



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

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

**Elementi trasponibili e regolazione genica dei
primati**

**Transposable elements and primate gene
regulation**

Tesi di Laurea di:
Bartoloni Silvia

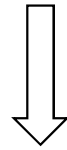
Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Barucca Marco

Sessione Febbraio 2020
Anno Accademico 2018/2019

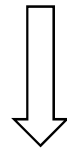
MATERIALE

Il materiale per la realizzazione di questa relazione è stato preso dall'articolo:
«**Transposable elements are the primary source of novelty in primate gene regulation**» Marco Trizzino, YoSon Park, Marcia Holsbach-Beltrame et al. 2017.
Genome Research 27: 1623-1633

Articolo: «Transposable elements are the primary source of novelty in primate gene regulation»

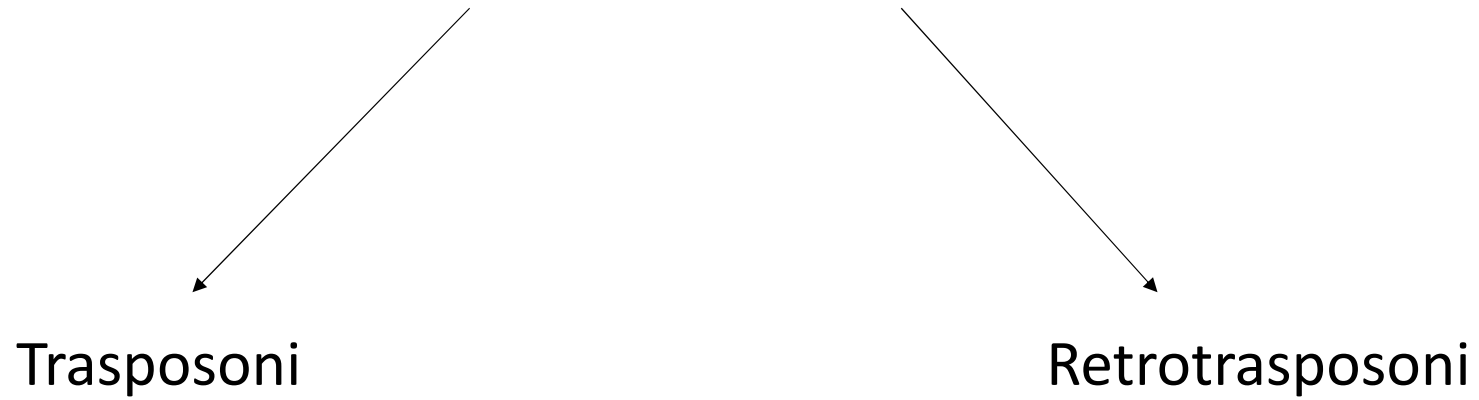


Analizzati i geni del fegato di 6 classi di primati post mortem



Dimostrato il ruolo critico e l'importanza degli ELEMENTI TRASPONIBILI nella regolazione genica

ELEMENTI TRASPONIBILI



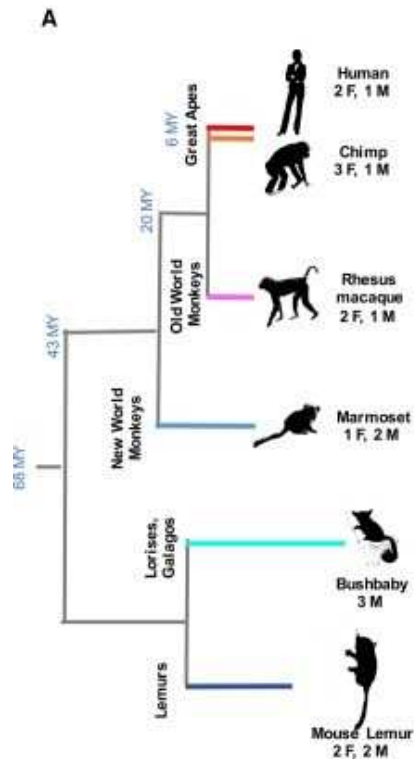


FIG 1A: Il campionamento comprendeva da tre a quattro esemplari di sei specie che rappresentavano tutti i principali cladi dei primati

