



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Scienze
Corso di Laurea in Scienze Biologiche
Tesi di Laurea Triennale

REGOLAZIONE GENICA POST TRASCRIZIONALE DA MODIFICHE DEL mRNA
POST-TRANSCRIPTIONAL GENE REGULATION BY mRNA MODIFICATIONS

Relatore: Chiar.ma

Prof.ssa Tiziana CACCIAMANI

Tesi di Laurea di:

Sara PASKU

A.A. 2020/2021

Sessione Autunnale

ABSTRACT

Le modificazioni dell'RNA sono emerse di recente come regolatori post-trascrizionali critici dei programmi di espressione genica. Influenzano diversi processi biologici eucariotici e la corretta deposizione di molte di queste modificazioni è necessaria per il normale sviluppo.

Tali modificazioni influenzano inoltre la regolazione genica, che permette a una cellula di esprimere o silenziare dei geni sulla base del contesto, sia fisiologico che patologico.

Abbiamo preso in considerazione diversi lavori, ed abbiamo fatto un quadro per quanto riguarda la correlazione tra le modifiche del mRNA e la regolazione genica post-trascrizionale.

I risultati emersi ci hanno permesso di descrivere in modo adeguato il modo in cui le modificazioni del mRNA riescono ad influire sulla regolazione genica.

INTRODUZIONE

- La regolazione genica permette a una cellula di esprimere in un contesto fisiologico o patologico un determinato gruppo di geni e di silenziarne altri.
- Le interazioni tra i siti di legame degli acidi nucleici (DNA ed RNA) e le proteine regolatorie loro affini sono fondamentali per la regolazione dell'espressione genica.
- Le modifiche nella regolazione dell'espressione genica possono essere di due tipi. Le modifiche adattive sono quelle che guidano il cambiamento evolutivo. Sono modifiche che vengono selezionate nel tempo per il semplice motivo, che sono vantaggiose in termini di successo evolutivo sia attraverso l'espressione che attraverso il silenziamento dei geni. Dall'altra parte esistono delle mutazioni che attraverso diversi meccanismi come delezione, inserzione, transizione ecc, sono alla fine responsabili a generare patologie. Un esempio di tali mutazioni si può evidenziare nel caso della trasformazione maligna delle cellule benigne in un carcinoma.

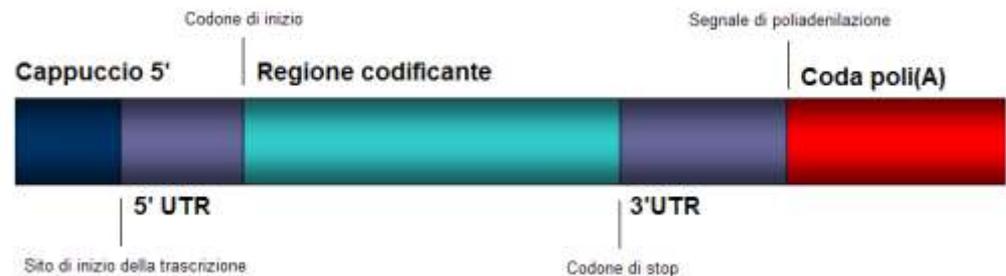
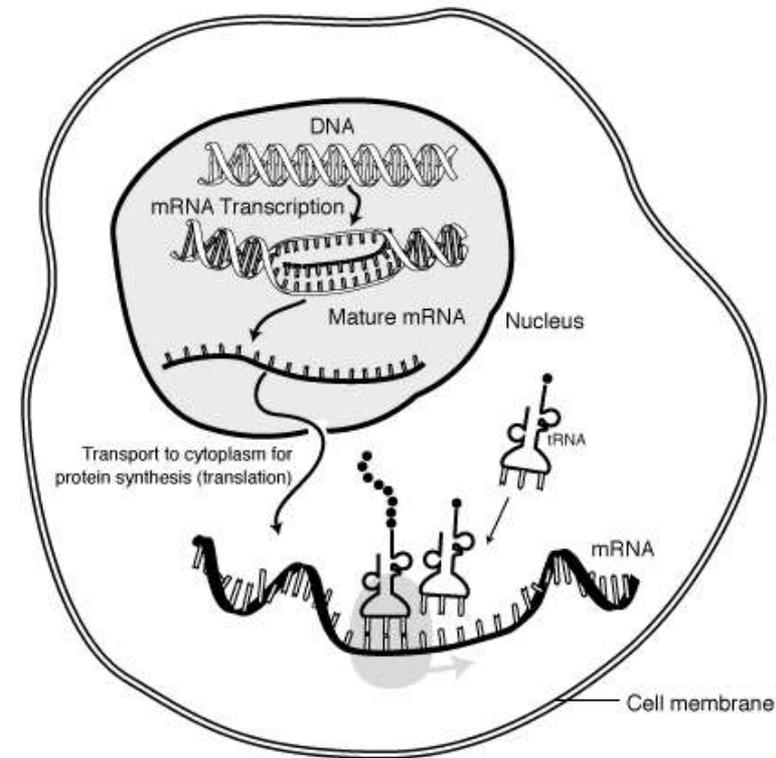


