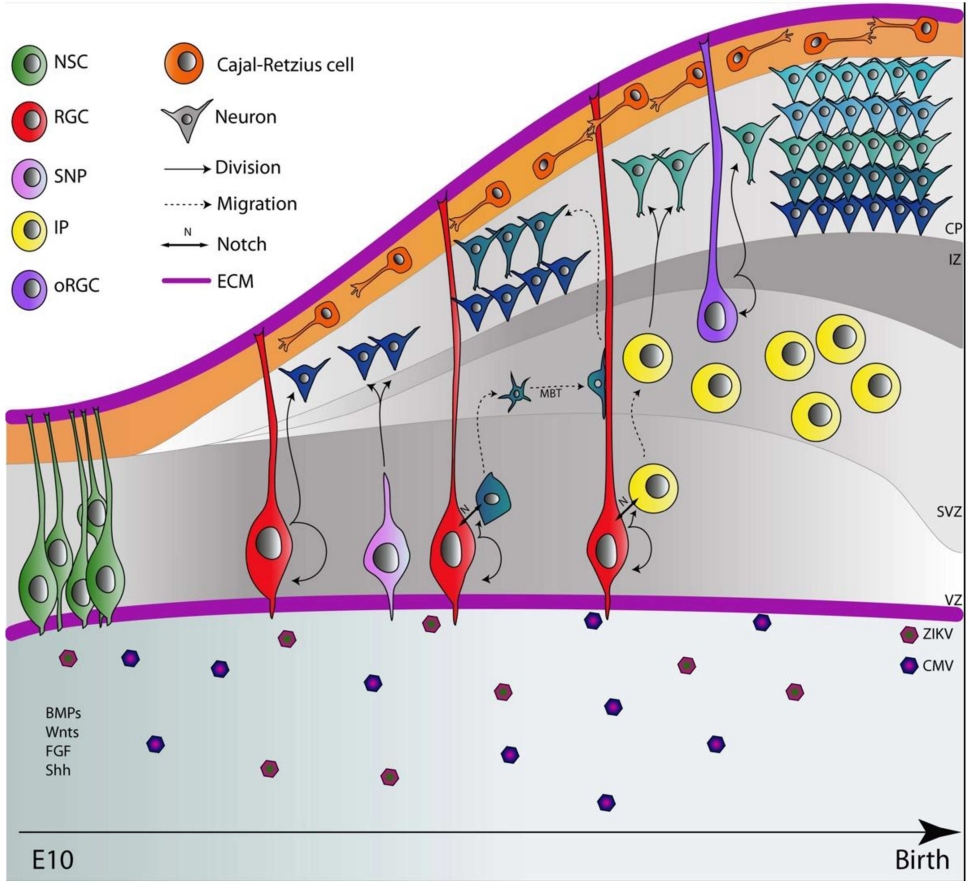
Relatrice: Anna La Teana
Laureando: Stefano Biancat-Marchet
Matricola: 1087727

Anno Accademico 2020/2021

Neurosviluppo e sviluppo della neocorteccia







Ruolo della regolazione post Trascrizionale

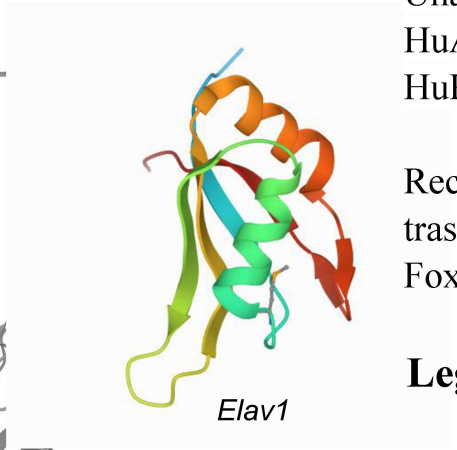
- Controllo spazio-temporale nel differenziamento delle cellule