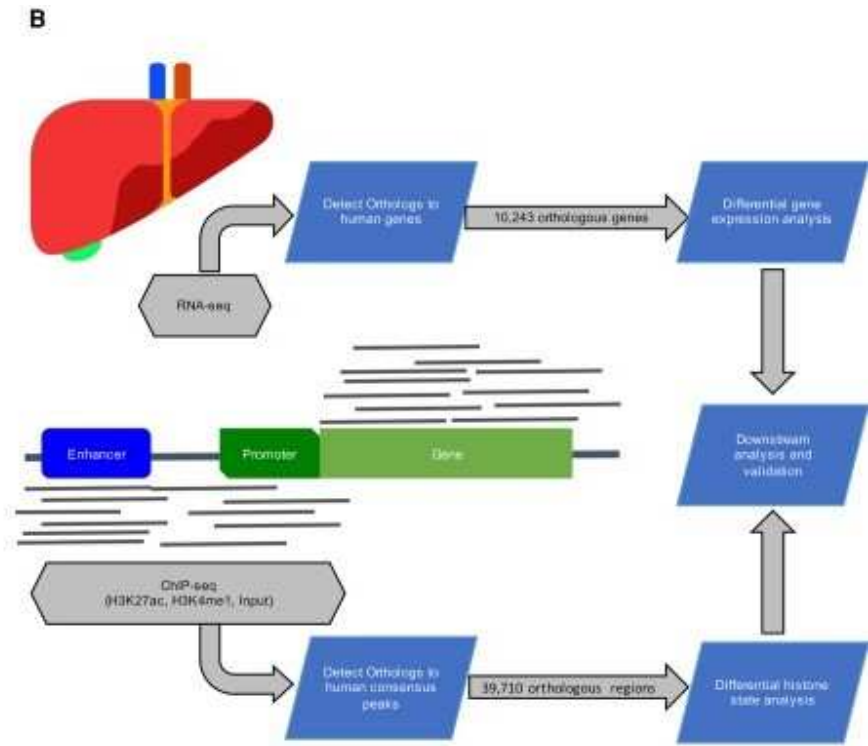


FIG 1B: Usate ChIP-seq per profilare *cis* elementi regolatori (CRE) e RNA-seq per caratterizzare l'espressione genica negli stessi individui.

RNA-seq

Il sequenziamento del trascrittoma è uno strumento potente per quantificare l'RNA messaggero e scoprire nuovi trascritti, trascrizioni e fusioni geniche → formate librerie di sequenziamento → le librerie di sequenziamento sono state raggruppate in due pool diversi → ogni pool è stato poi sequenziato su due corsie Illumina HiSeq 2500 → prodotti 42,1 milioni di single-end 100bp reads per campione

ChIP-seq

Il sequenziamento ChIP è un metodo utilizzato per analizzare le interazioni delle proteine con il DNA. Combina l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con il sequenziamento del DNA per identificare i siti di legame delle proteine associate al DNA → formate librerie di sequenziamento → le librerie sono state poi multiplexate, raggruppate e sequenziate su 16 corsie Illumina HiSeq 2500 → prodotti 40,6 milioni single-end 100 bp reads per campione