REGOLAZIONE GENICA

DNA

Fattori trascrizionali proteine che legano i promotori (DNA) e attivano la trascrizione (soggetti a modificazioni post-traduzionali reversibili come ad es : fosforilazione/defosforilazione)

Epigenetica che prevede modificazioni del DNA (metilazione) e degli istoni (es: metilazione e acetilazione)



mRNA

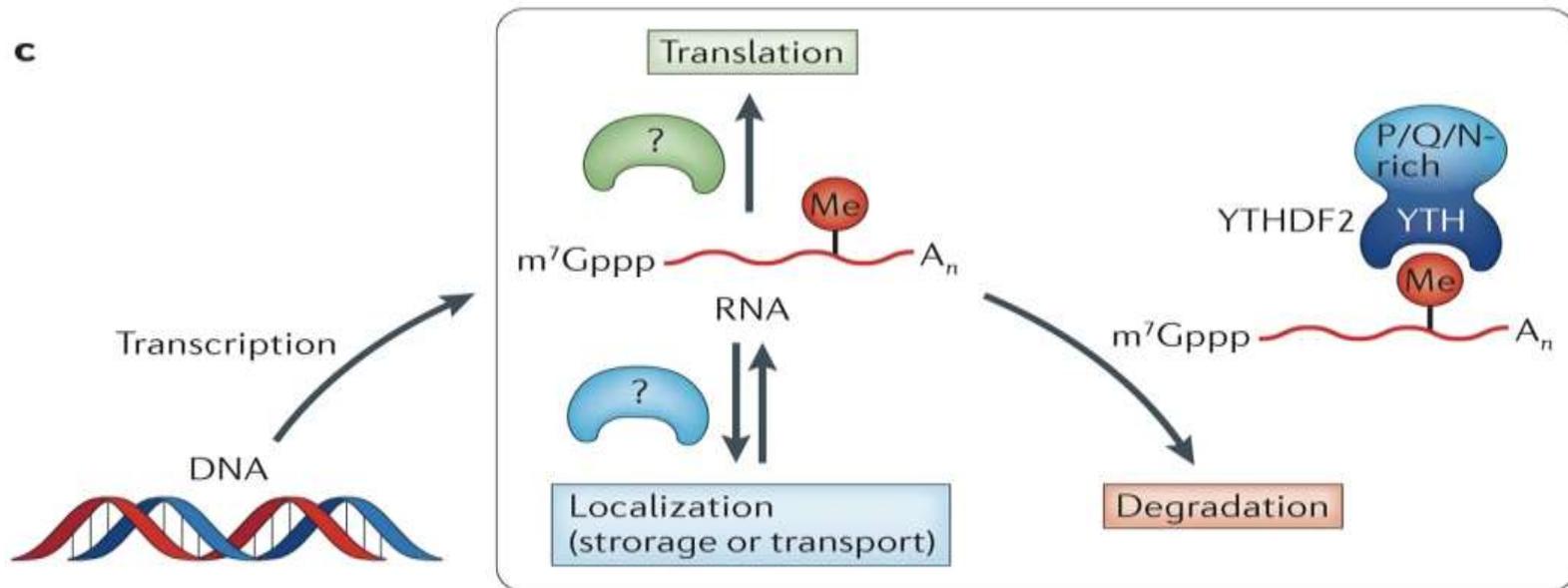
Cap-5'UTR-CDS-3'UTR-polyA

I messaggeri convenzionali presentano delle sequenze come il 5'UTR e il 3' UTR che svolgono delle funzioni regolative così come la poliadenilazione ed il capping al 5'

SCOPO

Il lavoro di tesi proposto prende in considerazione alcune recenti scoperte legate alla regolazione post-trascrizionale reversibile dell'mRNA in grado di modificare l'espressione genica.

La regolazione post-trascrizionale dell'mRNA è quella attuata da proteine specifiche che si legano ad esso, regolandone maturazione, trasporto, traduzione e degradazione.

