UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche
A.A. 2018/2019
Sessione di laurea straordinaria Febbraio 2020

RNA associati alla cromatina come regolatori del genoma funzionale

Chromatin-associated RNAs as regulators of functional genome

Tesi di Laurea di:
Lucia Giandomenico

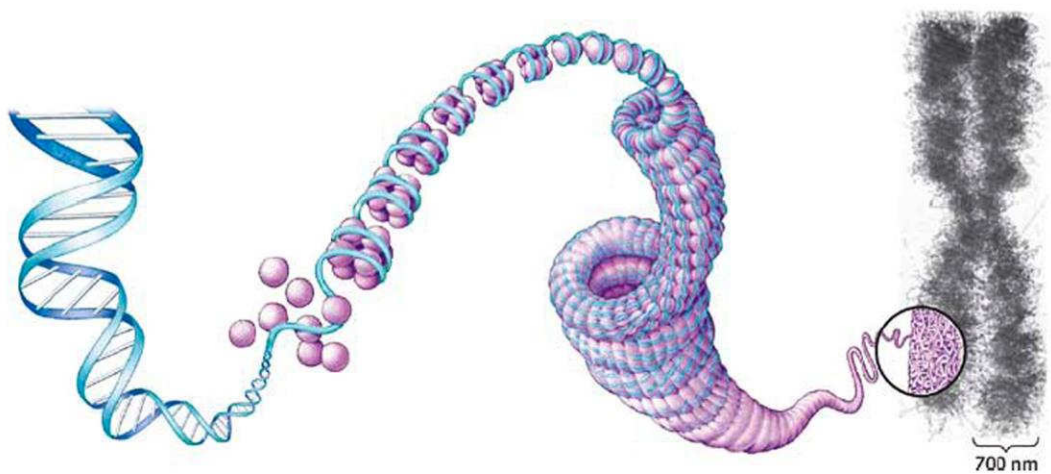
Relatore:
Anna La Teana

INTRODUZIONE

CROMATINA

- *Struttura*
  - Associazione di DNA con proteine istoniche e non istoniche
  - Nucleosomi

- *Funzione*
  - Compattazione del DNA
  - Compattazione e decompattazione della cromatina regolano silenziamento e attivazione dei geni

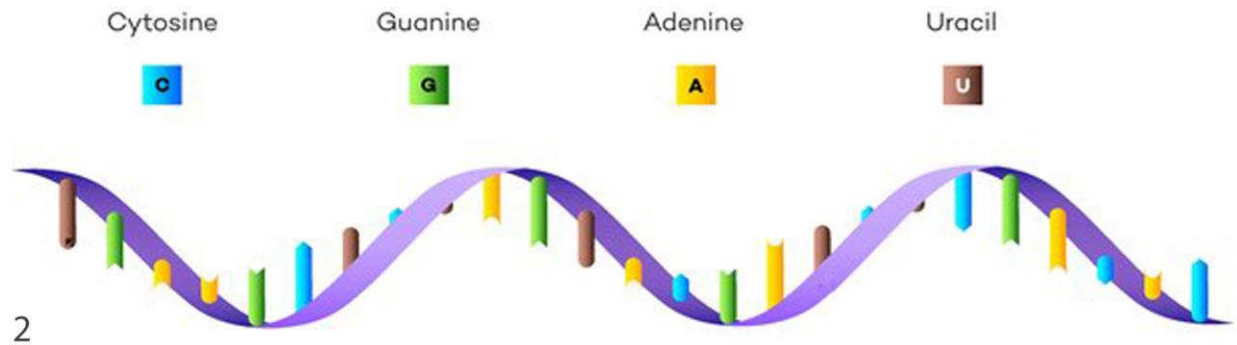


1

RNA

- *Struttura*
  - Ribosio
  - Uracile
  - Prevalentemente a singolo filamento

- *Funzione*
  - mRNA: trasferimento dell'informazione dall'acido nucleico alle proteine
  - ncRNA: regolazione strutturale e funzionale della cromatina (snRNA, snoRNA, lncRNA, RNA derivati da ripetizioni)