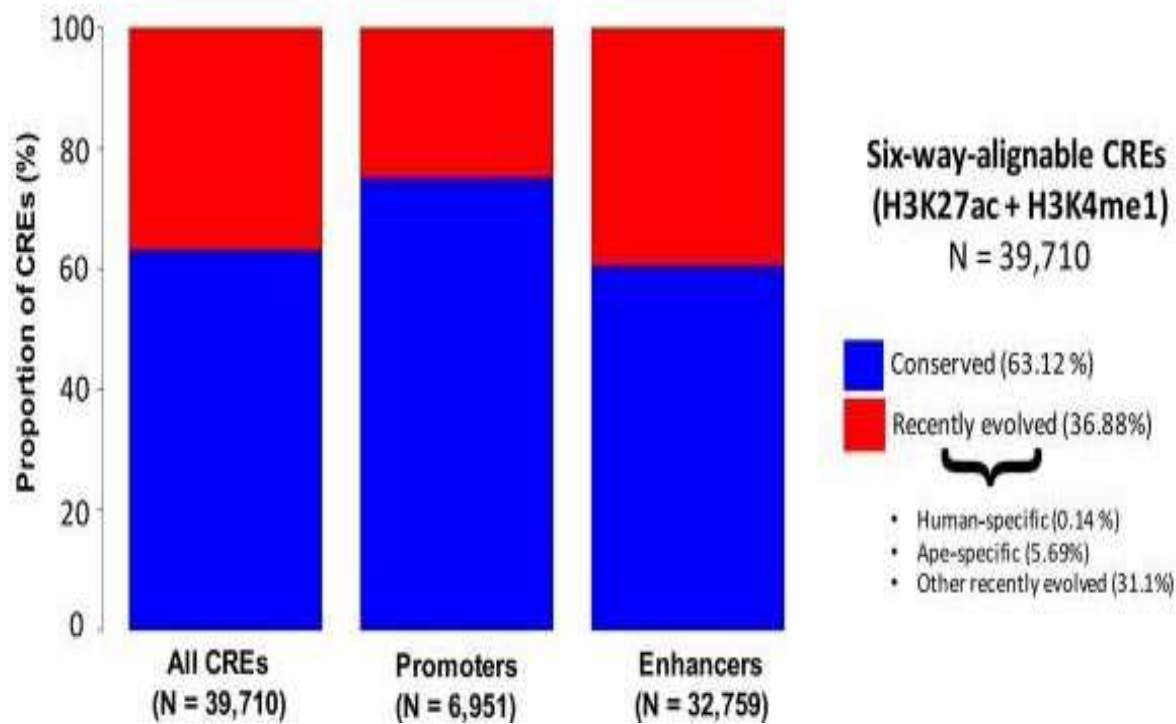
B

FIG2B: Frazione di primati CRE conservati e recentemente evoluti, con ripartizione di potenziatori e promotori

Più del 60% dei 39.710 CRE non ha mostrato significative variazioni dell'istone differenziale → CRE dei primati sono evolutivamente conservati → promotori più conservati degli enhancers.

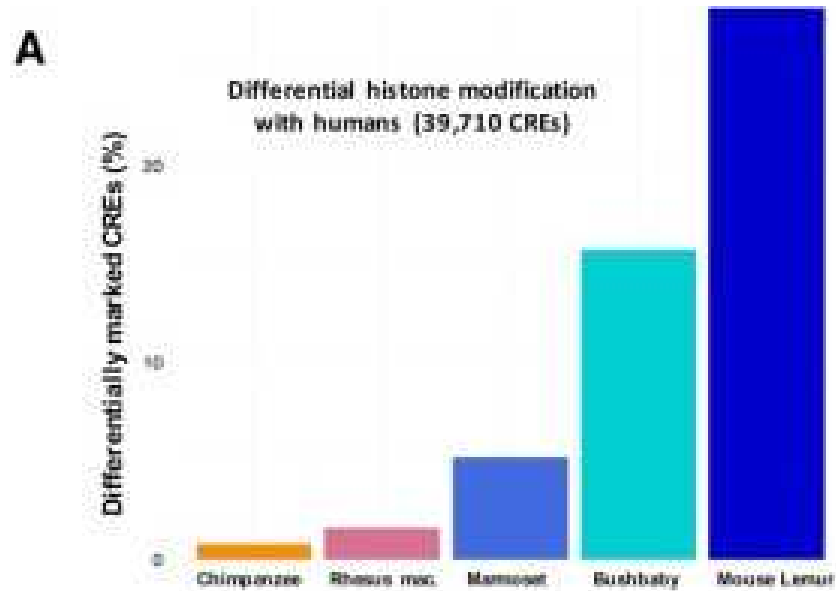


FIG 3A: Confronti a coppie incentrati sull'uomo per gli stati di modifica differenziale dell'istone su 39.710 CRE ortologi

