

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

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

“ Silenziamento genico indotto dai micro-RNA: quanto è importante la sequenza? ”

“ Micro-RNA induced gene silencing: how important is the sequence? ”

Tesi di Laurea di

Batocco Nicole

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

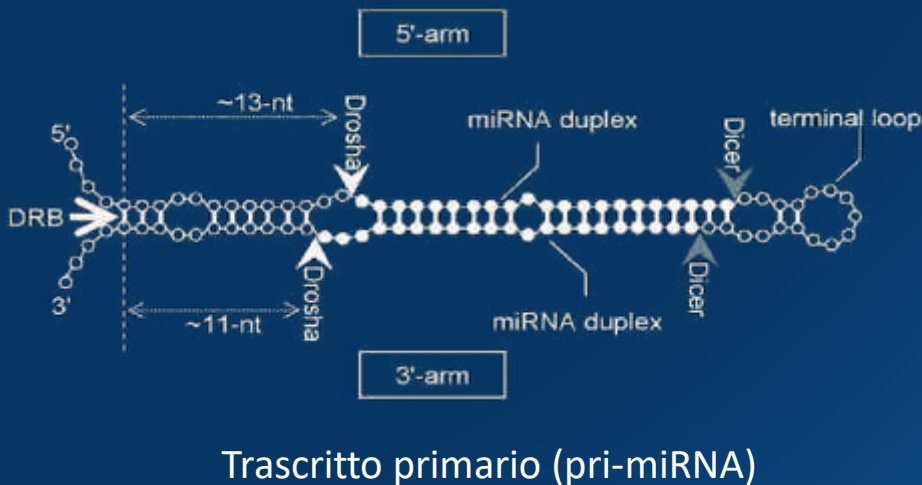
Anna La Teana

MICRO-RNA UNA BREVE INTRODUZIONE

➤ Struttura e biogenesi

I micro-RNA sono piccoli RNA endogeni, non codificanti e lunghi ~ 21 nt.

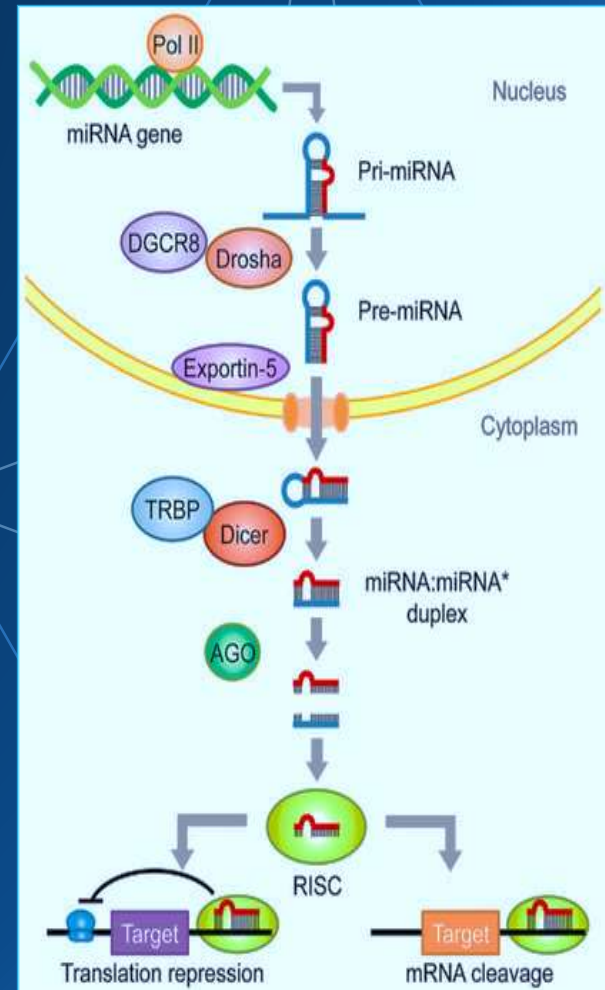
I geni per i miRNA sono localizzati nelle regioni intra ed intergeniche come geni singoli o raggruppati in cluster.



