UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

RNA CIRCOLARE NEL CANCRO

CIRCRNA IN CANCER

Tesi di Laurea di:

Filippo Centanni

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Anna La Teana

Sessione AUTUNNALE

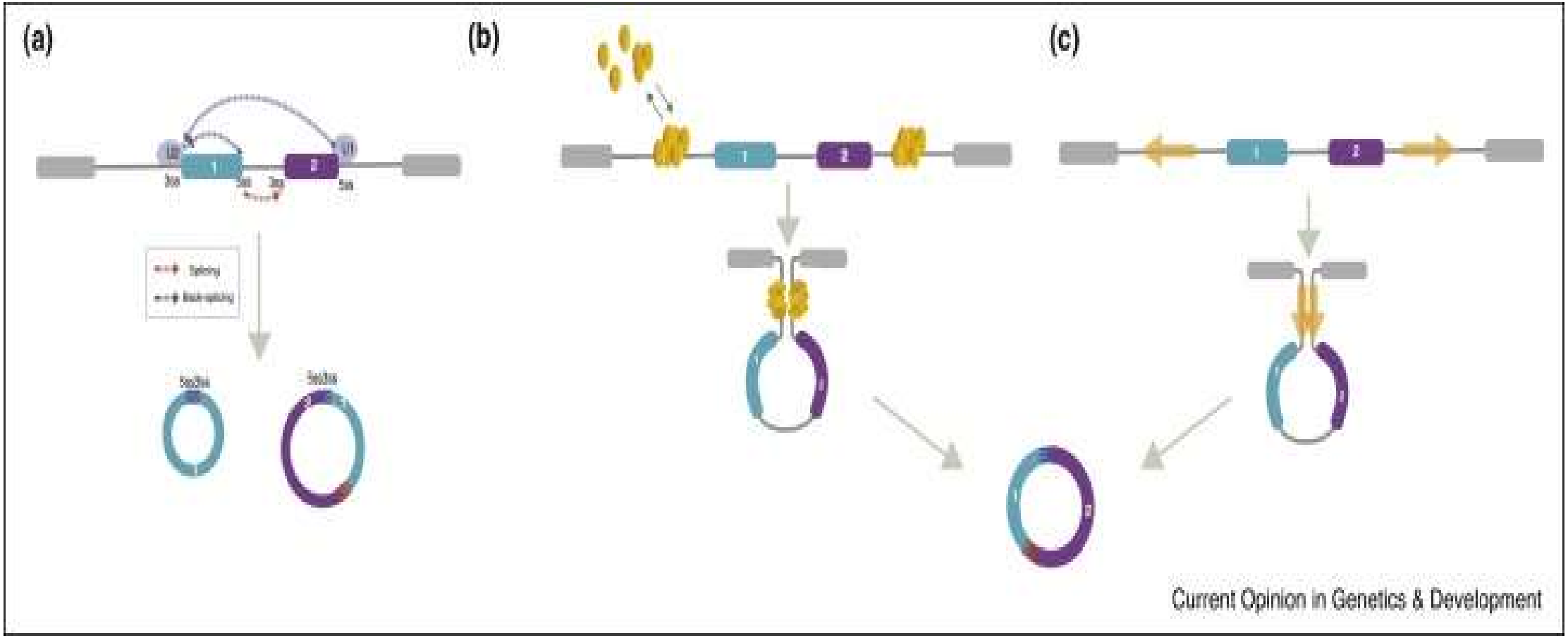
Anno Accademico 2019/2020

INTRODUZIONE

Gli RNA circolari (circRNA) sono una classe di molecole di RNA endogeni non codificanti con una struttura chiusa covalentemente. Sebbene, sin dagli anni ’70, sia nota la loro esistenza in viroidi ed eucarioti, solo nel ventunesimo secolo, con lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento dell'RNA ad alto rendimento (RNA-seq) e della bioinformatica, è stata scoperta l'ampia espressione dei circRNA, in particolare nelle cellule dei mammiferi. Soprattutto, la maggior parte dei circRNA sono espressi in modo aberrante in condizioni patologiche e in un modo tessuto-specifico come lo sviluppo e la progressione del cancro e recenti progressi nel campo dei circRNA ne descrivono future applicazioni come biomarcatori di tali disordini