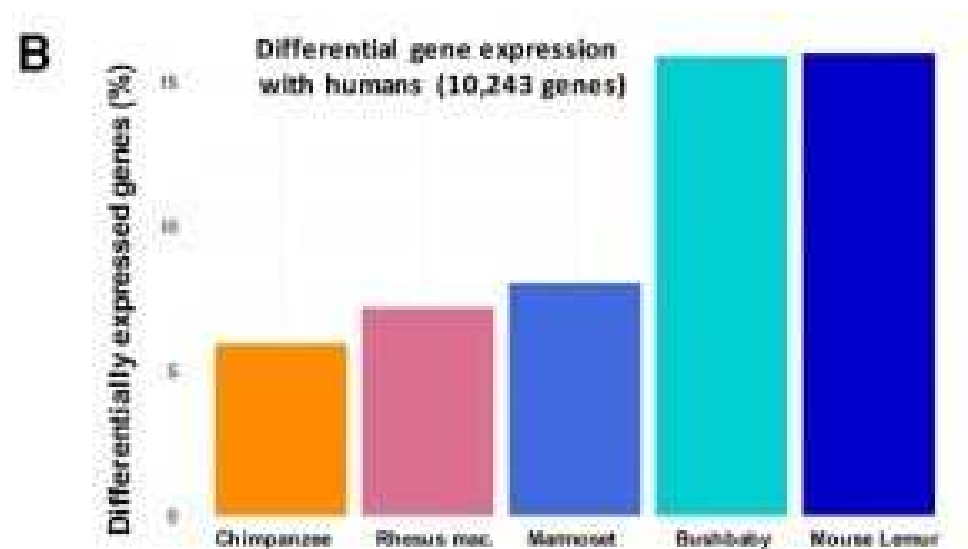


FIG 3B: Confronti a coppie incentrati sull'uomo per l'espressione genica differenziale di 10.243 geni ortologi

Sia la modifica dell'istone differenziale che l'espressione genica differenziale riflettevano la distanza filogenetica tra l'uomo e le altre specie testate. La divergenza di sequenza era significativamente associata alla modifica differenziale dell'istone → le CRE con sequenza nucleotidica conservata hanno una probabilità significativamente maggiore di avere un'attività regolatoria conservata e sono associate all'espressione genica conservata

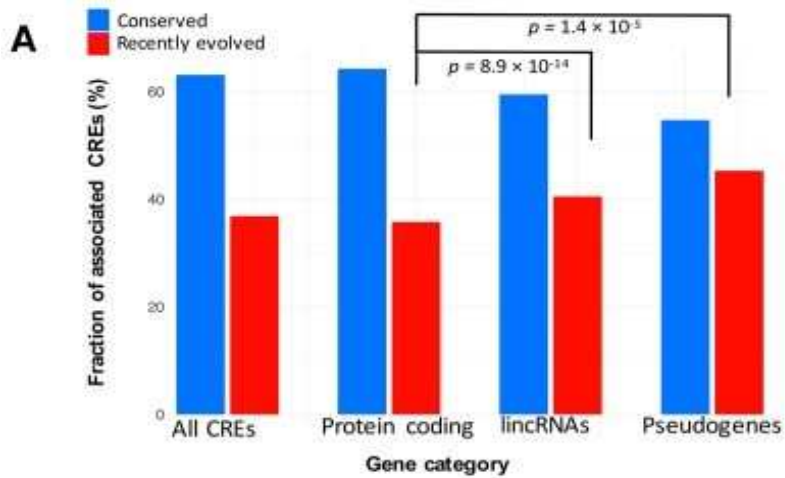


FIG 4A: Frazione di CRE conservati e recentemente evoluti associati a geni codificanti proteine, lincRNA e pseudogeni

Per comprendere i meccanismi responsabili della conservazione e del turnover della CRE → identificato le caratteristiche genomiche associate all'attività regolativa conservata.

