



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

**RUOLO DELLE FORME NON CANONICHE DEGLI ACIDI NUCLEICI NELLA PATOGENESI
MOLECOLARE DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE DOVUTE ALLE ESPANSIONI
MICROSATELLITARI**

**ROLE OF NON-CANONIC FORMS OF NUCLEIC ACIDS IN THE MOLECULAR PATHOGENESIS OF
NEURODEGENERATIVE DISEASES DUE TO MICROSATELLITE EXPANSIONS**

Tesi di Laurea di:

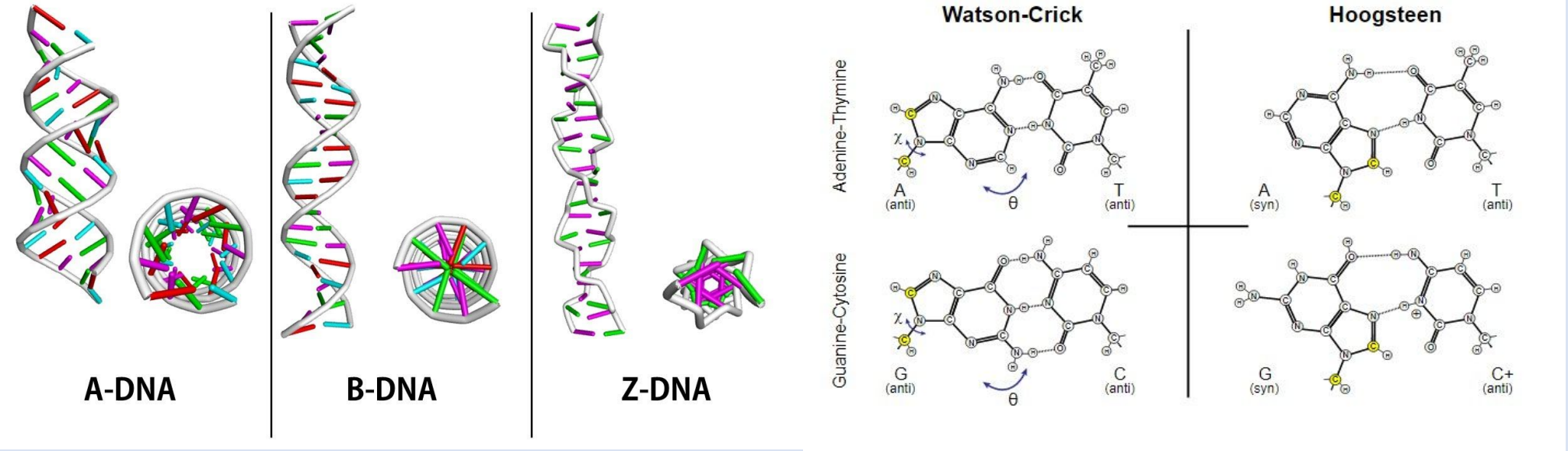
Matteo Manduzio

Docente referente:

Anna La Teana

Sessione autunnale A.A. 2021/2022 - Anno Accademico 2021/2022

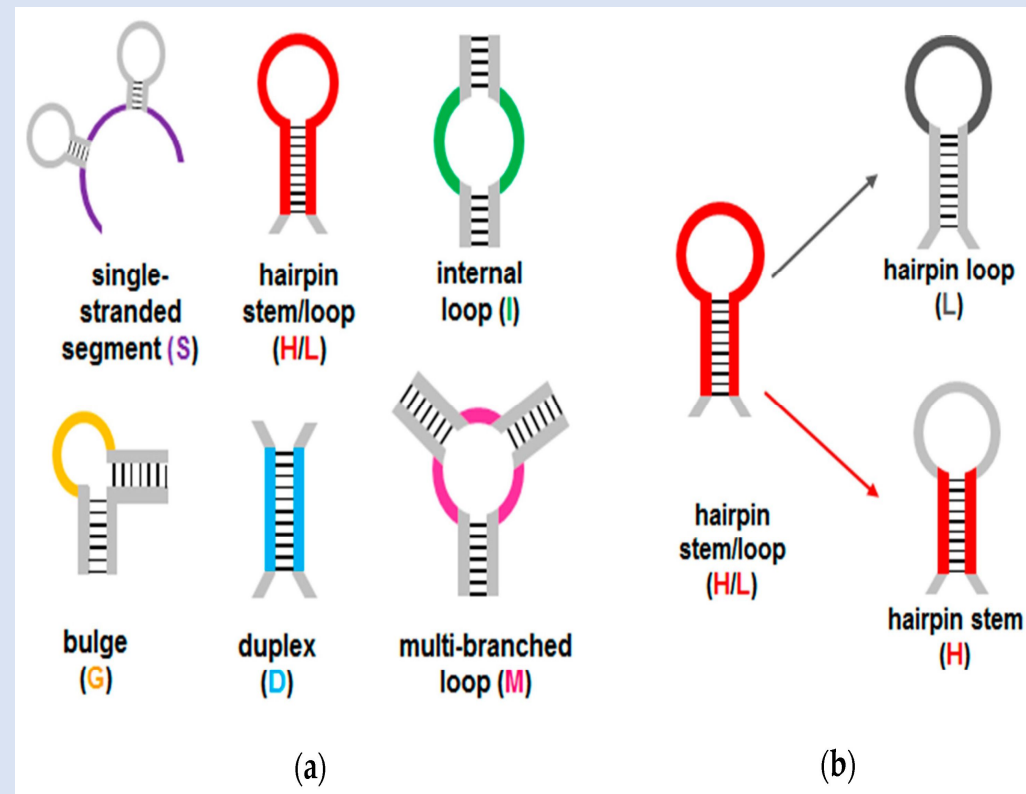
Dopo l'epocale scoperta della **struttura a doppia elica** del **DNA** da parte di **Watson e Crick**, il **DNA** è stato a lungo considerato una molecola piuttosto stabile, in virtù del delicatissimo ruolo che svolge in ordine alla conservazione dei caratteri ereditari. Tuttavia, successivamente, il **DNA** si è dimostrato essere una molecola con **elevato polimorfismo**: infatti, anche rimanendo nell'ambito della **struttura a doppia elica destrorsa** di **Watson e Crick**, è possibile distinguere varie tipologie di **duplex (A, B e Z)**, ognuna delle quali, a sua volta, può presentare **diverse varianti**.