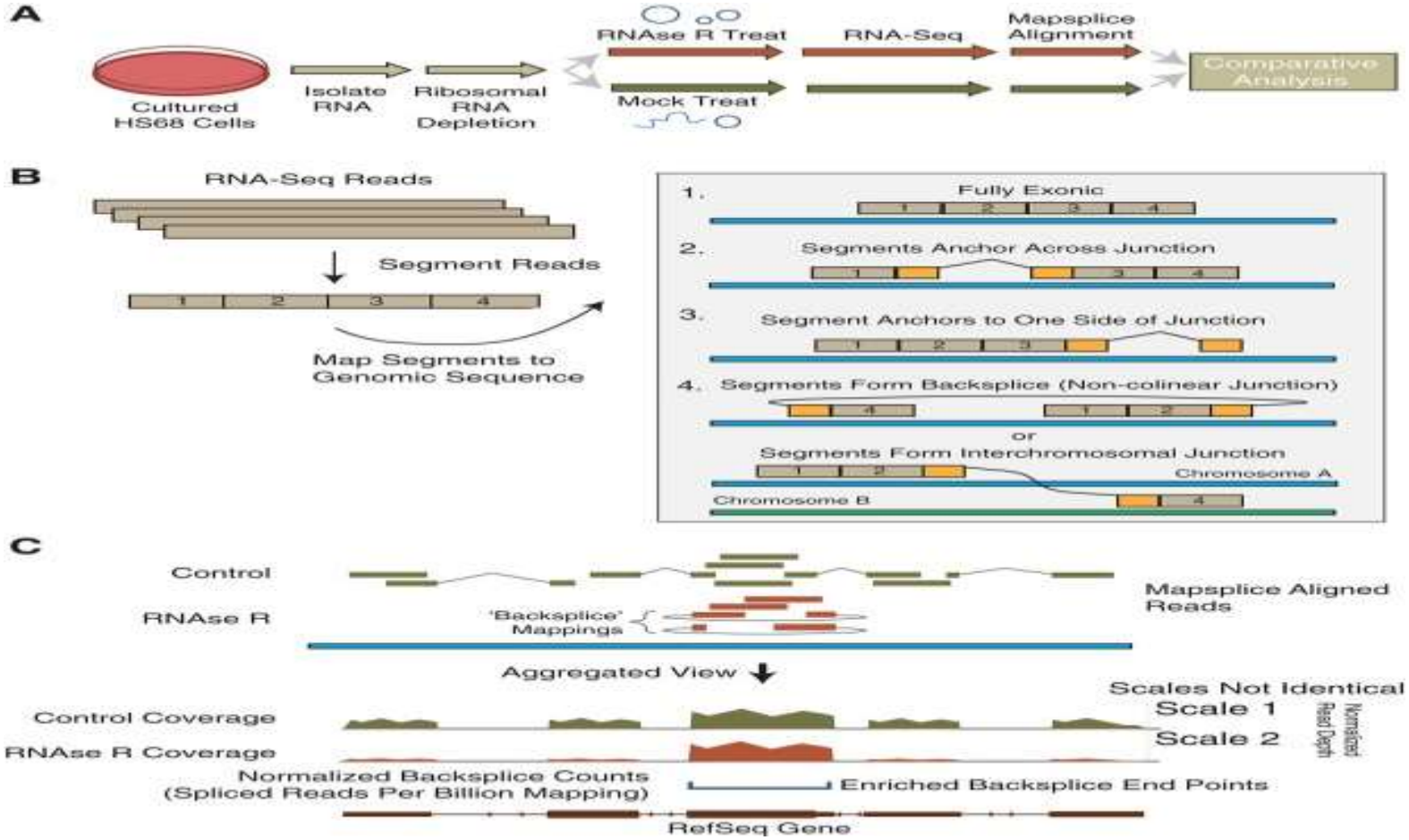
COME SI FORMANO

Sono generati da un processo denominato ‘back-splicing’, in cui uno spliceosoma utilizza un sito di splicing 3 ’ di un esone a monte (accettore) e un sito di splicing 5 ’ di un esone a valle (donatore) in un pre-mRNA lineare (Fig.1a). Il loro meccanismo di formazione include principalmente tre modelli (mostrati in figura).