Trascritto primario (pri-miRNA)

Sintetizzato dall'RNA pol II, assume una struttura a forcina che viene elaborata dalle endonucleasi Drosha e Dicer generando il duplex maturo con estremità 3' protrudenti.

Biogenesi



➤ Funzione

I miRNA sono importanti regolatori dell'espressione genica.

Promuovono il silenziamento dell'espressione genica a livello del trascritto.

Proteina Argonauta

- Proteina core dei complessi RISC.
- Proteina bilobata con 4 domini:

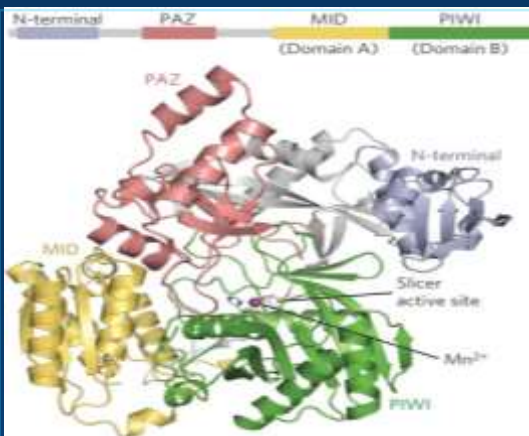
N-term → Caricamento RNA
PAZ → Legame al 3' del miRNA
MID → Legame al 5' del miRNA
PIWI → Taglio del mRNA

Proteina GW182

- Proteina di 182 kDa contenente ripetizioni di G e W.
- La regione N-terminale interagisce con Ago.
- La regione C-terminale lega enzimi coinvolti nel silenziamento del target.

MIRISC

miRNA



AGO-BD

SILENCING DOMAIN

MID

N

UBA

Q

M1

M2

RRM

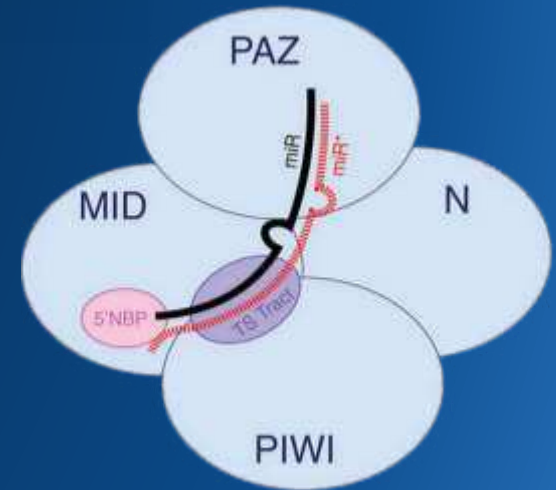
C

IMPORTANZA DELLA SEQUENZA



★ Selezione del filamento guida

La proteina Ago carica solo uno dei due filamenti del miRNA, mentre l'altro viene rilasciato e degradato.



Criteri di selezione

- Identità del nucleotide al 5' di ciascun filamento → $U > A > G > C$
- Stabilità termodinamica (TS) delle due estremità del duplex → TS inferiore



Cambio di braccio del miRNA → Spesso Ago può caricare l'uno o l'altro filamento a seconda del contesto cellulare, influenzando il repertorio dei messaggeri target.

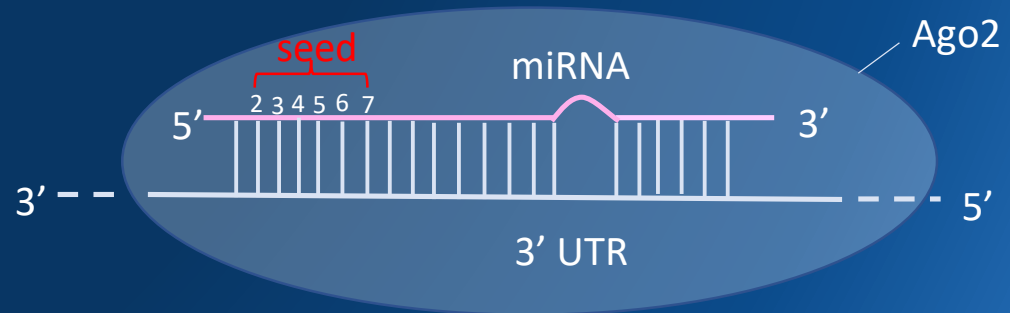
★ Appaiamento miRNA - Target

Il grado di appaiamento fra il miRNA e il messaggero influenza il meccanismo di silenziamento mediato dal miRISC.