Indagini successive (**Hoogsteen, 1963**) individuarono meccanismi alternativi di accoppiamento delle basi azotate. Le **coppie di basi di Hoogsteen**, sono uguali alle **coppie di basi di Watson e Crick**, tuttavia la purina assume una **conformazione diversa** rispetto alla pirimidina (**rotazione di 180°** circa sul **legame glucosidico**). Le **coppie di basi di Hoogsteen** compaiono frequentemente in **triple eliche** associate a **malattie genetiche**.

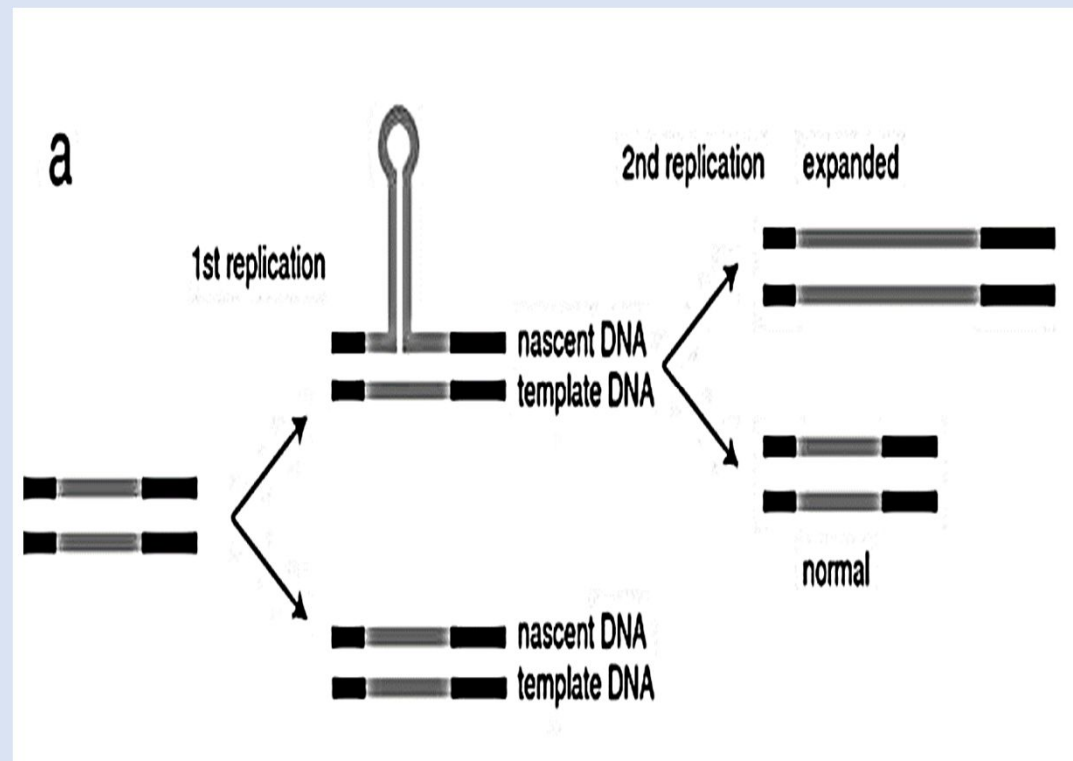
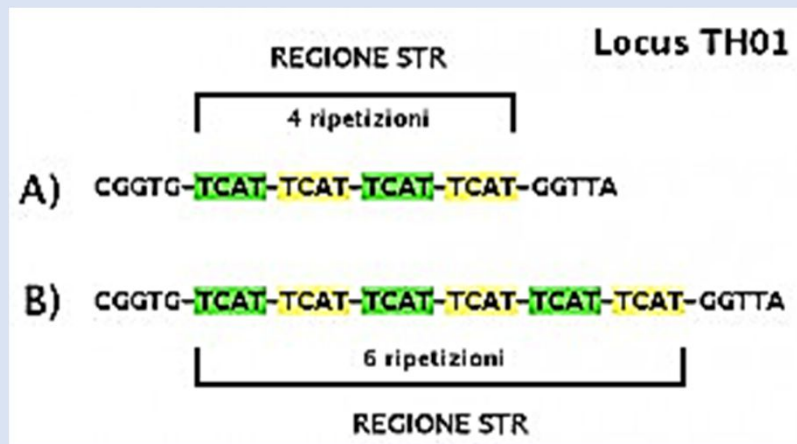
In seguito sono state, inoltre, individuate delle **strutture limitate a specifici tratti del DNA**, in cui l'appaiamento tra le basi azotate non si effettua per mezzo dello stesso meccanismo che coinvolge le **strutture duplex**, che fungono da **collegamento tra più regioni a doppia elica**.