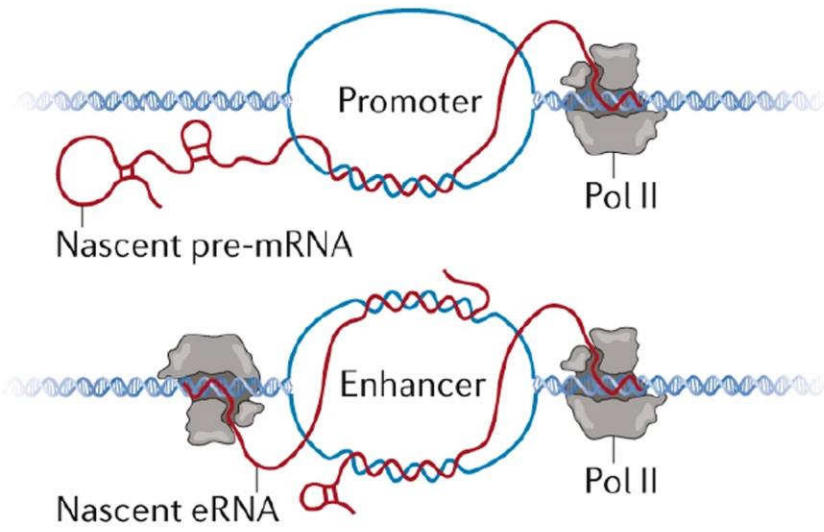


2

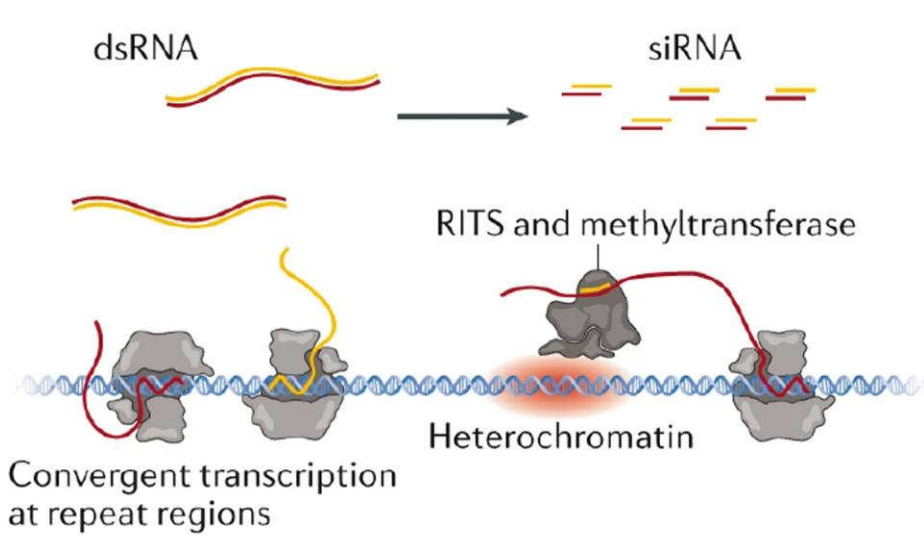
MECCANISMI CHE PERMETTONO IL LEGAME DI RNA ALLA CROMATINA

RNA che agiscono in cis

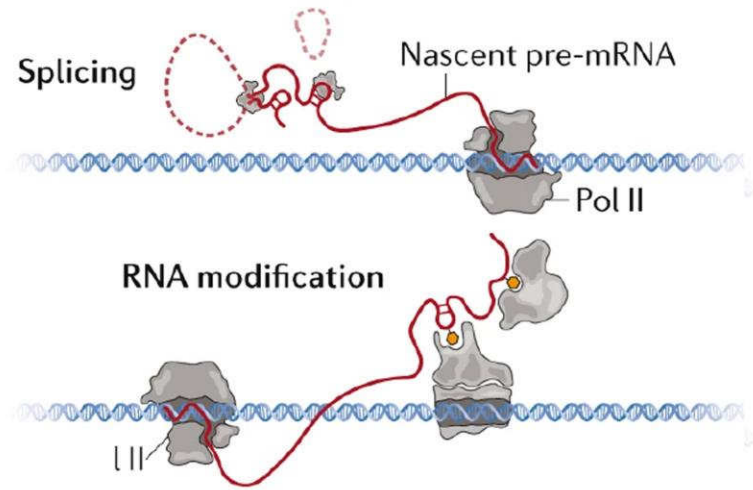
a R-loop



b Small RNAs targeting nascent RNA



c Co-transcriptional processing



- Formazione di R-loop a livello dell'RNA con conseguente annealling dell'RNA nascente al DNA modello, formando un filamento ibrido RNA:DNA;
- Prevalentemente a livello di promotori e enhancer;
- Cotrascrizionale