Per le specie strettamente correlate l'attività regolatoria è conservata, indipendentemente dalla distanza dal TSS più vicino. Per coppie di specie più distanti tra loro, la conservazione era più bassa nelle regioni più distanti dai TSS.

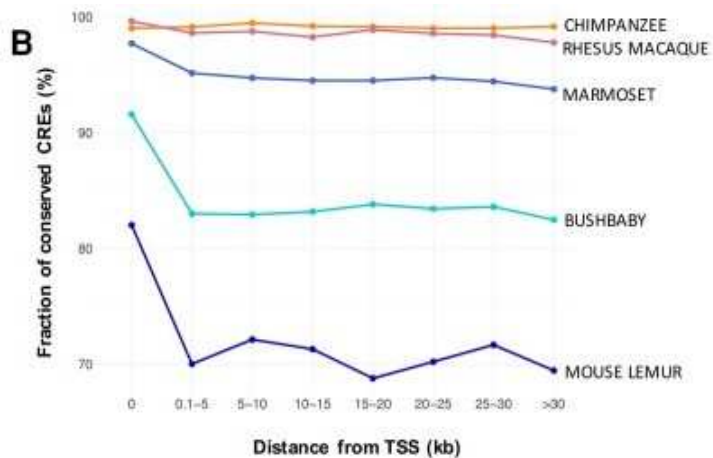


FIG 4B: Conservazione del CRE in funzione della distanza dal TSS

E

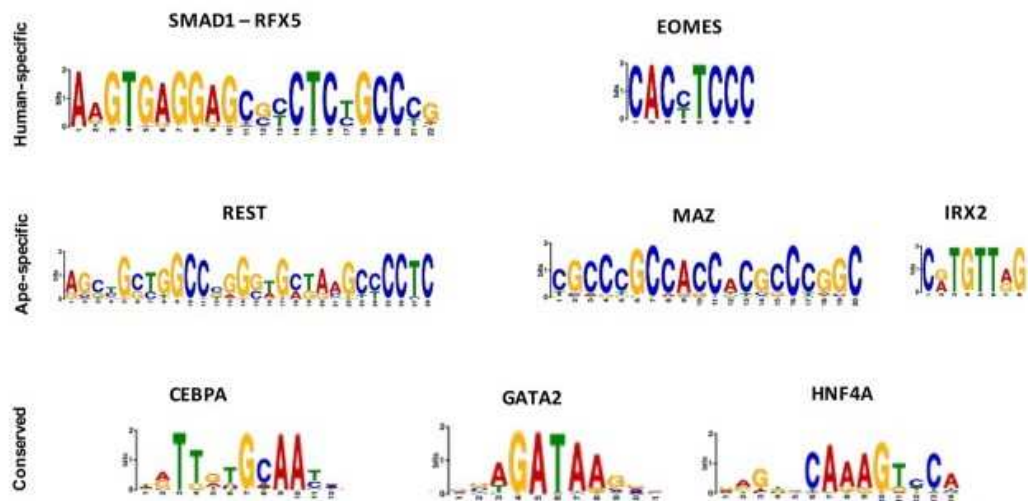


FIG 4E: Esempi di motivi arricchiti nelle CRE specifiche per l'uomo, nelle CRE specifiche per le scimmie e nelle CRE conservate.