- **forme hairpin.**
- **forme bulge.**
- **le three and four way junctions.**
- **le strutture triplex**, in cui un **terzo filamento di DNA** è inserito nel **solco maggiore del DNA B**, a doppio filamento, ed è unito da **legami idrogeno di tipo Watson - Crick** tramite **accoppiamento Hoogsteen**.
- **le strutture G-quadruplex**, formate da sequenze di acidi nucleici ricche in **guanina**, che richiedono legami a idrogeno tra **quattro guanine (tetrate)** e sono stabilizzate da **cationi monovalenti** (di solito K^+).
I **G-quadruplex** possono essere costituiti, oltre che da **DNA**, anche da **RNA**.

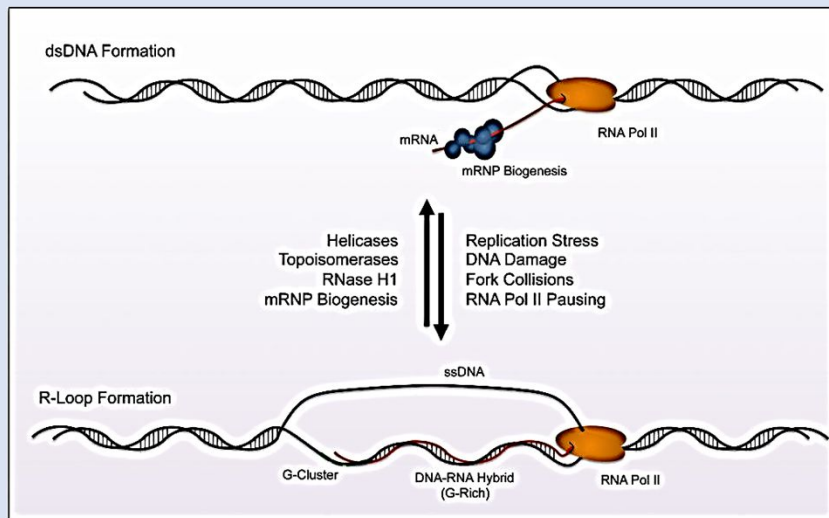


I **microsatelliti** (conosciuti anche come *simple sequence repeats* o **SSR**) sono sequenze ripetute di **DNA non codificante costituiti da unità di ripetizione molto corte (1-6 bp) disposte secondo una tipica ripetizione in tandem**, utilizzabili come marcatori molecolari di loci genici. La loro presenza nel genoma umano non influisce per più del 3%, ma si pensa che comunque essi svolgano funzioni essenziali nel meccanismo dell'**evoluzione** e nella **trasmissione genetica**. Sono presenti in tutto il genoma, ma si trovano prevalentemente nei **promotori non codificanti**, negli **introni**, nelle **sequenze non tradotte (UTR)** localizzate alle estremità **5'** e **3'** dell'**RNA messaggero** e nelle **regioni intergeniche**. I microsatelliti, a parte le normali funzioni nei meccanismi cellulari, possono andare incontro a una **sintesi de novo (espansione)**, la quale è collegata ad alcune **malattie neurodegenerative**. Ad esempio:

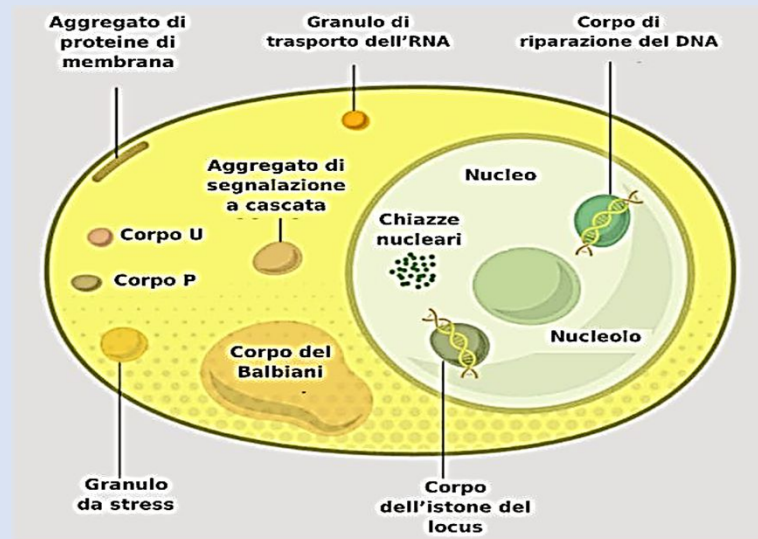
- la **corea di Huntington**
- la **sindrome di Martin-Bell (o sindrome dell'X-fragile)**
- la **distrofia miotonica**
- l'**atrofia muscolare spinobulbare**



Gli **R-loop**, sono strutture **non canoniche del DNA** in cui al posto della classica doppia elica sono presenti **due filamenti di DNA e uno di RNA**. Essi si formano durante i processi di **trascrizione del DNA**. La **rottura a doppio filamento del DNA**, la più pericolosa tra le possibili lesioni del genoma, può avvenire **durante la trascrizione**, proprio **attraverso l'azione degli R-loop**. Quindi essi possono produrre **danni al DNA** e portare a un'**instabilità genomica** e, poiché si formano anche in cellule non proliferanti come i **neuroni**, possono dar luogo a **sindromi neurodegenerative**.



Formazione di R-loop



LLPS intracellulare

L'**xtrRNA** è l'espressione di **RNA** trascritto da **ripetizioni in tandem (SSR)** espansive nel corso delle cosiddette **malattie da espansione dei microsatelliti**, in cui una **tripletta di nucleotidi viene ripetuta un numero di volte anomalo**, fino a diverse centinaia di volte.

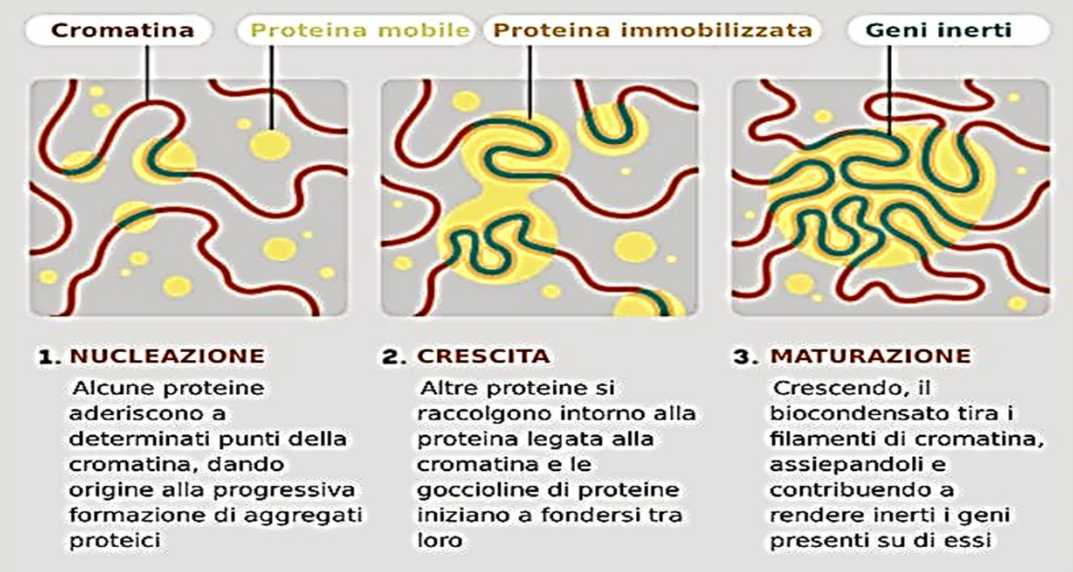
L'**xtrRNA** produce, all'interno della cellula, una condizione di ulteriore **affollamento molecolare**, che dà origine a una **separazione di fase liquido-liquido (LLPS)** da cui prendono origine **condensati molecolari** che, concentrando **specifiche proteine (clienti)** e dando origine a **strutture transienti** che possono mostrare un **aumento di attività**, influenzano importanti funzioni biologiche, dall'**espressione genica** al **silenziamento di specifiche regioni cromosomiche**.

Alcuni studi suggeriscono che le **proprietà** dei **condensati molecolari** che si formano a partire dall'**xtrRNA** potrebbero cambiare a seconda della **struttura** degli **RNA** implicati:

- Le ripetizioni **rCAG** e **rCUG** sembrano avere una conformazione **non canonica a forcina** (*hairpin*)
- Le ripetizioni **rGGGCC** ricche di **guanina** sono frequentemente osservate nella **mutazione C9orf72** dei pazienti affetti da **SLA e/oFTD** (**sclerosi laterale amiotrofica /demenza frontotemporale**) e sembrano formare strutture **G-quadruplex**, anche se sono **probabilmente transitorie** e frammiste a nucleotidi di **Watson-Crick** con **coppie mismatch** intercalate.