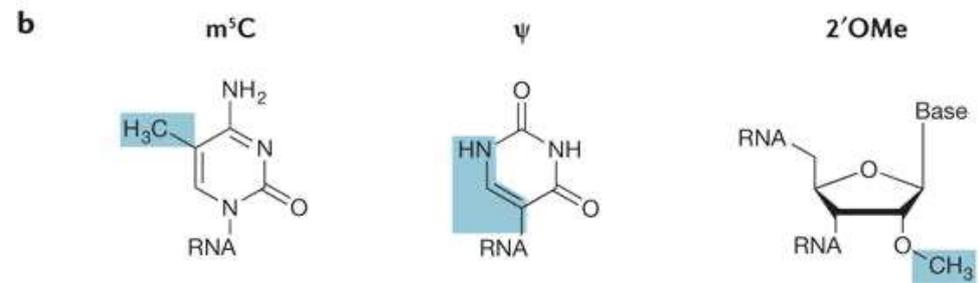
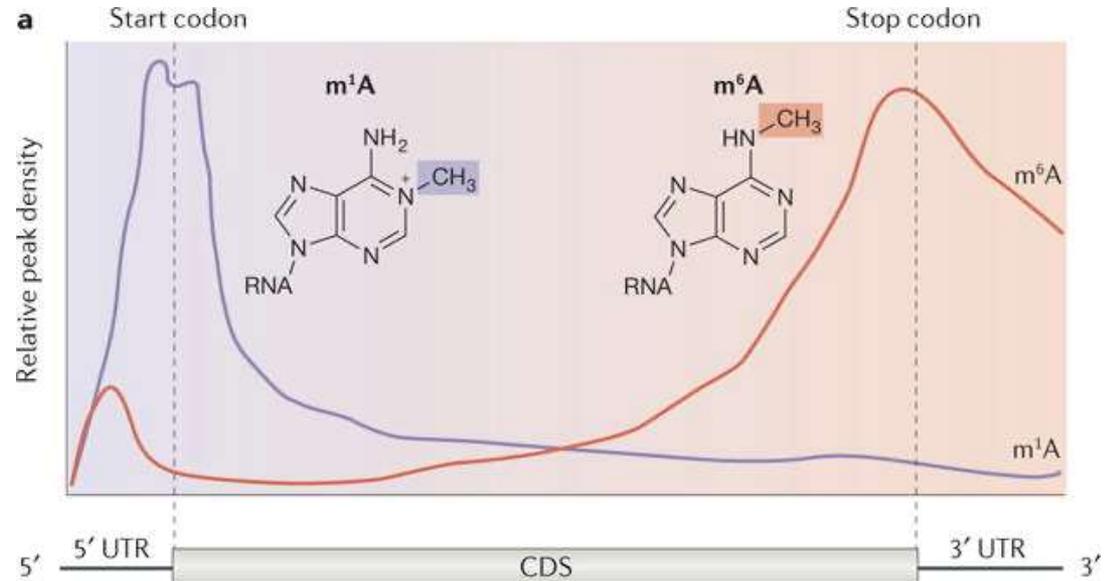


MODIFICHE DEL mRNA

L'mRNA potrebbe subire alcune modificazioni post-trascrizionali, tra cui:

- **N6-metiladenosina (m6A).**
- N1-metiladenosina.
- 5-metilcitosina
- Pseudouridina
- 2'-O-metilnucleosidi

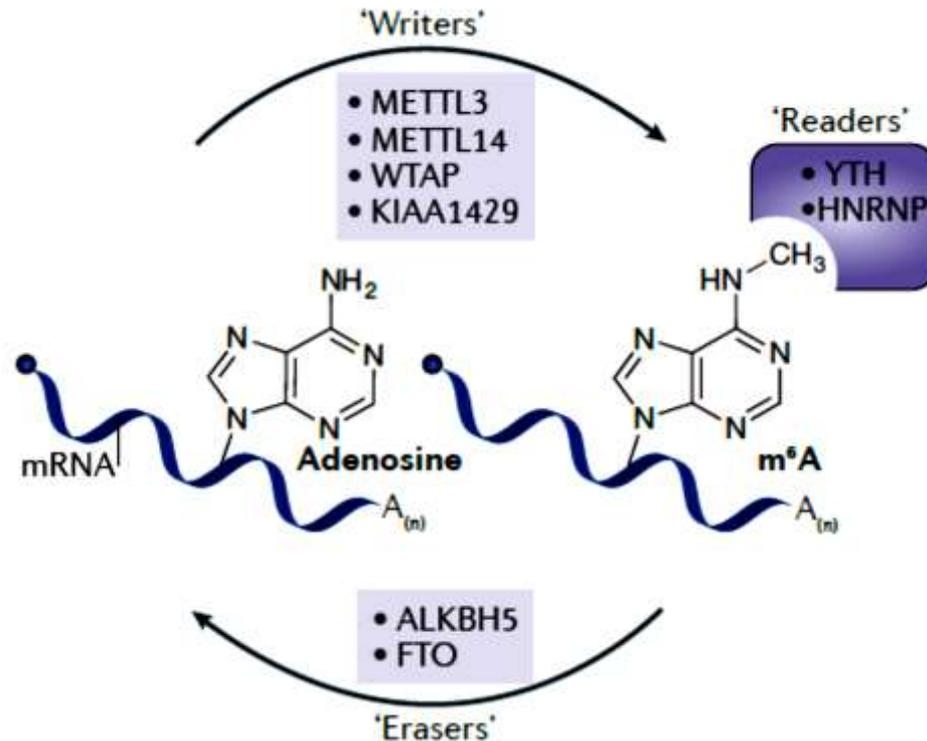
La più importante è quella identificata nell'mRNA eucariotico ovvero la **N6-metiladenosina (m6A)**.



La modifica della N6-metiladenosina (m6A)

Scrittori e cancellatori determinano la prevalenza e la distribuzione di m6A.

i lettori mediano le funzioni dipendenti da m6A e sono presenti nel nucleo o nel citoplasma



In genere m6A regola la degradazione dell'RNA dipendente dalla metilazione, utilizzando *lettori* specifici.