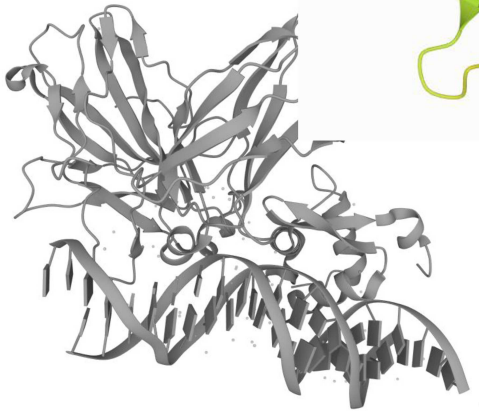
- Oltre ad una precisa regolazione dell'espressione genica, vi è anche una precisa regolazione post trascrizionale che include: lo splicing-alternativo, la localizzazione e lo spostamento dell'mRNA, la stabilità dell'mRNA in contrapposizione al suo decadimento, ed infine la regolazione della sintesi proteica.

- Tutti i meccanismi post-trascrizionali implicati nel neurosviluppo hanno un obiettivo: un efficiente controllo spazio-temporale della concentrazione e la presenza di specifiche sequenze proteiche.

- Hanno un ruolo importante molecole a secrezione extracellulare come WNTs, rilasciata negli assoni in crescita; Inoltre diverse molecole con attività molto dinamica hanno un ruolo post-trascrizionale, come le RBP e RP, oppure acidi nucleici come il lungo RNA-non codificante (IncRNA) ed il microRNA (miRNA)

RNA binding protein HuR





Fattori di trascrizione Foxp1 e Foxp2 membri della famiglia dei fattori Forkhead-box (Fox) associati a disturbi dello spettro autistico

Una importante famiglia di RBPs sono gli antigeni Hu; questi antigeni sono: HuA/HuR,HuB,HuC,HuD, e Hel-N1
HuR omologo di ELAV1 in Drosophila Melanogaster.

Recentemente, è stato identificato Wnt3 come un possibile regolatore post trascrizionale di Foxp2 ma non di Foxp1. Regolazione post-trascrizionale di Foxp2 ⟶ target di diversi miRNA ovvero di miR9 e miR-13222.

Legame delle HuR con l'mRNA, guida la traduzione in sistemi in via di sviluppo

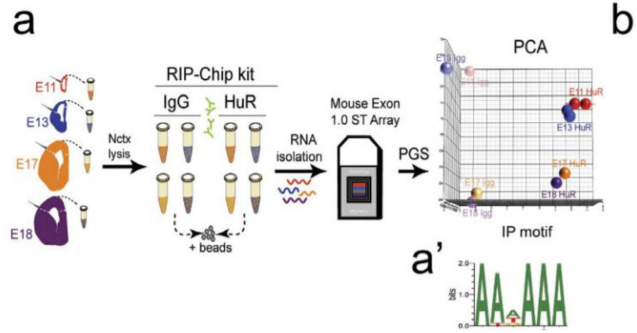
↓

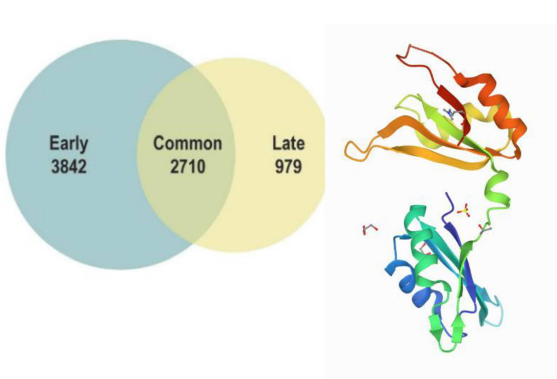
conseguenza di questa associazione specifica è la regolazione traduzionale di Foxp1 e Foxp2 in momenti diversi durante il neurosviluppo