L'**xtrRNA**, per la **separazione di fase liquido-liquido**, acquisisce un **guadagno di funzione** principalmente **attraverso la segregazione dalle proteine che legano gli acidi nucleici**, le quali a loro volta assumono una **maggiore attività chimica** e sono più in grado di reagire. L'**xtrRNA** forma **aggregati focali** e gioca un ruolo importante in diverse **malattie neurodegenerative**, perché in grado di **inibire la RNA polimerasi II** e di **silenziare i geni**. Ciò sembra avvenire nelle seguenti malattie:

- ataxia di Friedreich** (ripetizioni **GAA**)
- distrofia miotonica di tipo I** (ripetizioni **CTG**)
- demenza frontotemporale** (ripetizioni **GGGG**)
- sindrome dell'X fragile**, con un probabile meccanismo di **repressione genica** mediato dalla formazione di **condensati molecolari proteici**

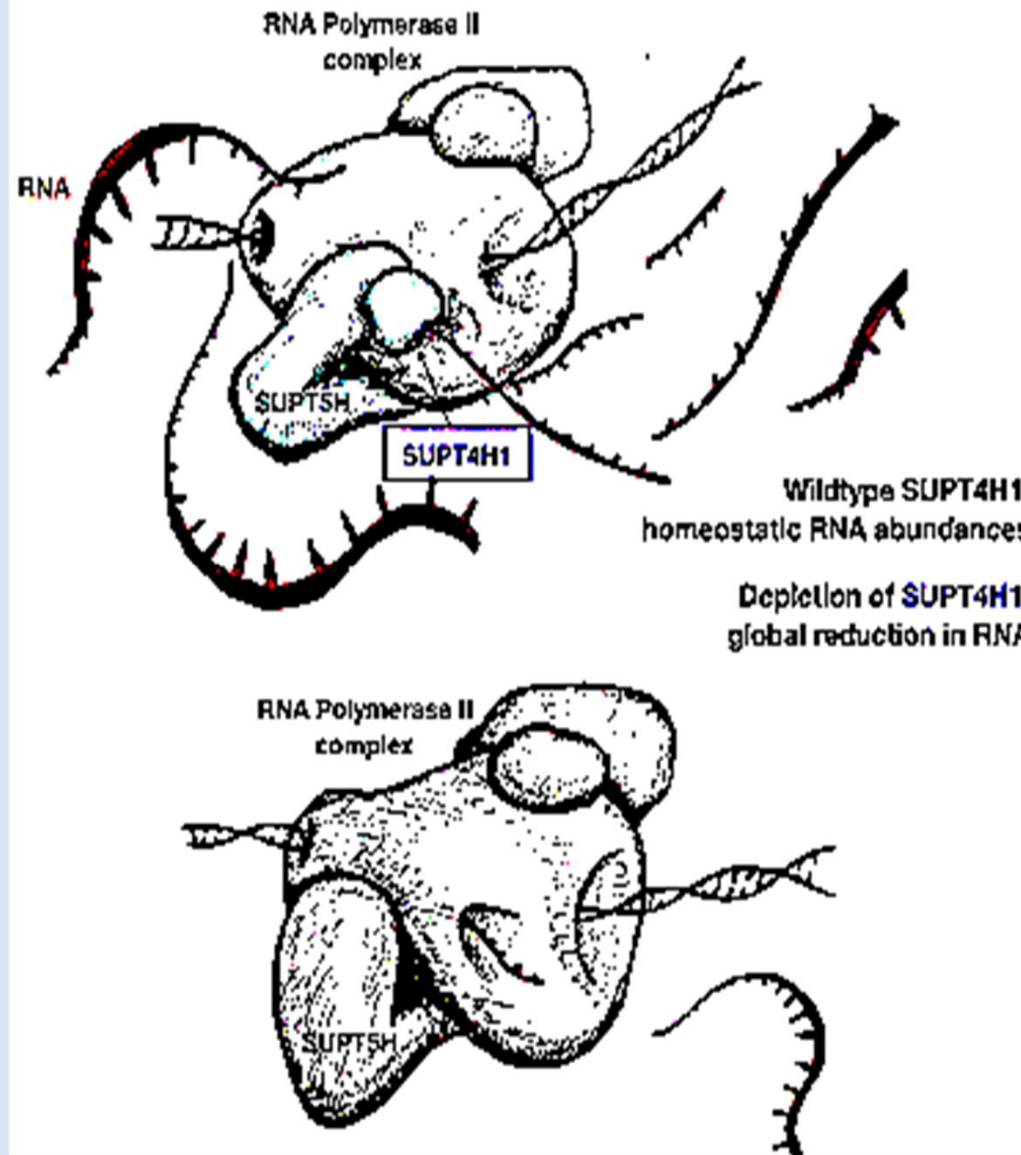


Silenziamento genico da proteine derivanti da condensati

Tuttavia la trascrizione delle **SSR microsatelliti** in **xtrRNA** avviene in maniera importante se:

- i **tratti ripetitivi** hanno un contenuto in **GC molto elevato**.
- vi è e la **presenza** di un **fattore che induce la sensibilità (DSIF)**, di cui fanno parte le **proteine Supt** che regolano l'**elaborazione dell'RNA** e l'**allungamento trascrizionale** da parte della **RNA polimerasi III**.