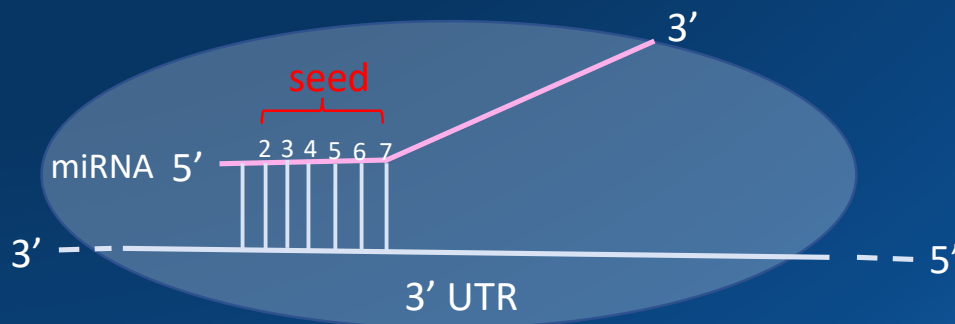
Regioni significative nel legame al target

- “Seed” (nt 2-7)
- “Seed” esteso (nt 2-8)
- Regione supplementare (nt 12-16)

1. Appaiamento miRNA-target completo → **Scissione endonucleolitica del target**



2. Appaiamento miRNA-target a livello del seed

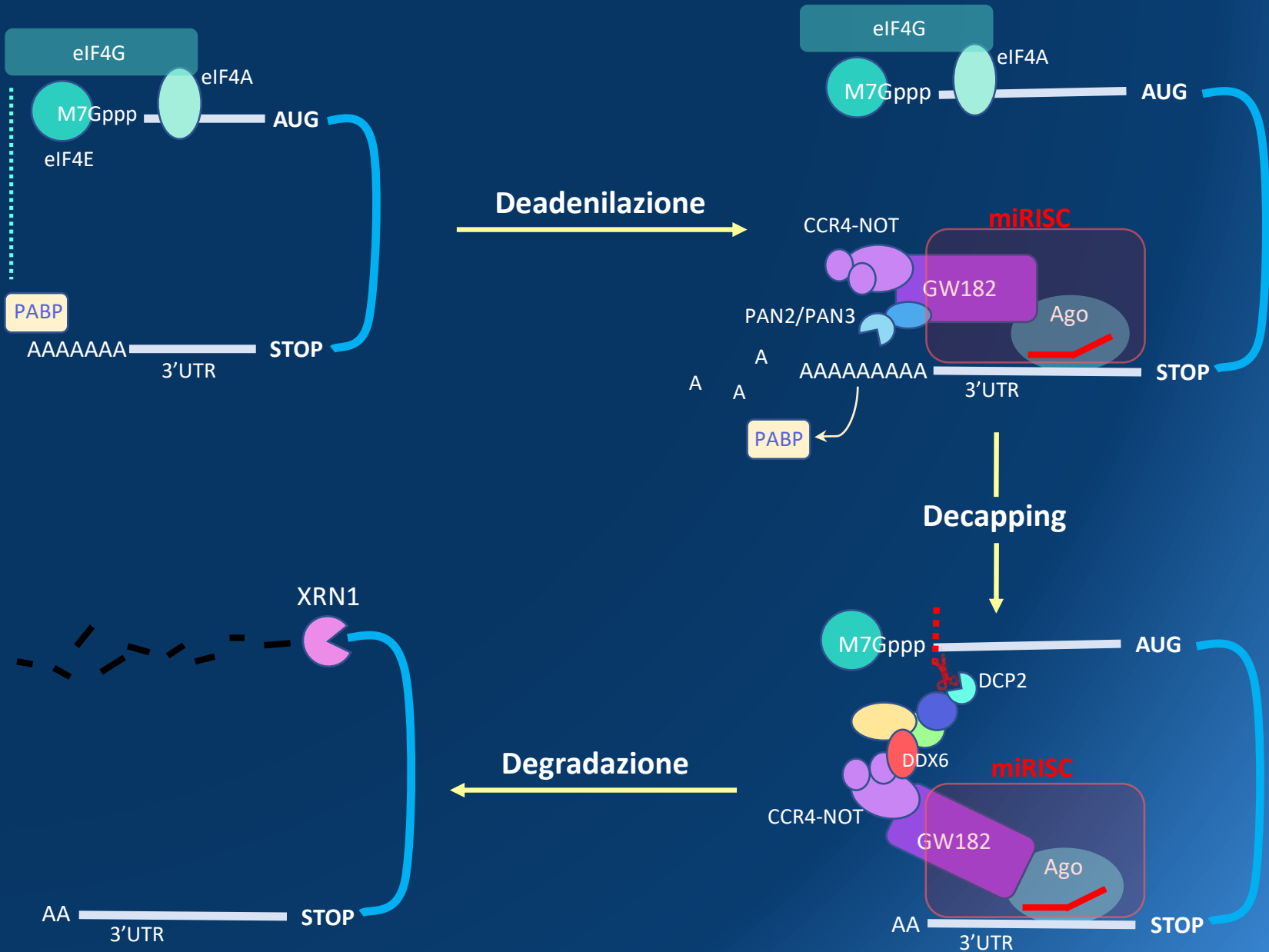


Inibizione della traduzione

Degradazione del messaggero

Spesso può essere presente anche un appaiamento a livello della regione supplementare del miRNA.