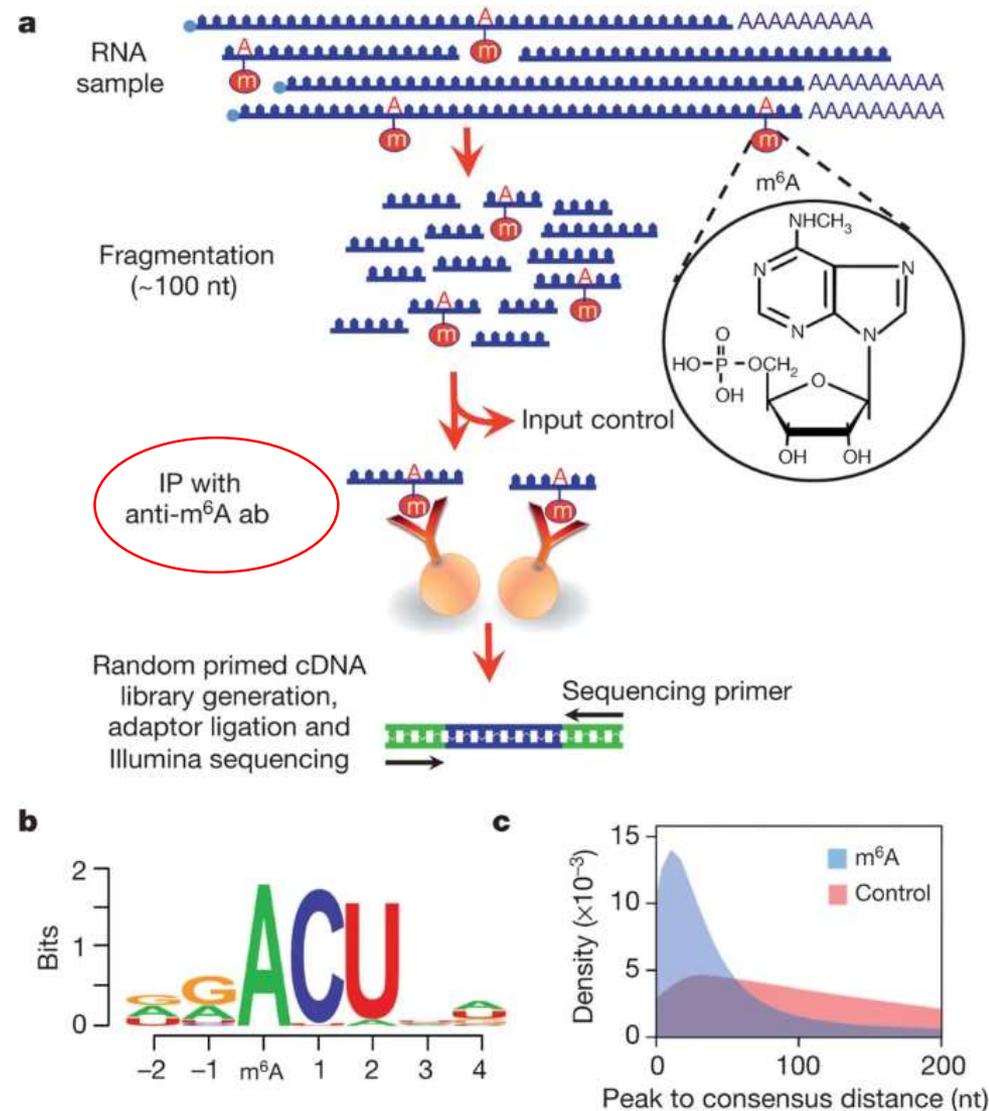
Possono esistere altre proteine di lettura che influenzano lo splicing, la conservazione, il traffico e la traduzione dell'RNA, oltre al processamento di pri-miRNA.

Il meccanismo di modifica della m6A è conservato dal lievito ai mammiferi.

Per studiare questa modifica si utilizza il seguente protocollo.

Il campione di RNA frammentato viene immunoprecipitato con l'anticorpo in grado di riconoscere la m6A.