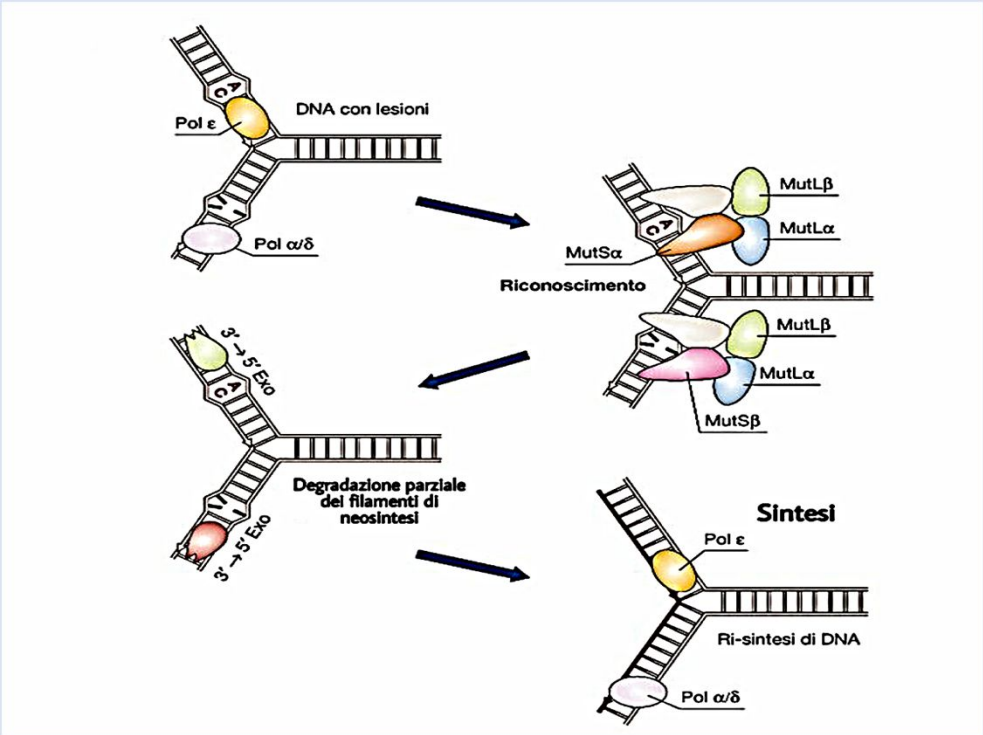
Per questo motivo è **improbabile** che la trascrizione in **xtrRNA** vada a buon fine se si verificano **espansioni microsatellitari** trascritte dalla **RNA polimerasi III**.



Per quanto riguarda il **meccanismo di espansione del DNA microsatellitare**, si pensa al formarsi, durante la **sintesi di DNA**, di **forme hairpin** e **G-quadruplex** in seguito a un accoppiamento **non canonico**. Per l'esattezza, si suppone che questo capiti nel **filamento ritardato**, così che, al momento di sintetizzare il **frammento di Okazaki** successivo, la **DNA polimerasi** ripassi su una porzione di **DNA** che, in realtà, è già stata replicata e che ciò provochi **slittamenti** e **disallineamenti** da cui prendono origine le **strutture non canoniche**. Se le **strutture non canoniche** non vengono **riparate** durante i successivi cicli di replicazione, possono dar luogo a **espansioni permanenti**. Gli eventi che portano all'**amplificazione delle ripetizioni** sono quindi intimamente collegati alla **riparazione delle strutture non canoniche del DNA** e al **danno al DNA**.