RILEVAMENTO E QUANTIFICAZIONE

STRATEGIA 'CircleSeq': l'RNA totale viene isolato da una linea cellulare, privato di RNA ribosomiale e quindi trattato con RNasi R (fig.2A). Sequenziamento ad alta velocità di tali campioni, le cui sequenze vengono allineate al genoma umano utilizzando un algoritmo di mappatura dello splicing *de novo* (es. MapSplice; fig.2B).



PROPRIETÀ:

- Stabilità nelle cellule;
- Localizzazione citoplasmatica;
- Espressione tessuto-specifica;
- Conservazione evolutiva tra specie.

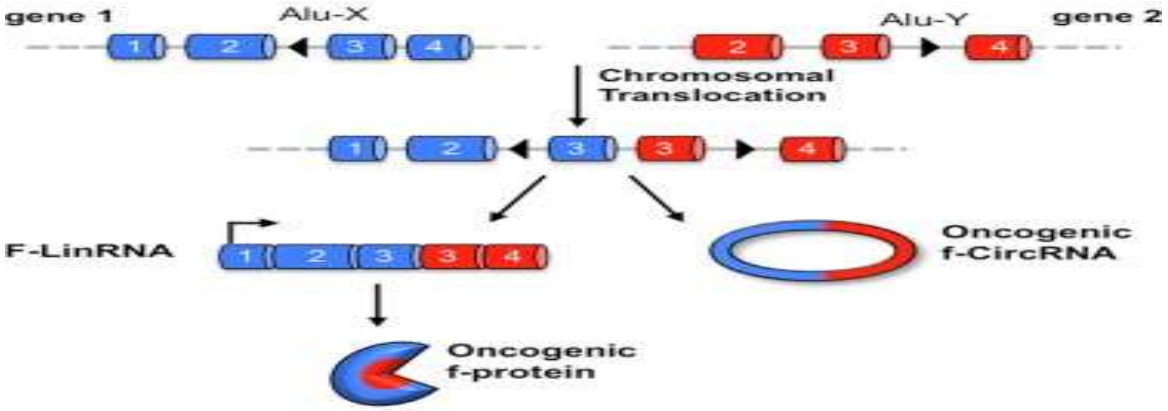
FUNZIONI:

- Regolazione espressione genica;
- Spugne e/o trasportatori di mi-RNA;
- Legame con fattori di trascrizione;
- Sviluppo muscolare;
- Trascrizione virale.

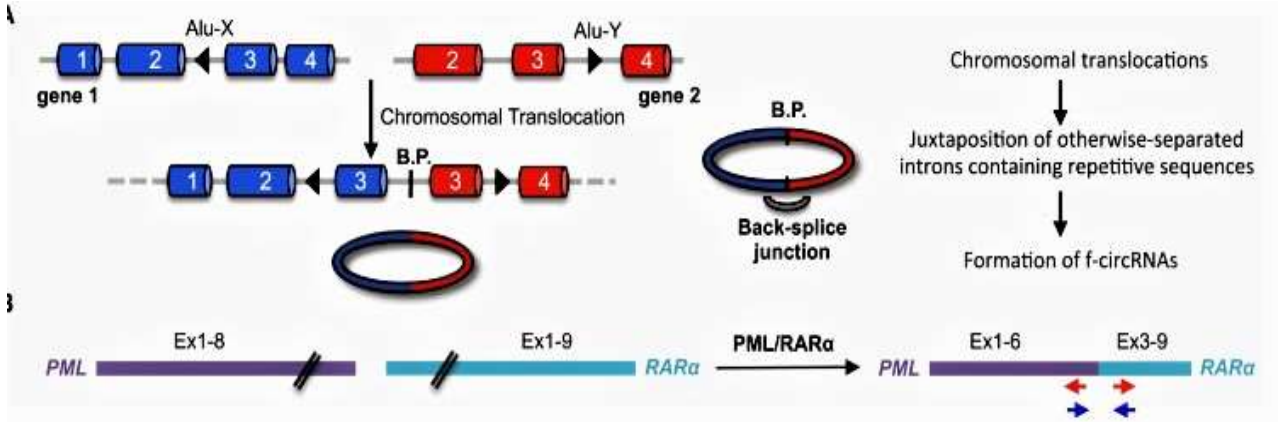
Studi recenti suggeriscono che il circRNA potrebbe avere ruoli in diversi tipi di cancro. Il coinvolgimento dei circRNA nella carcinogenesi potrebbe essere spiegato da tre diversi fenomeni:

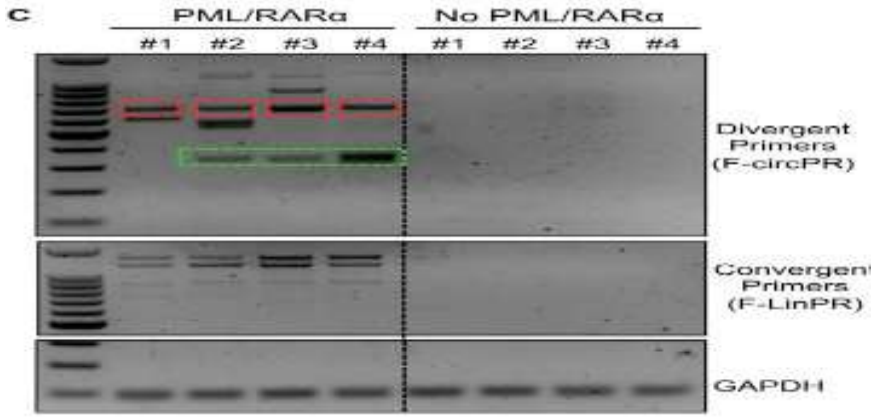
1)GENERAZIONE *DE NOVO*

Generazione di un circRNA tossico come risultato di una traslocazione genomica. Ci riferiamo a questo nuovo tipo di circRNA come circRNA di fusione o f-circRNA. (fig.3)