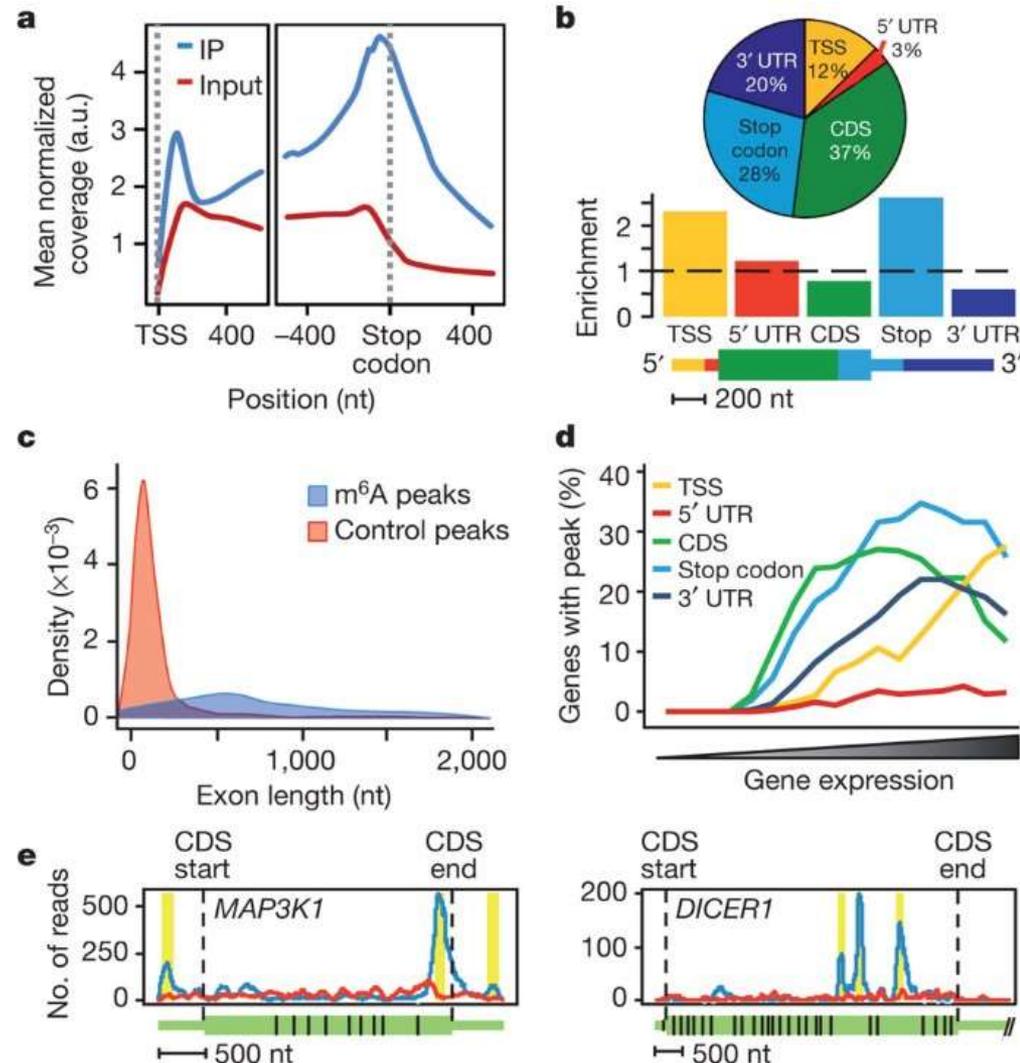
Il materiale immunoprecipitato viene usato per creare una genoteca di frammenti che contengono gli adattatori necessari per il sequenziamento con il metodo Illumina.



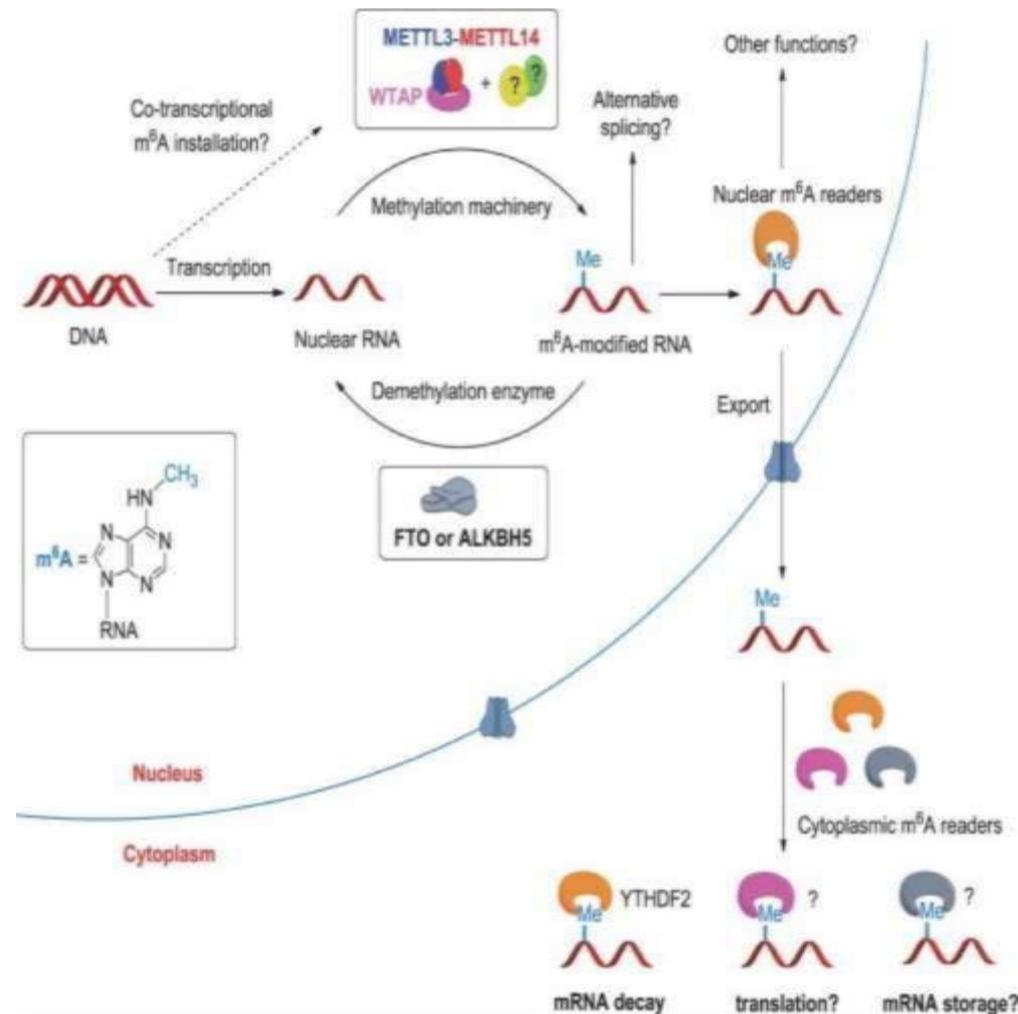
sequenza consenso
riconosciuta per la
modifica m⁶A (RRACU)

Distribuzione della m⁶A nel trascrittoma

Abbiamo notato che I picchi di m⁶A sono significativamente correlate a due coordinate diverse: subito dopo la il sito d'inizio di trascrizione (TSS) ed in vicinanza del codone stop. Si è rappresentato la frazione dei picchi di m⁶A in ciascuno dei cinque segmenti di trascrizione non sovrapposti.