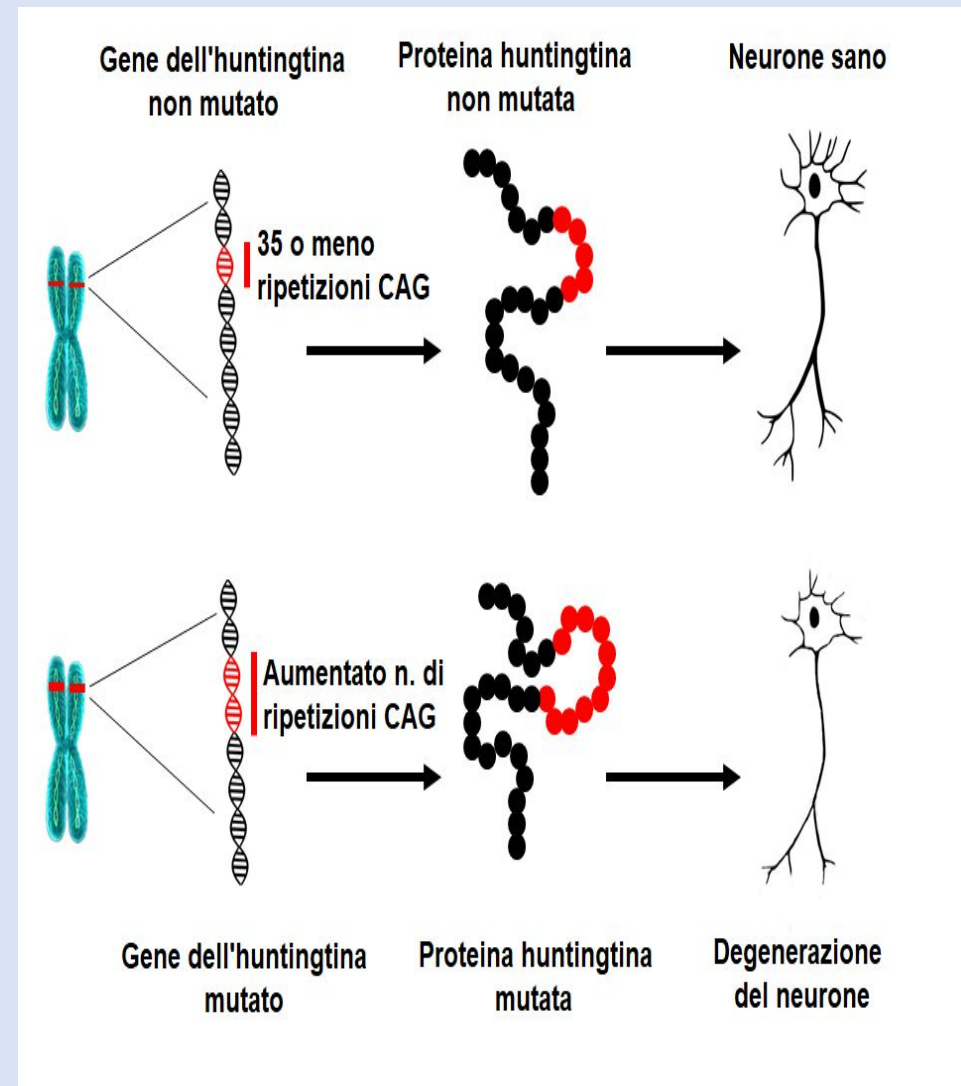
Esistono diverse vie coinvolte **contemporaneamente** nel **danno** e nel **controllo del danno al DNA microsatellitare**:

- ❑ la **mismatch repair (MMR)**, che utilizza le cosiddette proteine di riconoscimento del danno (**MutS α , β e γ**) per riparare i **danni al DNA**. Si pensa che una carenza di **MMR** determini il **mancato riconoscimento** di strutture **non canoniche del DNA**.
- ❑ la **sintesi fuori registro** correlata alla riparazione della **rottura a doppio filamento (DSB)**, particolarmente pericolosa per l'integrità del **DNA**.
- ❑ la **replicazione indotta da rotture (BIR)**, che Interviene quando il sistema della **DNA replicasi** non funziona correttamente. Si ritiene che essa sia selettiva per **ripetizioni ricche di GC** e causerebbe **inversioni di forcilla** che a loro volta genererebbero **strutture a quattro vie (four way junction)**.



Mismatch repair negli eucarioti

L'xtrRNA trascritto dalle **sequenze espanse di DNA microsatellitare** potrebbe essere direttamente coinvolto nello **splicing dell'HnRNA**, che serve per la formazione dell'**RNA messaggero** costituito da **sole sequenze codificanti** e si affida a un **ribozima** formato da **proteine** e **piccole molecole di RNA nucleare (snRNA)**, attraverso il reclutamento di fattori che **non sono tipicamente coinvolti nello splicing**, come il fattore di splicing alternativo **SRF6**, il quale ne altererebbe il funzionamento per produrre un **mRNA** che viene tradotto in **huntingtina mutata**, una proteina contenente ripetizioni tronche coinvolta nella **malattia di Huntington**.