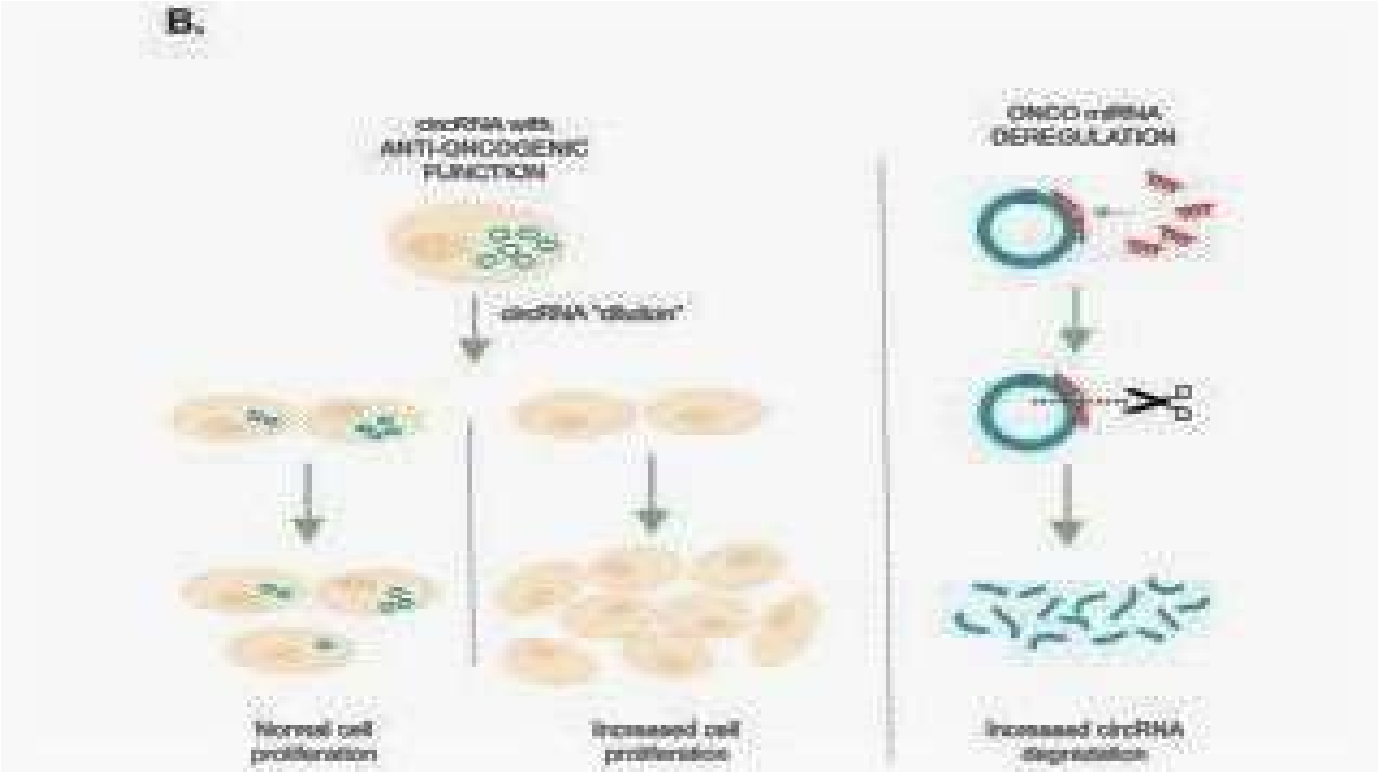
Studio di Guarnero et al. (2016): il gene di fusione PML / RARa, può dare origine a uno o più f-circRNA. (fig. 3B;C). L'espressione di f-circRNA ha mostrato un tasso proliferativo più elevato rispetto alle cellule di controllo, suggerendo che gli f-circRNA sono effettivamente funzionali e promotori del tumore.





2)DOWNREGULATION DI UN CIRCRNA ANTI-PROLIFERATIVO

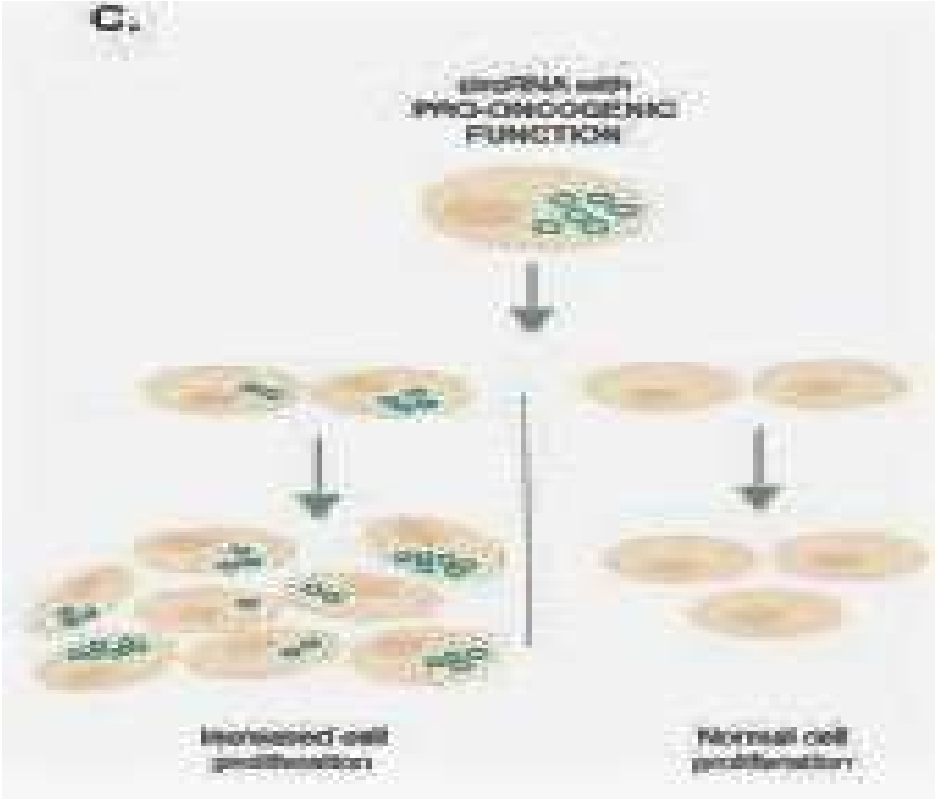
Prevede la downregulation di uno specifico circRNA che direttamente o indirettamente esercita funzioni di soppressione del tumore (Figura 4b)