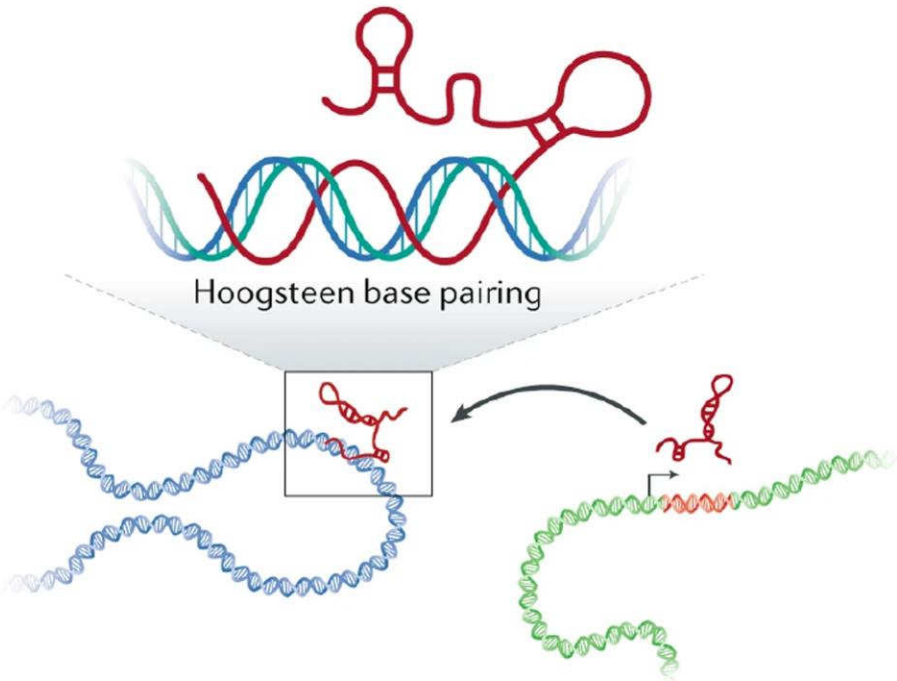
- L'RNA nascente viene legato, nel suo sito di trascrizione, da piccoli RNA amplificati;
- Meccanismo utilizzato per la formazione di regioni eterocromatiniche telomeriche e pericentromeriche;
- Cotrascrizionale

- L'RNA nascente è trattenuto sulla cromatina attraverso l'associazione con l'RNA polimerasi;
- Le modifiche costrascrizionali sono coinvolte nel controllo a feedback della trascrizione;
- Cotrascrizionale