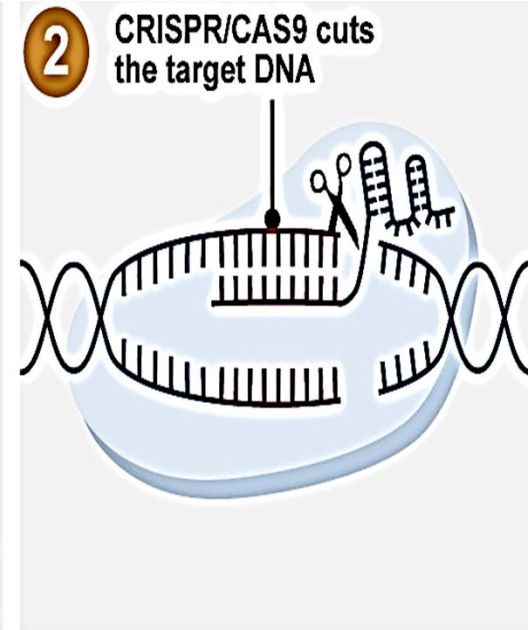
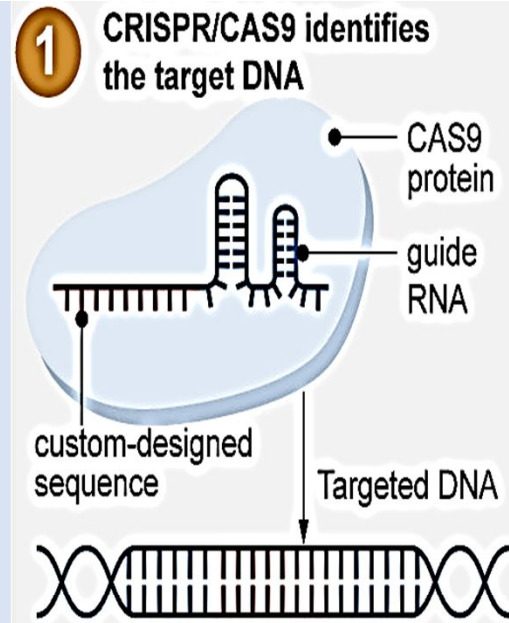
L'effetto delle **espansioni microsatellitari** sulla **trascrizione** e sullo **splicing** lascia prefigurare la possibilità di **approcci terapeutici**.

Ad esempio:

- si potrebbero **interrompere le interazioni** tra **xtrRNA** e gli **R-loop**: in effetti ciò è stato dimostrato per la **FXS** e la **FRDA** utilizzando **piccole molecole** e **acidi nucleici**.
- si potrebbe anche modulare la funzione del **fattore di elongazione Spt4** riducendo l'espressione degli **xtrRNA**.

Con l'avvento delle tecnologie dell'**editing genetico** potrebbe anche essere possibile l'**eliminazione diretta** delle **espansioni microsatellitari**, quindi **reprimere** l'espressione degli **xtrRNA** e invertire i **meccanismi epigenetici repressivi** da essi indotti.

CRISPR-Cas9 ha dimostrato che si può **bloccare** la funzione del **promotore** e **silenziare l'allele mutante espanso** nella **malattia di Huntington**. Tuttavia, pur essendo i potenziali terapeutici basati sulla **CRISPR** entusiasmanti, essi nascondono potenziali pericoli per via dei possibili effetti «**fuori bersaglio**».



Source: GAO. | GAO-20-478SP

Ricerche recenti hanno indicato che le cosiddette **forme non canoniche** degli **acidi nucleici**, **transitorie** e **non**, svolgono un ruolo importante per quanto concerne la patogenesi di diverse importanti malattie per mezzo della **modulazione** di alcune funzioni come la **regolazione dell'espressione genica** attraverso la **trascrizione** e la **traduzione**, la **regolazione epigenetica della cromatina** e la **ricombinazione del DNA**. I **trascritti** generati da **sequenze ripetute di geni legati alle malattie neurodegenerative** formano **strutture non canoniche** che sono coinvolte, anche attraverso un **meccanismo di separazione di fase liquido-liquido**, nel trasporto e nella formazione di **condensati molecolari** che possono avere effetti potenzialmente gravi. Ma, nello stesso tempo, hanno consentito di prefigurare **potenzialità terapeutiche**, per quanto ancora immature e non scevre da effetti indesiderati e gravi.

BIBLIOGRAFIA

Hisae Tateishi-Karimata and Naoki Sugimoto, Nucleic Acids Research, 2021, Vol. 49, No. 14

Kushal J. Rohilla¹ and Keith T. Gagnon, RNA biology of disease-associated microsatellite repeat expansions, Acta Neuropathologica Communications (2017)

David F Allison and Gang Greg Wang, R-loops: formation, function, and relevance to cell stress, Cell Stress, Vol. 3, No. 2

Agnese Cristini, Giulia Ricci, Sébastien Britton, Giovanni Capranico, Natalia Gromak, Olivier Sordet et al., Dual Processing of R-Loops and Topoisomerase I Induces Transcription-Dependent DNA Double-Strand Breaks, Cell Reports, Volume 28, Issue 12, september 17

Clifford P. Brangwinne, Christian R. Eckmann, David S. Courson, Agata Rybarska, Carsten Hoege, Jöbin Gharakhani, Franck Jülicher and Anthony A. Hyman, Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation, Science, 200

Allison, Fondamenti di Biologia Molecolare, Zanichelli Editore, (2008)