Lavoro di Li et al. (2015): espressione degli RNA circolari è alterata durante lo sviluppo del carcinoma esofageo a cellule squamose (ESCC).

3)SOVRAREGOLAZIONE DEI LIVELLI DI UN CIRCRNA PRO-PROLIFERAZIONE

Coinvolge la sovraespressione di un circRNA pro-tumorigenico (Fig. 5c). Sebbene meno intuitivo, questo tipo di meccanismo è stato proposto per un gruppo di circRNA e potrebbe essere analogo a quello per cui proteine oncogene con abbondanza molto bassa e / o emivite brevi contribuiscono al cancro.



Yang et al. (2017): circAmotl1 è altamente espresso in campioni cancerosi e linee cellulari e può promuovere la proliferazione cellulare.

CIRCRNA COME BIOMARCATORI NEL CANCRO

Le proprietà dei circRNA (stabilità, conservazione, universalità e specificità) indicano che potrebbero essere biomarcatori prognostici e diagnostici potenzialmente preziosi per il cancro. Molti studi hanno dimostrato che i circRNA possono essere espressi stabilmente e presenti in quantità relativamente elevate nei fluidi del corpo umano, come la saliva, il plasma, il siero e gli esosomi, il che li rende candidati ideali come biomarcatori non invasivi per il cancro. Memczak et al. hanno osservato un livello relativamente più alto di circRNA rispetto a quello dell'RNA lineare nel sangue: il circRNA può fornire informazioni rilevanti per la malattia che non possono essere rivelate dall'analisi canonica dell'RNA.

CONCLUSIONI

I CircRNA sono emersi come un nuovo tipo di molecola con funzioni molecolari intriganti e potenziale importanza come biomarcatori. In questo contesto, la sfida attuale per il campo è quella di scoprire i meccanismi con cui specifici circRNA possano agire come promotori del cancro o agenti soppressori. Pertanto, i progressi nel campo generale della ricerca sui circRNA saranno fondamentali per svelare la loro potenziale importanza nel cancro. Inoltre, l'uso dei circRNA come biomarcatori potrà presto essere sfruttato per lo screening precoce di alcuni tipi di cancro, che potrebbe aumentare notevolmente le possibilità di sopravvivenza.