HuR

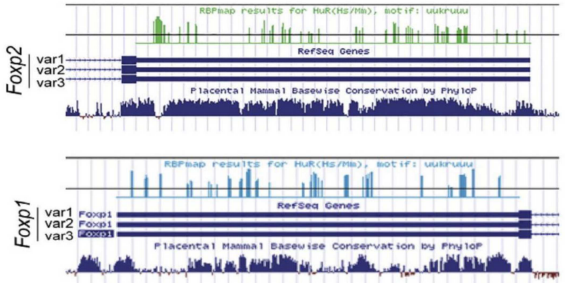
- Analisi tramite Immunoprecipitazione delle RBP accoppiata con un'analisi microarray (RIP-Chip) (RNA-Binding Protein Immunoprecipitation-Microarray (Chip) Profiling) ⟶ **Per determinare i legami di HuR e la tempistica con Foxp1 e Foxp2**

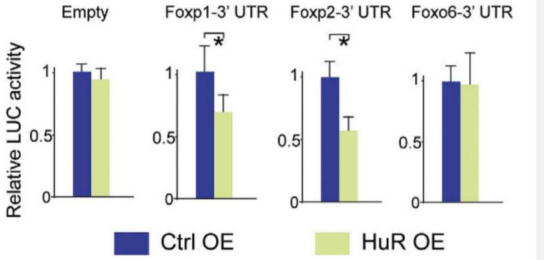
- **HuR può regolare Foxp1 e Foxp2 tramite le loro 3'UTRs**: Analisi con qPCR di RIPs-HuR regolazione funzionale delle 3'-UTRs di Foxp1 o Foxp2 in presenza con HuR usando un'analisi che sfrutta una luciferasi (in HEK293T cells) generata una linea di HuR condizionalmente inattiva (knock-out) chiamata HuR cKO, tramite la sua ricombinazione di HuR con Emx1-Cre in topo poi qRT-PCR su tutto l'mRNA isolato in E13 WT e HuR cKO della stessa linea.





Struttura di due motivi in tandem di riconoscimento dell'RNA di Antigene R Umano



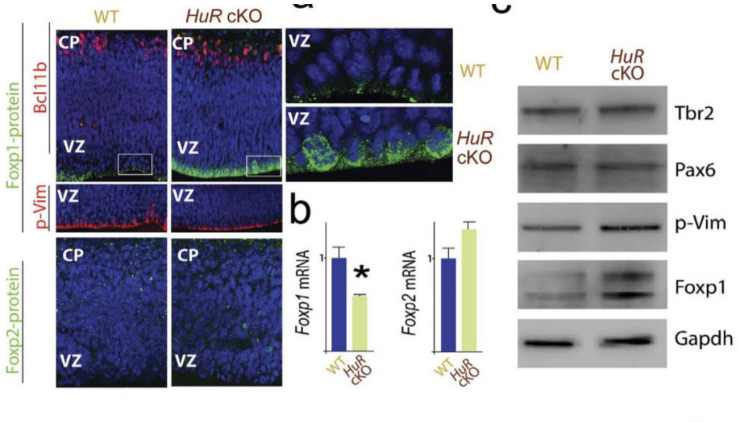


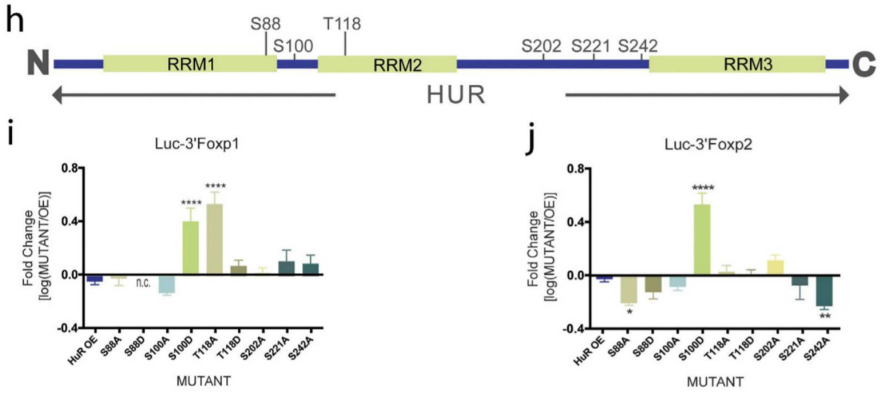
I siti di fosforilazione su HuR hanno un ruolo centrale nella regolazione post-trascrizionale di Foxp1 e Foxp2.