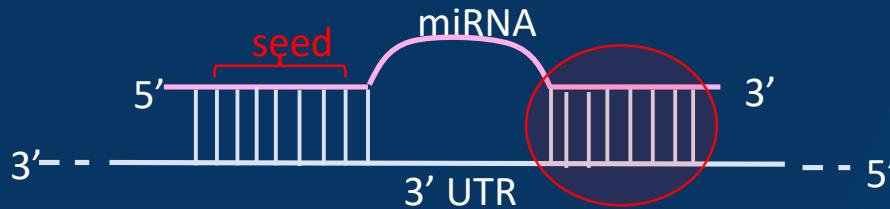
Degradazione del messaggero



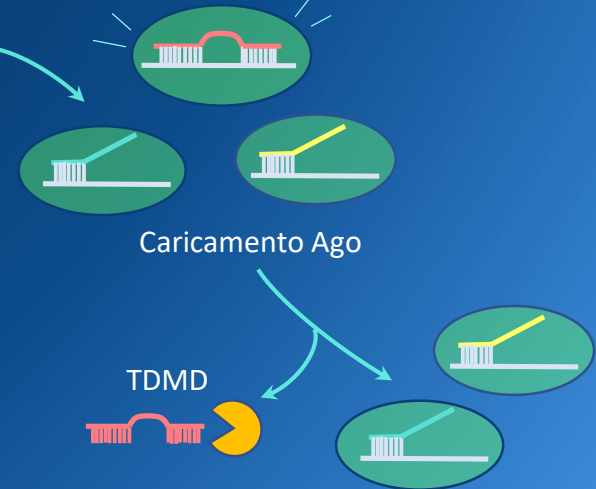
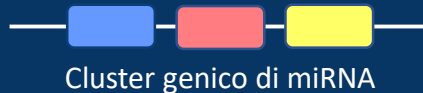
3. Appaiamento miRNA-target esteso → **Degradazione del miRNA mediata dal target (TDMD)**

TDMD

Processo attraverso il quale mRNA target legano selettivamente miRNA e ne inducono il decadimento.



IL TDMD è favorito da un appaiamento a livello del "seed" associato ad ampia complementarità al 3' del miRNA.