Usato «The MEME Suite» (un potente set integrato di strumenti sul web per studiare motivi di sequenza in proteine, DNA e RNA) per identificare sequenze arricchite in CRE epatiche specifiche per l'uomo, specifiche per scimmia e conservate in modo evolutivo.



I risultati dimostrano che: l'evoluzione modella il panorama regolativo preservando l'attività regolatoria nei percorsi metabolici e di sviluppo essenziali, consentendo allo stesso tempo il rinnovamento incessante di reti specifiche che sono sottoposte a forti pressioni selettive

A

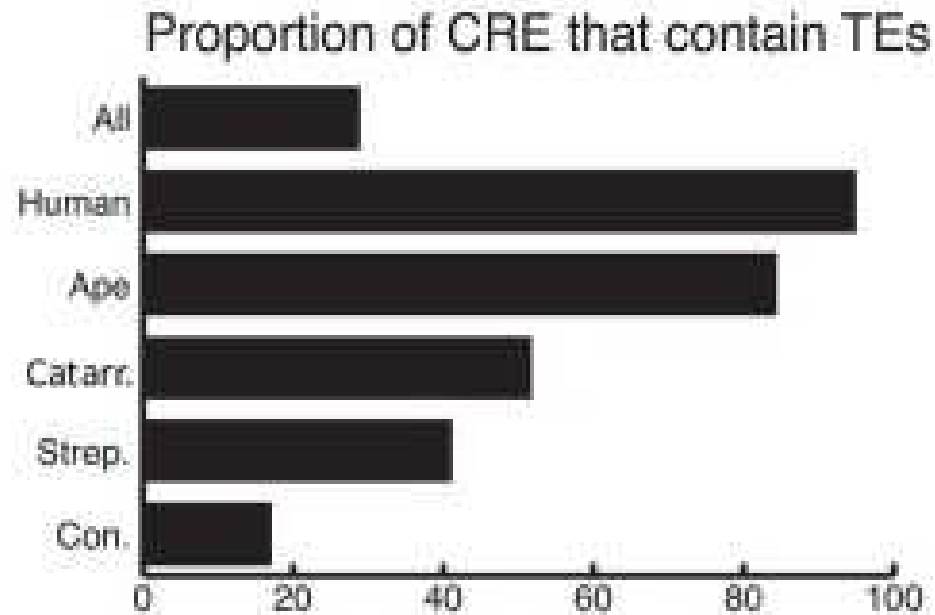


FIG 5A: Percentuale di CRE che si sovrappongono alle TE nei diversi lignaggi dei primati.

Per quantificare il contributo dei TE alla regolazione dell'espressione genica del fegato, è stato annotato ogni CRE del fegato sulla base della sovrapposizione con gli elementi RepeatMasker (programma che esamina le sequenze di DNA) → tot di 24 famiglie TE hanno significativamente arricchito le CRE → l' 80% delle CRE specifiche per le scimmie e quasi tutte le CRE specifiche per l'uomo contiene un TE, al contrario solo il 16% delle CRE conservate contiene un TE annotato.