Funzioni della N6-metiladenosina (m6A)

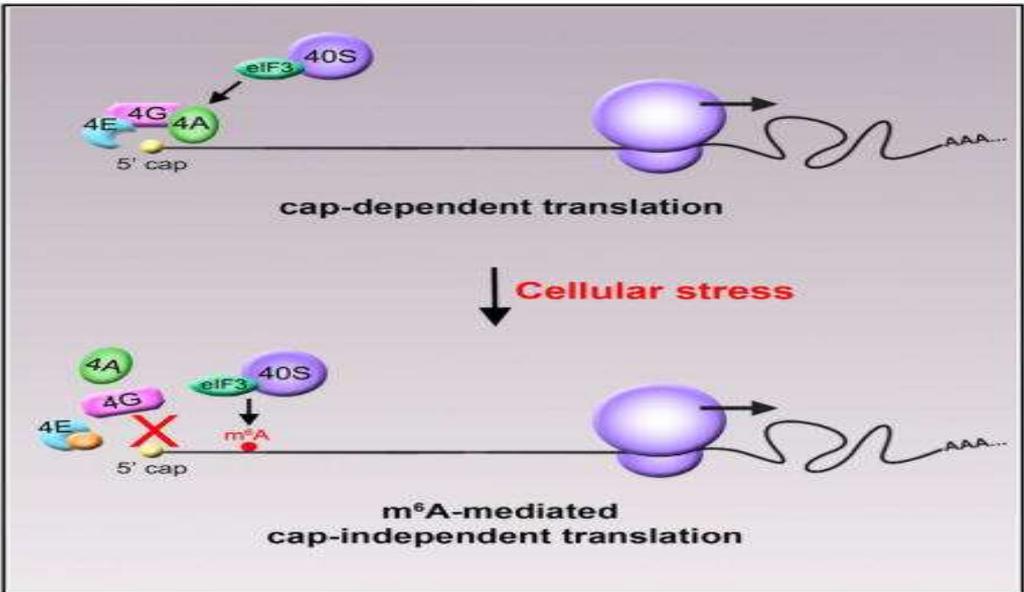


- m6A altera il ripiegamento e la struttura dell'RNA
- m6A influenza la maturazione dell'mRNA
- m6A migliora l'elaborazione nucleare e l'esportazione di mRNA.
- m6A promuove la traduzione dell'mRNA.
- m6A segna l'mRNA per il decadimento
- m6A regola il metabolismo dell'mRNA utilizzando diversi readers presenti nel nucleo e nel citoplasma

Illustrazione delle vie cellulari di m6A
Genes Dev. 2015 Jul 1; 29(13): 1343-1355.
doi: [10.1101/gad.262766.115](https://doi.org/10.1101/gad.262766.115)

- ***m⁶A promuove in condizioni di stress la traduzione di mRNA indipendente dal cap.***

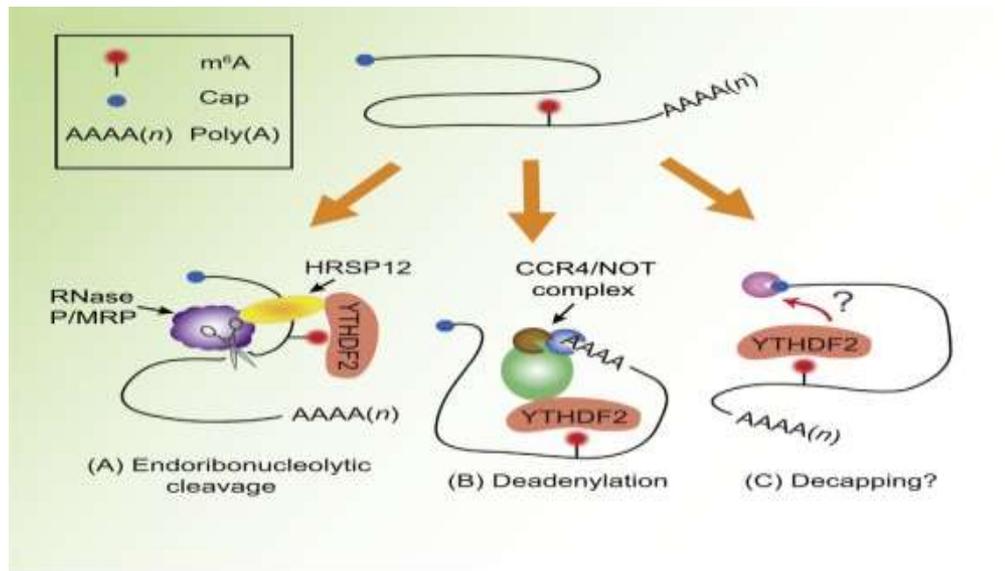
- Un singolo 5' UTR m⁶A si lega direttamente al fattore di inizio eucariotico 3 (eIF3), che è sufficiente per reclutare il complesso 43S per iniziare la traduzione in assenza del fattore di legame cap eIF4E.