RIASSUNTO

Gli RNA circolari (circRNA) sono una classe di molecole di RNA endogeni non codificanti con una struttura chiusa covalentemente[1]. I CircRNA possono essere generati da esoni; da introni; da esoni contenenti introni.[2] Sin dagli anni '70 è nota la loro esistenza in viroidi[3] ed eucarioti[4;5;6]: solo con lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento dell'RNA ad alto rendimento e della bioinformatica[7] è stata scoperta l'ampia espressione dei circRNA, in particolare nelle cellule dei mammiferi[8]; e il loro ruolo nel cancro e come biomarcatori.[9] **COME SI FORMANO**: La maggior parte dei circRNA sono generati da esoni completi di geni codificanti proteine e sono più abbondanti del prodotto lineare dal loro gene ospitante.[10] Sono generati da un processo denominato 'back-splicing'. Il loro meccanismo di formazione include principalmente tre modelli.[11-13] **RILEVAMENTO**: strategia di arricchimento chiamata "CircleSeq"[14]: l'RNA totale viene isolato da una linea cellulare, privato di RNA ribosomiale e quindi trattato con RNasi R, un'esonucleasi dell'RNA.[15] Dopo viene eseguito il sequenziamento ad alta velocità di tali campioni, le cui sequenze vengono allineate al genoma umano utilizzando un algoritmo di mappatura dello splicing *de novo.*[16;17] **PROPRIETA'**: Stabilità nelle cellule [5;18]; localizzazione citoplasmatica[1;5;8;14]; espressione tessuto-specifica[19;20]; conservazione evolutiva tra specie.[1;14;21] **FUNZIONI:** Regolazione espressione genica[12]; spugne e/o trasportatori di mi-RNA[1;22]; legame con fattori di trascrizione[23]; sviluppo muscolare[24] e trascrizione virale.[25;26] **CircRNA NEL CANCRO:** I circRNA sono generalmente meno abbondanti nelle cellule ad alta divisione, in particolare nel cancro [27]. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che il circRNA potrebbe avere ruoli in diversi tipi di cancro[23;28;29] : **1)GENERAZIONE DE NOVO DI UN circRNA CHE PROMUOVE IL CANCRO** Il primo è la generazione di un circRNA tossico come risultato di una traslocazione genomica. Ci riferiamo a questo nuovo tipo di circRNA come circRNA di fusione o f-circRNA.[28] In uno studio, condotto da Guarnero et al. (2016), viene descritto un circRNA, che coinvolge i geni PML e RARα, e come questo contribuisca alla trasformazione cellulare, promuova la vitalità cellulare e abbia proprietà di promozione del tumore in modelli *in vivo*. **2) DOWNREGULATION DI UN circRNA ANTI-PROLIFERATIVO** Prevede la downregulation di uno specifico circRNA che direttamente o indirettamente esercita funzioni di soppressione del tumore. Un lavoro di Li et al. (2015) ha verificato se l'espressione degli RNA circolari è alterata durante lo sviluppo del carcinoma esofageo a cellule squamose (ESCC).[29] **3) SOVRAREGOLAZIONE DEI LIVELLI DI UN circRNA PRO-PROLIFERAZIONE** Coinvolge la sovraespressione di un circRNA pro-tumorigenico. Yang et al. (2017) hanno dimostrato che circAmotl1 è altamente espresso in campioni cancerosi e linee cellulari e può promuovere la proliferazione cellulare.[23] **CircRNA COME BIOMARCATORI NEL CANCRO**: le proprietà dei circRNA indicano che potrebbero essere biomarcatori prognostici e diagnostici potenzialmente preziosi per il cancro. Recentemente, molti studi hanno dimostrato che i circRNA possono essere espressi stabilmente e presenti in quantità relativamente elevate nei fluidi del corpo umano, come la saliva, il plasma, il siero e gli esosomi, il che li rende candidati ideali come biomarcatori non invasivi per il cancro.[30-34] **CONCLUSIONI** La sfida attuale per il campo è quella di scoprire i meccanismi con cui specifici circRNA possano agire come promotori del cancro o agenti soppressori: i progressi nel campo generale della ricerca sui circRNA saranno fondamentali per svelare la loro importanza nel cancro e come biomarcatori per lo screening precoce di alcuni tipi di cancro.

- **BIBLIOGRAFIA**

1. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. Nature. 2013; 495:333-8.

2. Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. RNA. 2014; 20:1829–42

3. Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. Proc Natl Acad Sci USA 1976, 73:3852–3856

4. Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. Nature. 1979; 280:339–40.

5. Cocquerelle C, Mascrez B, Hétuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1993; 7:155–160.

6. Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. Nature. 1986; 323:558–560.

7. Szabo L, Salzman J. Detecting circular rnas: Bioinformatic and experimental challenges. Nature reviews Genetics. 2016; 17(11):679–692.

8. Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, et al. Circular rnas in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. Molecular cell. 2015; 58(5):870–885.

9. Duc-Hiep Bach, Sang Kook Lee, Anil K. Sood. Circular RNAs in Cancer. Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Jun 7; 16: 118–129.

10. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. PLoS One. 2012; 7(2): e30733.

11. Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. Cell reports. 2015; 10(2):170–177.

12. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. Circrna biogenesis competes with pre-mrna splicing. Molecular cell. 2014; 56(1):55–66

13. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The rna binding protein quaking regulates formation of circrnas. Cell. 2015; 160(6):1125–1134.

14. Jeck et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. RNA. 2013 Feb; 19(2): 141–157.

15. Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. Nucleic Acids Res. 2006 May 8; 34(8): e63.

16. Wang K, Singh D, Zeng Z, Coleman SJ, Huang Y, Savich GL, He X, Mieczkowski P, Grimm SA, Perou CM, MacLeod JN, Chiang DY, Prins JF, Liu J. MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. Nucleic Acids Res. 2010 Oct; 38(18): e178.

17. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular rnas. Nature biotechnology. 2014; 32(5):453–461.

18. Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs. Int J Mol Sci. 2014; 15:9331–42.

19. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. PLoS Genet. 2013;9: e1003777

20. Gruner H, Cortes-Lopez M, Cooper DA, Bauer M, Miura P. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. Sci Rep. 2016; 6:38907.

21. Wang PL, Bao Y, Yee MC, Barrett SP, Hogan GJ, Olsen MN, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. PLoS ONE. 2014;9: e90859.

22. Piwecka M, Glazar P, Hernandez-Miranda LR, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchyk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, et al. Loss of a mammalian circular rna locus causes mirna deregulation and affects brain function. Science. 2017; 357(6357).

23. Yang Q, Du WW, Wu N, Yang W, Awan FM, Fang L, Ma J, Li X, Zeng Y, Yang Z, Dong J, et al. A circular rna promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. Cell Death Differ. 2017; 24(9):1609–1620.

24. Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, et al. Circ-znf609 is a circular rna that can be translated and functions in myogenesis. Molecular cell. 2017; 66(1):22–37. e29.

25. Li X, Liu CX, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin QF, Wei J, Yao RW, Yang L, Chen LL. Coordinated circrna biogenesis and function with nf90/nf110 in viral infection. Molecular cell. 2017; 67(2): 214–227. e217.

26. Chen YG, Kim MV, Chen X, Batista PJ, Aoyama S, Wilusz JE, Iwasaki A, Chang HY. Sensing self and foreign circular rnas by intron identity. Molecular cell. 2017; 67(2):228–238. e225.

27. Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, Mesteri I, Grunt TW, Zeillinger R, Pils D. Correlation of circular rna abundance with proliferation-- exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues.

28. Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM, Lo-Coco F, Tay Y, Beck AH, Pandolfi PP. Oncogenic role of fusion-circrnas derived from cancer-associated chromosomal translocations. Cell. 2016; 165(2):289–302.

29. Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, Lu J, Zhou Y. Circular rna itch has inhibitory effect on escc by suppressing the wnt/beta-catenin pathway. Oncotarget. 2015; 6(8):6001–6013.

30. Cui X, Wang J, Guo Z, Li M, Li M, Liu S, Liu H, Li W, Yin X, Tao J, Xu W. Review: Emerging function and potential diagnostic value of circular RNAs in cancer. Mol Cancer. 2018 Aug 15; 17(1):123.

31. Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, Rajewsky N. Identification and Characterization of Circular RNAs As a New Class of Putative Biomarkers in Human Blood. PLoS One. 2015; 10(10): e0141214.

32. Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, Chen D, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. Cell Res. 2015 Aug; 25(8):981-4.

33. Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, Xiao B, Guo J. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. Clin Chim Acta. 2015 Apr 15; 444():132-6.

34. Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, Yang J, Fan J, Liu L, Qin W. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. Cancer Biomark. 2016; 16(1):161-9.