MECCANISMI CHE PERMETTONO IL LEGAME DI RNA ALLA CROMATINA

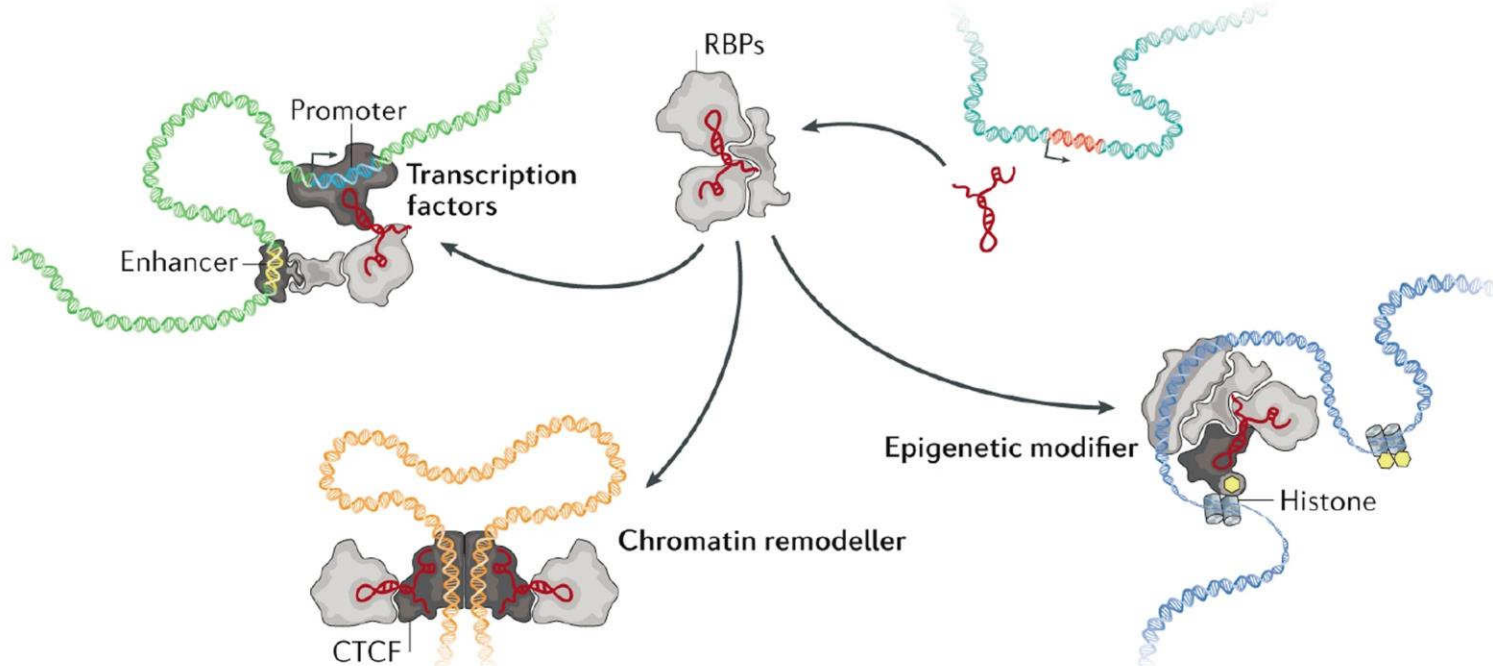
RNA che agiscono in trans

d RNA:DNA triplex



- Formazione di un acido nucleico triplex RNA:DNA;
- Appaiamenti di Hoogsteen

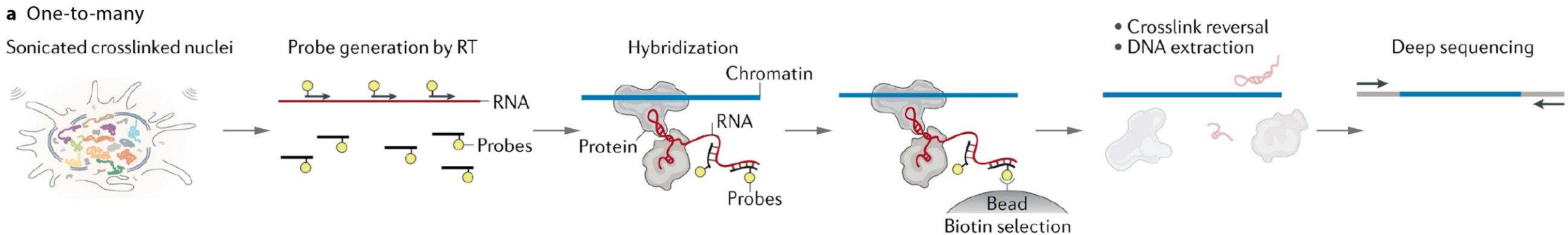
e Scaffold for RBPs



- Interazione dell'RNA con la cromatina mediata da proteine RBP;
- Le proteine RBP presentano una componente a diretto contatto con un fattore legato al DNA

STRATEGIE PER RILEVARE RNA SULLA CROMATINA

Strategie one-to-many



- ChIRP
- CHART
- RAP

Tutti e tre i metodi utilizzano una sonda marcata con biotina per ibridare un RNA specifico e catturare così la regione di cromatina associata all'RNA.

VANTAGGI

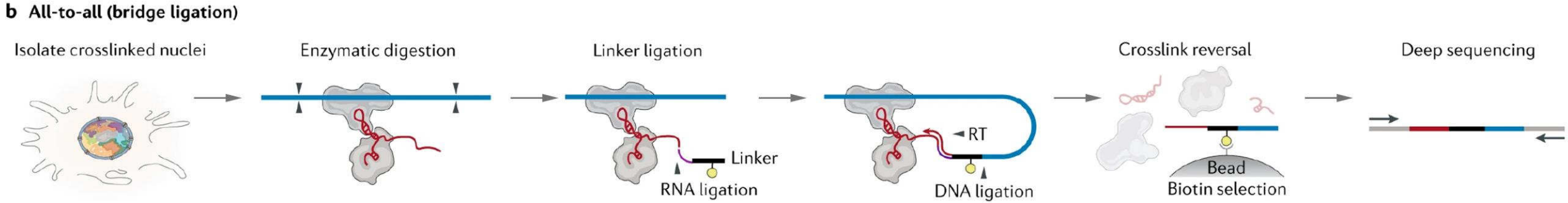
Possibilità di studiare uno specifico RNA associato alla cromatina indipendentemente dalla sua abbondanza nella cellula.

SVANTAGGI

Alcuni RNA o particelle contenti RNA possono aderire alle sonde in modo non specifico;
Le procedure possono studiare un solo RNA specifico alla volta.

STRATEGIE PER RILEVARE RNA SULLA CROMATINA

Strategie all-to-all



- MARGI
- GRID-seq
- ChAR-seq

Metodi basati sull'uso di un linker bivalente in grado di legare ad un'estremità RNA e all'altra DNA digerito a livello dei siti di restrizione.