GRIN3A



CRE arricchito con
LTR



UP REGOLATO
nelle scimmie



LTR è un
ENHANCER
FUNZIONALE

JARID2



CRE arricchito con
SVA



DOWN REGOLATO
nell'uomo



SVA è un
REPRESSORE
TRASCRIZIONALE

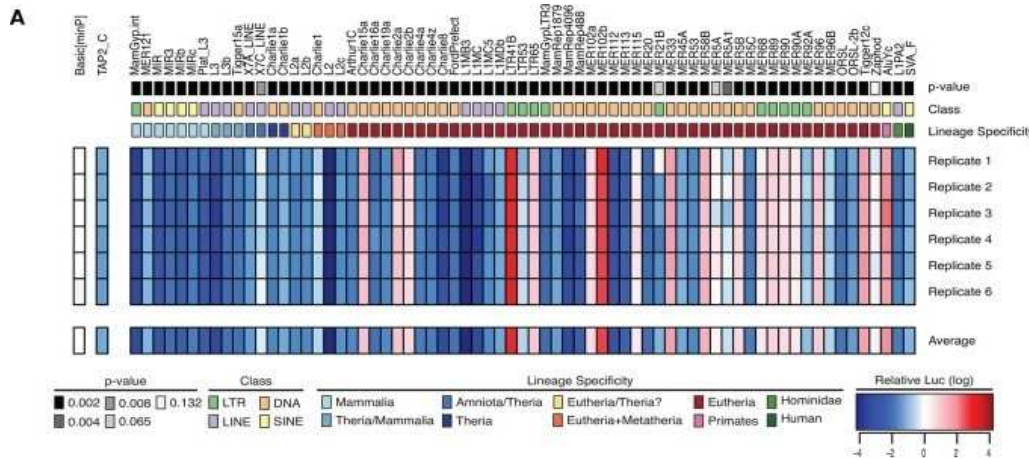


FIG 6A: Luciferasi reporter

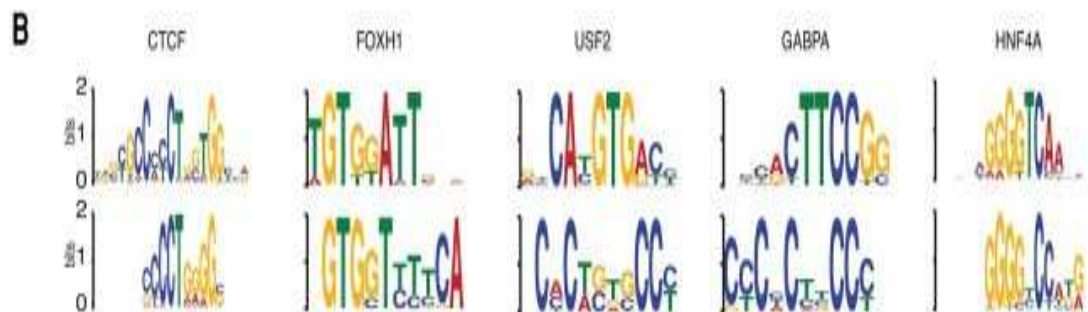
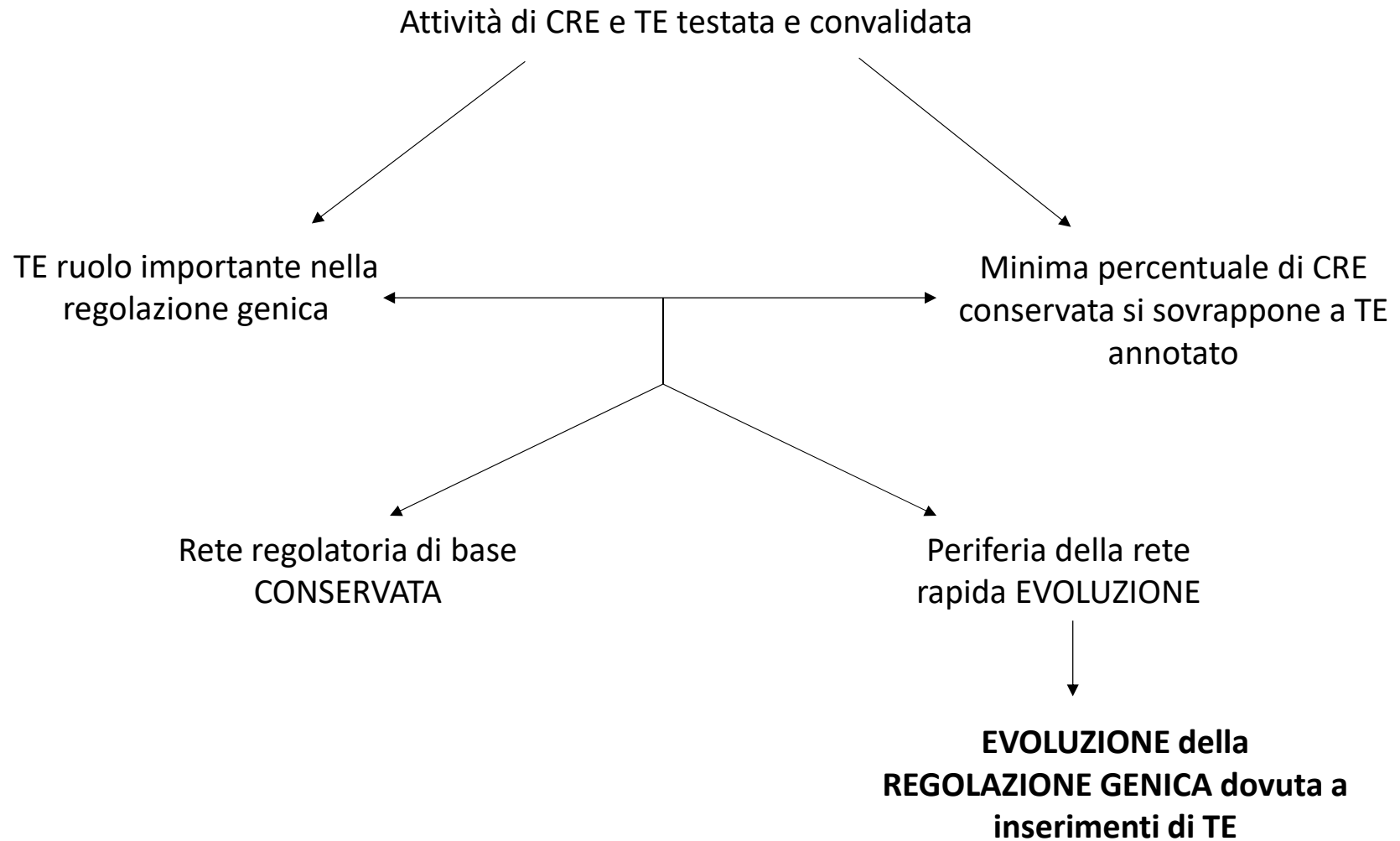