Sono stati transinfettati HuR fosfomutanti e fosfomimici con la 3’-UTR di Foxp1 e Foxp2-luciferasi, costruite in cellule HEK293T ed è stata fatta poi un'analisi della traduzione:

- Foxp1-luciferasi, i fosfomimici S100D e i fosfomutanti T118A hanno mostrato un significativo aumento della traduzione
- Foxp2-luciferasi i fosfomimici S100S hanno avuto una maggiore traduzione che il wild-type, ma i fosfomutanti S88A e S242A hanno mostrato un livello significativamente più basso di traduzione di Foxp2

Sito S100 importante nella regolazione della traduzione di entrambi gli mRNA mentre i siti S88, T118, e S242 contribuiscono nella regolazione differenziale di questi due trascritti. Ad opera di: COX-2, cyclin-A, cyclin-D; Cdk1 per S202,PKC α/δ per S221.





Altre RBP essenziali durante il neurosviluppo

- FMRP → N-caderine (transizione da neuroni multipolari a bipolari neuroni glutammatergici)
- Denr → posizionamento definitivo, la ramificazione dendritica, e le caratteristiche delle spine dendritiche nelle proiezioni dei neuroni postnatali
- Nova2 → gruppi di trascritti mRNA associati alla migrazione, che includono la Reelin pathway
- DDX3X (elicasi DEAD-BOX) RNA-binding protein ATP-dipendente → proliferazione dei progenitori neuronali

FMRP N-terminal domain

- Musahi1 (Msi1) → mantenimento dello stato immaturo delle cellule staminali neuronali tramite la repressione della traduzione di m-Numb.

Vi sono ovviamente anche altre RBS che contribuiscono al differenziamento, e al corretto funzionamento della neocorteccia, come : Elavl4 e Celf1, Elavl1 e Elavl2, MARF1.

Altri meccanismi di regolazione post-trascrizionale durante il neurosviluppo

Le RGCs possiedono un repressore della traduzione che è il complesso eIF4E1-4E-T reprime la traduzione di fattori di trascrizione che hanno un ruolo nella migrazione radiale, come Neurogenina2

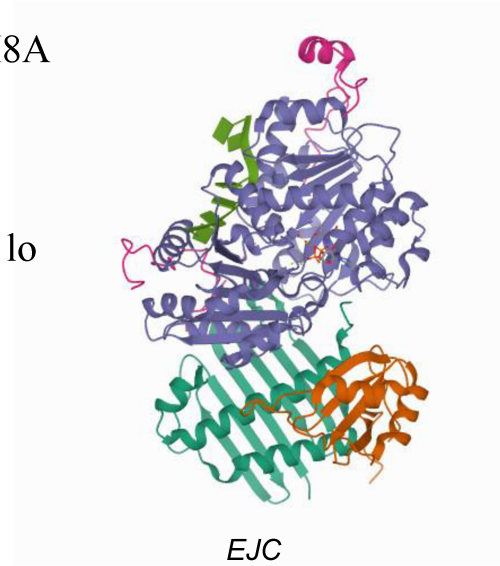
Long non-coding RNAs (IncRNAs); Come L'IncRNA Paupar regola l'espressione e l'attività di Pax6, mentre linc-Brn1b, Dali, e Pnky regolano Brn1.