SVANTAGGI

- Tutte queste strategie sono basate sulla vicinanza dell'RNA al DNA → non catturano solo interazioni dirette tra RNA e cromatina

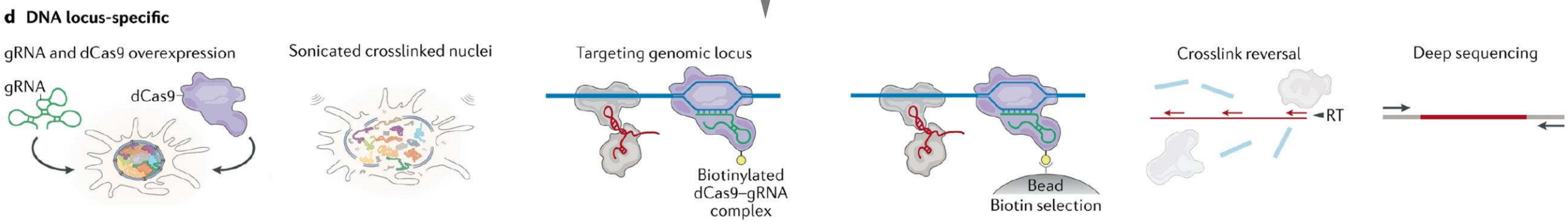
- Modesta sensibilità dei metodi → difficile rilevamento di RNA associati alla cromatina a bassa abbondanza

STRATEGIE PER RILEVARE RNA SULLA CROMATINA

Strategie all-to-all

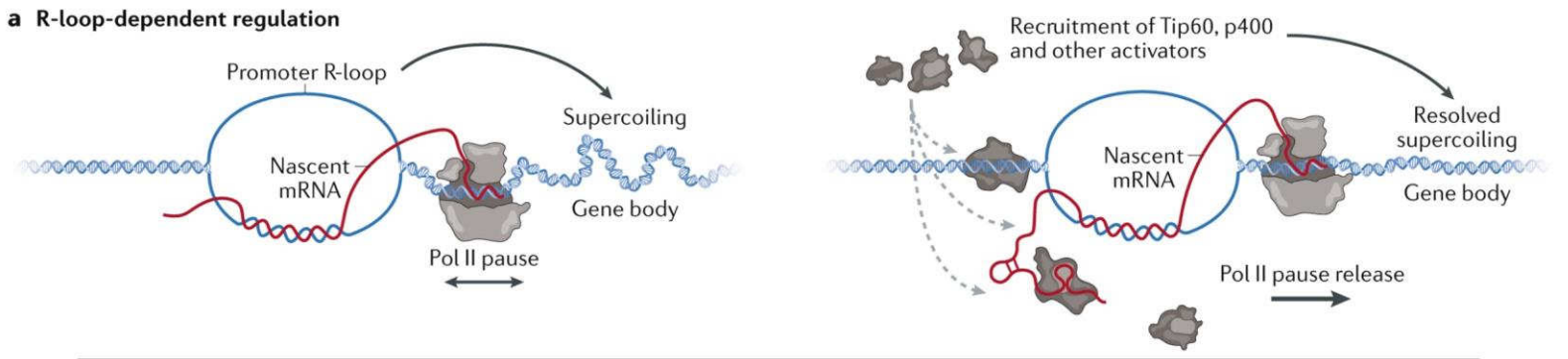
Per superare questi limiti si possono utilizzare metodi mirati al locus genomico per analizzare specificatamente le interazioni RNA-proteina, DNA-proteina e RNA-DNA del locus:

- FISH
- Utilizzo di RNA guida accoppiati con la nucleasi Cas9 inattivata

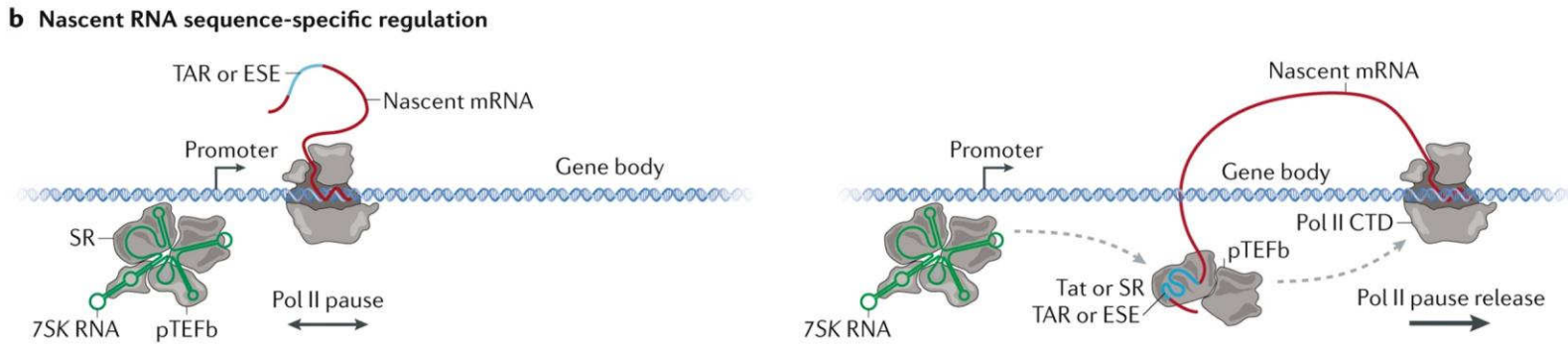


RNA COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

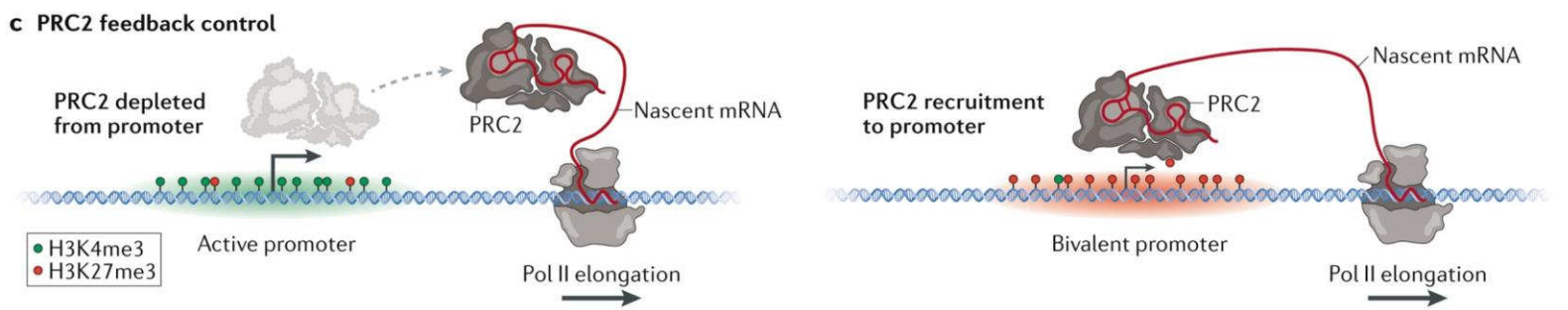
RNA nascenti nella regolazione genica



Formazione di R-loop che favorisce il reclutamento di attivatori trascrizionali che facilitano la riattivazione della trascrizione.



Le estremità 5' di alcuni pre-mRNA presentano sequenze (TAR, ESE) che possono legare fattori di rilascio della pausa trascrizionale.

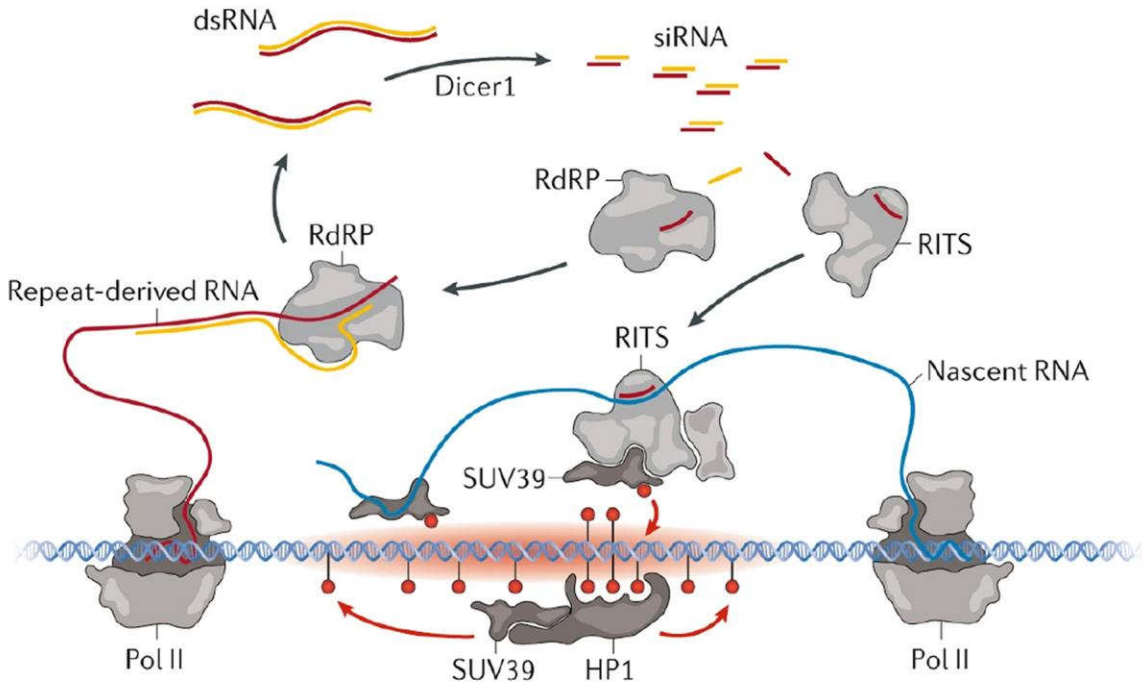


Regolazione genica in cui è coinvolto il fattore PRC2 che viene reclutato dall'mRNA nascente. Per questo processo sono previsti due modelli.