FIG 6B: Motivi arricchiti

La maggior parte dei nuovi CRE nei primati deriva da inserzioni di TE.
 Testata l'attività regolatoria *cis* di 69 sottofamiglie di TE.
 Livelli di espressione della luciferasi per 66 famiglie → differente dal controllo negativo
 17 (25,7%) di questi, principalmente LTR e trasposoni di DNA, hanno aumentato l'espressione genica .
 49 (74,3%), principalmente LINEE, hanno represso la trascrizione

Le sequenze di consenso per i 66 TE che hanno influenzato in modo significativo l'espressione dei reporter sono state analizzate con MEME per identificare motivi arricchiti → la maggior parte delle famiglie TE è in grado di funzionare nel fegato dei primati, come enhancer o come repressori, supportando ulteriormente le scoperte sul coinvolgimento pervasivo di TE nella regolazione del gene dei primati

CONCLUSIONE



RIASSUNTO ESTESO

Dopo un excursus sugli elementi trasponibili ho concentrato la mia attenzione sull'articolo di cui mi sono occupata ovvero «**Transposable elements are the primary source of novelty in primate gene regulation**».

Studiando i geni di sei specie di primati si è dimostrata l'importanza degli elementi trasponibili (che arricchiscono i CRE) nella regolazione dell'espressione genica e si sono illustrati i potenziali meccanismi alla base della divergenza evolutiva tra le specie di primati attraverso il genoma non codificante. Raccolti e confrontati i dati si è arrivati alla conclusione che la rete regolatoria di base che stabilisce l'identità del tipo di cellula epatica nei primati è conservata, mentre la rapida evoluzione si verifica alla periferia della rete, dove i TE hanno il maggiore impatto sull'evoluzione della regolazione genica.