Gli miRNA maturi regolano ogni step nello sviluppo neocorticale, inclusa la migrazione neuronale:

- miR-134 migrazione neuronale tramite il legame con una sequenza presente su 3'-UTR di Dcx
- miR-137 migrazione neuronale e differenziamento tramite il suo target Lsd1
- miR-9 : obiettivi specifici Map1b e Foxp2.

Malattie implicate in una non corretta traduzione

- Complesso di giunzione degli esoni (EJC), composto da EIF4A3 (DDX48), RBM8A (Y14), e MAGOH : Espansione di 5'-UTR di EIF4A3 causa la sindrome Richieri-Costa-Pereira con disabilità nell'apprendimento e nel linguaggio.
- Mutazioni missenso in DHX30, che fa parte di DExH-box RNA-elicasi comporta lo sviluppo di disordini del neurosviluppo come GDD, disabilità intellettuale (ID), compromissione nel linguaggio, e deambulazione anormale.
- La sindrome dell'X-fragile (FXS)
- La proteina nucleare legante la coda Poly(A) (PABPN1) mutazioni del gene di PABPN1 causa distrofia muscolare oculofaringea (OPMD)
- Diversi riarrangiamenti o singole mutazioni nucleotidiche del gene MARS2 causano l'atassia spastica con leucoencefalopatia


EJC

Riassunto esteso :

Con questa tesi si è voluto dimostrare l'importanza dei meccanismi post-trascrizionali, sottolineando l'importanza delle RBP, in particolare il ruolo di HuR nel neurosviluppo e soprattutto nella noeocortogenesi. Dimostrando che lega specificamente gli mRNA dei fattori di trascrizione Foxp1 e Foxp2 associati a patologie dello spettro autistico.
Questo legame avviene a seconda di una precisa temporalità, si è evidenziato che tale regolazione deriva da una inibizione della traduzione ottenuta tramite il legame con le regioni 3'-UTR dei suddetti trascritti. Inoltre è stato messo in luce come la fosforilazione differenziale di alcuni siti su HuR porti alla regolazione della sua attività. In aggiunta a ciò è stato visto che HuR é solo una delle molteplici RBPs coinvolte nel neurosviluppo, che formano un gruppo molto eterogeneo di proteine con diversi target e che portano tutte ad una regolazione temporale e spaziale della sintesi proteica.
In aggiunta a ciò, per una visione più completa del complesso meccanismo alla base dello sviluppo della neocorteccia, sono state brevemente analizzate altre molecole implicate in questo sviluppo ovvero : complessi di repressione della sintesi, IncRNA, miRNA.
Infine per sottolineare l'importanza che tutti i processi descritti conducano ad una fine regolazione post-trascrizionale sono state analizzate alcune patologie connesse con errati meccanismi post-trascrizionali.

Ringrazio per l’attenzione.

Bibliografia :

Park, Y., Page, N., Salamon, I., Li, D., & Rasin, M.-R. (2021). Making sense of mRNA landscapes: Translation control in neurodevelopment. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, e1674. https://doi. org/10.1002/wrna.1674

Popovitchenko, T. et al. The RNA binding protein HuR determines the differential translation of autism-associated FoxP subfamily members in the developing neocortex. Sci. Rep. 6, 28998; doi: 10.1038/srep28998 (2016)

Gupta, A., Tsai, LH. & Wynshaw-Boris, A. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3, 342–355 (2002). https://doi.org/10.1038/nrg799

Agirman, G., Broix, L. and Nguyen, L. (2017), Cerebral cortex development: an outside-in perspective. FEBS Lett, 591: 3978-3992. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924

https://www.rcsb.org/structure/4QVZ
https://www.rcsb.org/structure/4EGL
https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H334
https://www.uniprot.org/uniprot/O15409
https://www.rcsb.org/structure/3EX7