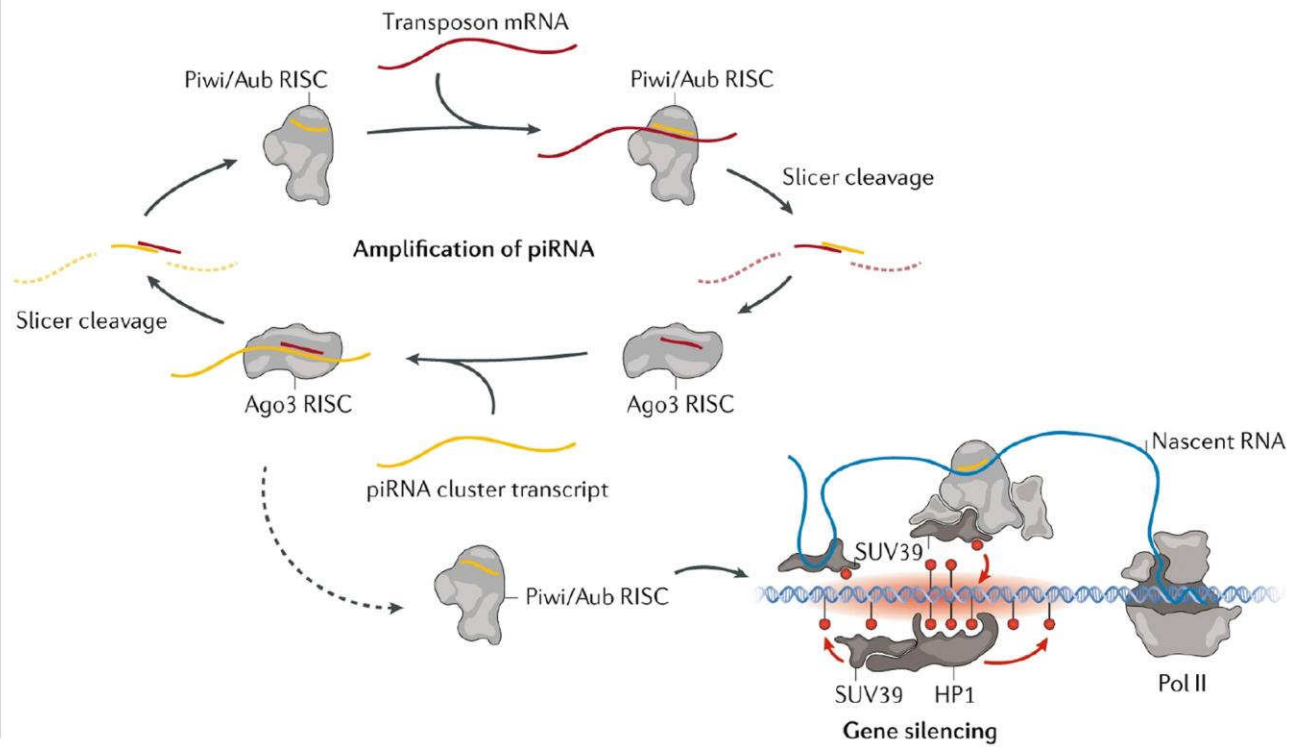
RNA COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

RNA derivati da ripetizioni per il silenziamento genico

a Esempio di silenziamento genico nel lievito di fissione



b Esempio di silenziamento genico in *D.melanogaster*



1) I trascritti derivati da sequenze ripetute vengono amplificati da RdRP;
2) RNAds vengono elaborati da Dicer per produrre siRNA;
3) Caricamento di siRNA su Ago e appaiamento con l'RNA nascente ⟶ formazione di RITS;
4) Reclutamento da parte di RITS di metiltrasferasi di H3K9;
5) Deposizione di metilazioni iniziali;
6) Diffusione delle metilazioni (processo indipendente dall'RNA).

- Meccanismo simile all'esempio precedente per il silenziamento dei geni che codificano per retrotrasposoni in *D.melanogaster*;
- Il processo avviene principalmente nelle cellule della via germinale;
- Variazione nel meccanismo di amplificazione degli RNA a causa della mancanza di RdRP.