Meyer KD, Patil DP, Zhou J, et al. 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*. 2015;163(4):999-1010. doi:10.1016/j.cell.2015.10.012

- ***m⁶A promuove la degradazione di alcuni mRNA utilizzando diversi meccanismi***

- M⁶A regola la degradazione dell'RNA dipendente dalla metilazione (me)



CENNI SULLE ALTRE MODIFICHE DEL mRNA

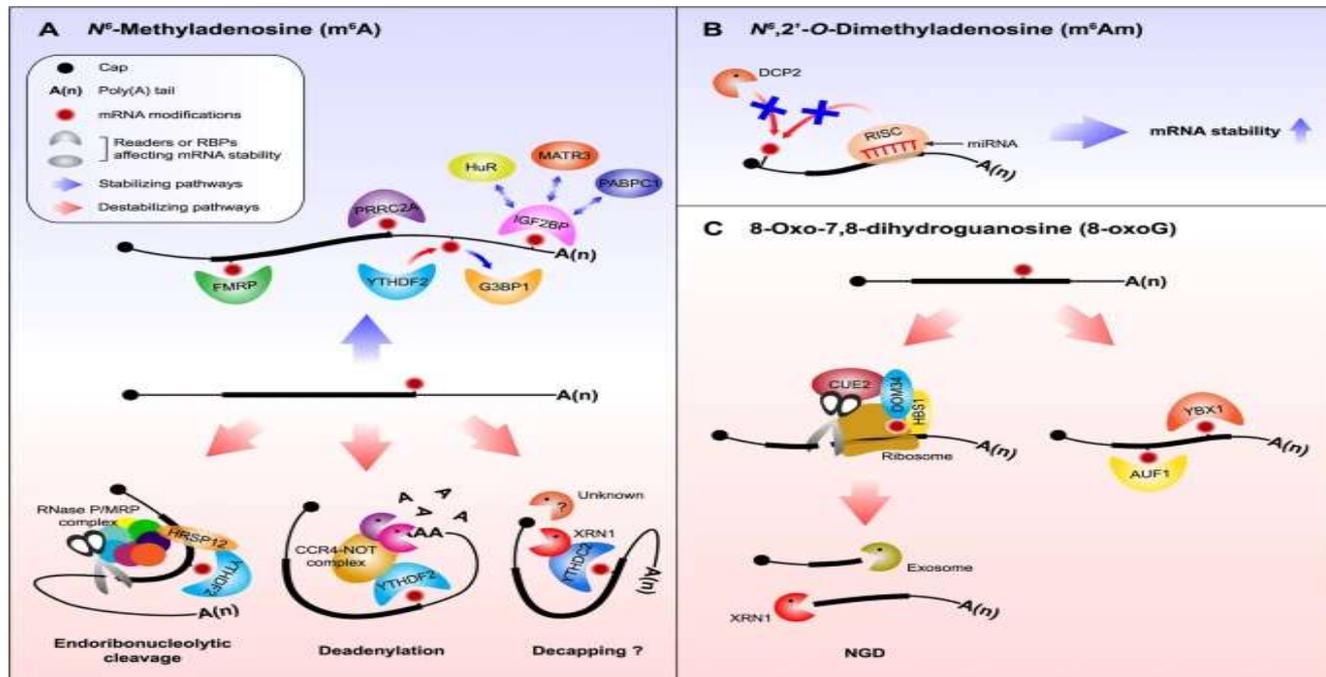
La N1-metiladenosina

La m1A ha una carica positiva grazie a cui potrebbe potenzialmente aumentare il suo impatto biologico rafforzando le interazioni RNA-proteina o alterando le strutture secondarie dell'RNA.

La carica positiva associata a questa modifica potrebbe potenzialmente aumentare il suo impatto biologico rafforzando le interazioni RNA-proteina o alterando le strutture secondarie dell'RNA. Si è dimostrato che m1A interrompe l'accoppiamento delle basi dell'RNA e induce la fusione locale del duplex dell'RNA.

La 2'-O-metilnucleosidi

La 2'-O-metilazione (2'OMe) è una modificazione dell'RNA che risiede sulla porzione 2' idrossile ribosio di tutti e quattro i ribonucleosidi, e può inibire l'editing dell'RNA.