Importanza del TDMD

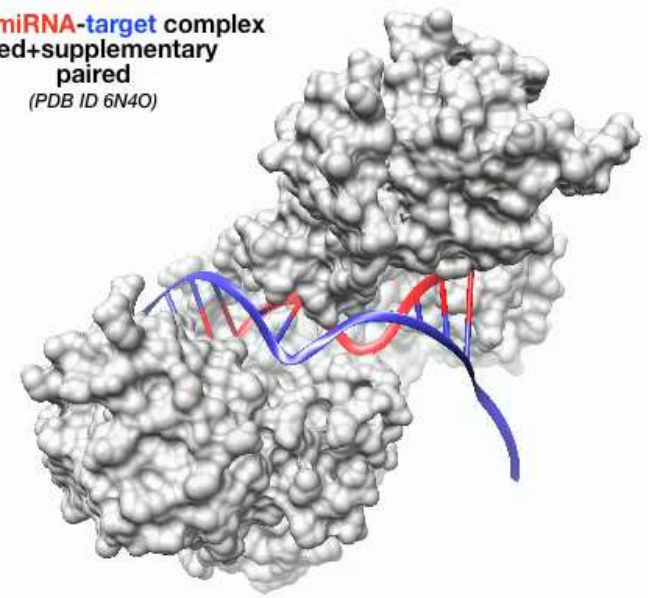
- Regolazione del turnover dei miRNA
- Regolazione dell'espressione dei membri di uno stesso cluster di miRNA in diverse condizioni
- Riciclaggio delle proteine Ago

Disaccoppiamento nei livelli dei membri del cluster

Domini di interazione Ago-miRNA/target

- Sito del "seed" (ospita il target appaiato al "seed")
- Gate centrale (ospita la regione centrale del target non appaiata al miRNA)
- Sito supplementare (ospita il target appaiato alla regione supplementare del miRNA)

Ago2-miRNA-target complex
seed+supplementary
paired
(PDB ID 6N4O)



L'appaiamento oltre la regione supplementare favorisce un cambiamento conformazionale di Ago che induce la liberazione dell'estremità 3' dal dominio PAZ.

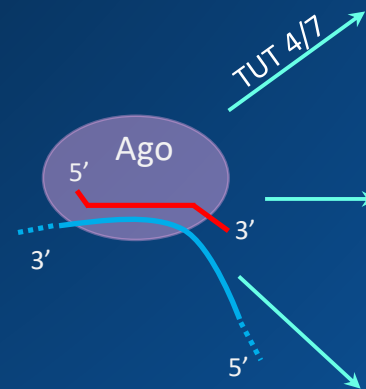
Sull'estremità 3' del miRNA possono intervenire:

- Nucleotidiltransferasi terminali (TNT)

→ Tailing

- Esonucleasi 3'-5'

→ Trimming



Trimming tail-dipendente



Trimming tail-indipendente



Tailing di poli-A



Degradazione miRNA

Stabilizzazione miRNA

ISOMIR

Isoforme di miRNA che variano per lunghezza, sequenza o entrambe rispetto alla forma canonica.

IsomiR “templated”

Presentano la stessa sequenza del miRNA canonico, ma hanno estremità 3', 5' o entrambe più corte.

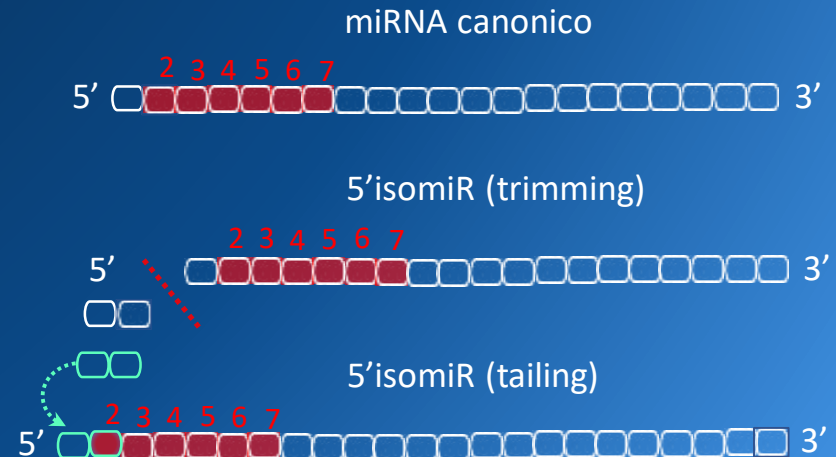
IsomiR “non templated”

Presentano, alle estremità o all'interno della sequenza, nucleotidi non presenti nella sequenza del gene corrispondente.