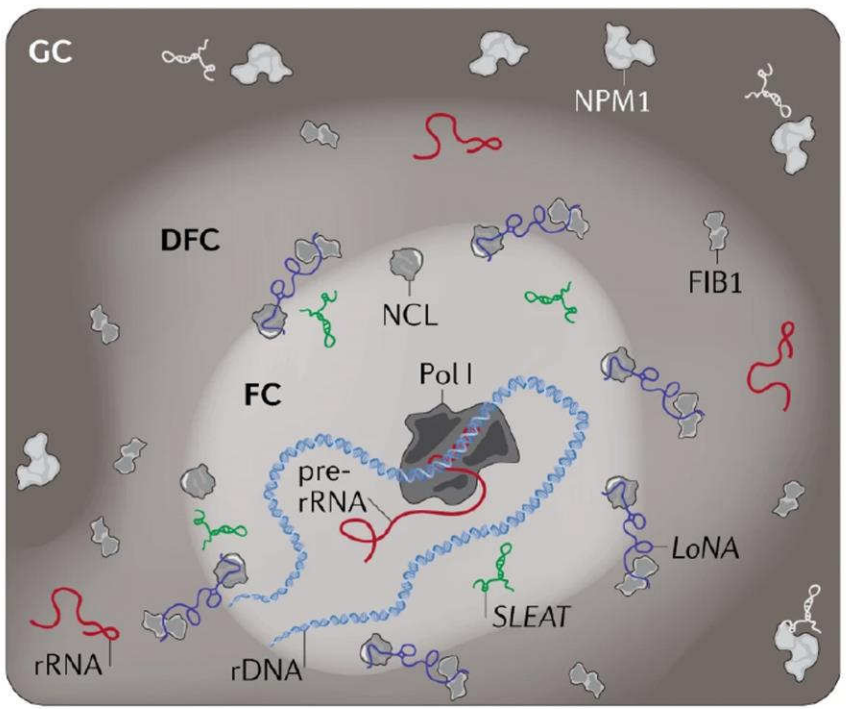
RNA COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

RNA nella formazione dei corpi nucleari

Alcuni RNA associati con proteine caratterizzate dalla presenza di LCD (domini bassa complessità) sembrano coinvolti nell'organizzazione di:

- corpi di Cajal;
- speckle nucleari e paraspeckle.
- distinti siti del nucleolo per la formazione dei ribosomi;

a Nucleolo



All'interno del nucleolo la formazione dei ribosomi avviene in tre fasi che si svolgono in tre zone citologicamente distinte:

- FC → trascrizione di rRNA;
- DFC → elaborazione rRNA;
- GC → modifica di rRNA e assemblaggio dei ribosomi.

Questi tre compartimenti si comportano come regioni isolate in quanto rimangono collegati senza fondersi, pur non essendo delimitati da membrane.
Sulla base di recenti scoperte è ipotizzabile che set distinti di RNP con LCD giocano un ruolo centrale nel facilitare la separazione di fase lquido-liquido per coordinare la biogenesi del ribosoma nel nucleolo.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

La ricerca futura sarà dedicata all'approfondimento delle potenziali funzioni degli RNA associati alla cromatina, inclusi pre-mRNA nascenti e diverse classi di ncRNA, in particolare sarà dedicata a comprendere il ruolo di questi RNA nella regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento, ma soprattutto di quelli coinvolti nei processi che portano all'insorgenza della malattia.

Finora la maggior parte degli studi è stata indirizzata verso RNA codificati da regioni genomiche ben conosciute, mentre ancora molto resta da scoprire circa gli RNA derivati da ripetizioni.

RIASSUNTO

I genomi dei mammiferi sono ampiamente trascritti, il che produce un gran numero di trascrizioni sia codificanti che non codificanti.
Vari RNA sono associati fisicamente con la cromatina, in particolare questi possono essere trattenuti in *cis* nel loro sito di trascrizione o essere reclutati in *trans* in altre regioni genomiche.
Le recenti innovazioni tecnologiche (tecniche one-to-many, all-to-all), volte a rilevare gli RNA associati alla cromatina, hanno permesso di individuare diversi ruoli per questi RNA;
questi sembrano essere coinvolti sia come organizzatori di specifici centri di trascrizione, regolando l'attivazione o la repressione genica, sia come mediatori per processi di separazione di fase che avvengono nel nucleo.

BIBLIOGRAFIA

- Xiao Li, Xiang-Dong Fu, *Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions*, in "*Nature*", Volume 20, Settembre 2019;

- Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R., Watson J.D., *Biologia molecolare del gene*, Capitoli 5, 8, 20, Bologna, Zanichelli, 2015;

- Beltran M., Yates C.M., Senner R.G. et al., *The interaction of PRC2 with RNA or chromatin is mutually antagonistic*, in "*Genome Research*", Luglio 2016;

- Meister G., Höck J., *The Argonaute protein family*, in "*Genome Biology*", Febbraio 2008;

- Immagine 1 tratta da *https://www.slideshare.net*;

- Immagine 2 tratta da *https://www.dreamstime.com*.