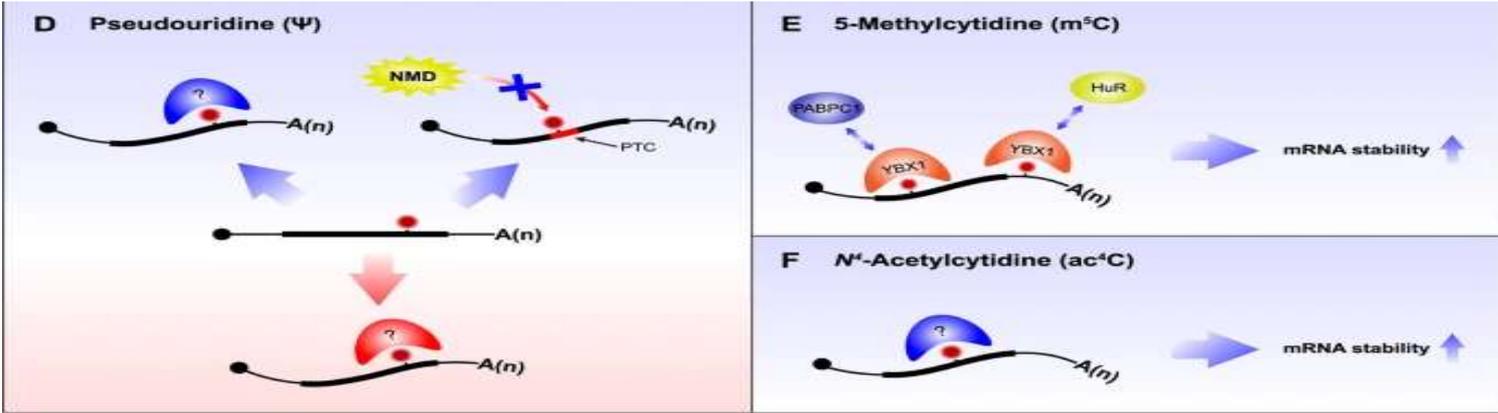


La 5-metilcitosina

La m5C è stato a lungo studiato come una modificazione epigenetica nel DNA. Le funzioni biologiche di m5C negli mRNA eucariotici rimangono in gran parte elusive, sebbene i derivati ossidativi di m5C, 5-idrossimetilcitosina e 5-formilcitosina siano stati rilevati nell'RNA di *Drosophila* spp. alle cellule di mammifero e ai tessuti cerebrali suggerendo che si tratta di una modifica dinamica con potenziali ruoli regolatori.

Pseudouridina

È un composto generato dall'isomerizzazione dell'uridina. Ha la capacità di alterare le interazioni di accoppiamento delle basi che le consente di influenzare non solo le strutture dell'RNA ma anche la codifica dell'mRNA, grazie al suo potenziale come elemento regolatorio.



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I risultati emersi ci hanno permesso di descrivere in modo adeguato il modo in cui le modificazioni del mRNA riescono ad influire sulla regolazione genica. La reversibilità della m6A per esempio la rende l'elemento funzionale più diffuso dell'mRNA. Si è visto che esiste un margine ampio per quanto riguarda la regolazione genica legata all' m6A, che garantisce una capacità maggiore di regolazione.

Il fatto che esiste un equilibrio dinamico tra le forme metilate e non del mRNA, permette una risposta tempestiva più accurata nei confronti di stimoli interni ed esterni.

Il gruppo di trascritti metilati gode di esporto nucleare accelerato, traslazione e degradazione che sono facilitate dal legame con i lettori di m6A. Questo processo dimostra che le molecole di mRNA, in particolare quelle che codificano i fattori di trascrizione e le proteine regolatorie possono essere sincronizzate in relazione alla differenziazione, lo sviluppo e svariati altri stimoli.

PROSPETTIVE

Proponiamo che i stessi stimoli e processi regolatori che regolano la trascrizione e la traslazione, possono anche regolare i scrittori, i cancellatori ed i lettori tramite diverse forme di modificazioni post trascrizionali. Per esempio, quando certi fattori di trascrizione sono attivati possono interessare l'accessibilità e l'attivazione dei scrittori. Lo stesso pathway di signalling può attivare o inattivare cancellatori o lettori tramite modifiche post trascrizionali o reclutamento diretto.

Questo processo può essere un meccanismo essenziale che le cellule dei mammiferi utilizzano per coordinare l'espressione genica durante lo sviluppo. Dall'altra parte difetti di tale meccanismo possono causare o per lo meno contribuire all'insorgenza di patologie (varie forme di cancro, hanno difetti nell'espressione dei scrittori, cancellatori e lettori dell'm6A).

Rimane comunque sconosciuto come i scrittori, cancellatori e lettori si coordinano in risposta a diversi pathways di signaling.

REFERENZE

1. Yue Y, Liu J, He C. *Genes Dev.* 2015 Jul 1;29(13):1343-55. doi: 10.1101/gad.262766.115. PMID: 26159994 , RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation
2. Desrosiers, R., Friderici, K. & Rottman, F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 71, 3971–3975 (1974)
3. Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G. et al. Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. *Nat Rev Genet* 15, 293–306 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrg3724>
4. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. Zhao BS, Roundtree IA, He C. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jan;18(1):31-42. doi: 10.1038/nrm.2016.132. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27808276
5. Dominissini, D. et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* 485, 201–206 (2012). The first report of transcriptome-wide m⁶A distribution, identifying enrichment in long exons, near stop codons and at 3' UTRs, and suggesting several RBPs as m⁶A readers.
6. Meyer, K. D. et al. 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell* 163, 999–1010 (2015).
7. Boo, S.H., Kim, Y.K. The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. *Exp Mol Med* 52, 400–408 (2020). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0407-z>