Classificazione IsomiR

- ISOMIR 5'

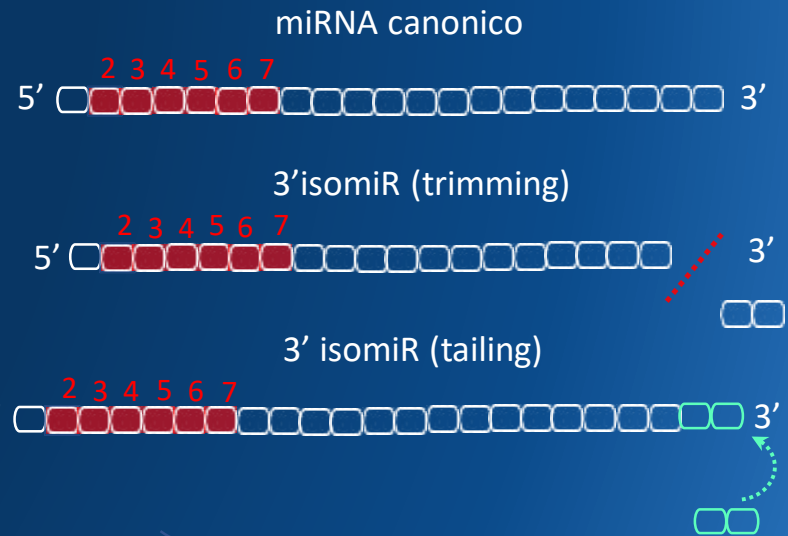
- Derivano da un'elaborazione imprecisa da parte di Drosha e/o Dicer
- Sequenza “seed” traslata
- miRISC diretto verso nuovi bersagli



- ISOMIR 3'

- Derivano da tailing (adenilazione/uridilazione) e/o trimming (idrolisi) durante o dopo la maturazione del miRNA.

- Sequenza "seed" inalterata, ma variazioni all'estremità 3' possono influenzare diverse fasi del meccanismo di silenziamento mediato da miRISC.

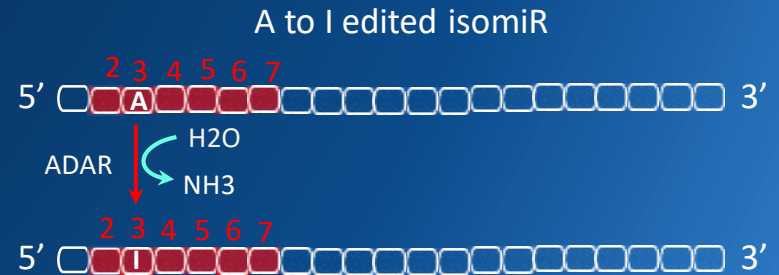


- ISOMIR POLIMORFICI

- Sono isoforme la cui sequenza contiene nucleotidi differenti rispetto al miRNA corrispondente.

- SNP a livello genico

- Editing (A-I / C-U) a livello del trascritto



Conclusione

Negli ultimi anni, studi sempre più numerosi evidenziano che variazioni nella sequenza stessa dei miRNA sono spesso responsabili di interazioni anomale con il messaggero target o con altre componenti della via di silenziamento genico mediata dal miRISC. Alterazioni di questo processo contribuiscono all'insorgenza di numerose patologie, tra cui molte forme tumorali, malattie metaboliche e disturbi neurodegenerativi.

Bibliografia

- Frédérick PM, Simard MJ. Regulation and different functions of the animal microRNA-induced silencing complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021 Nov 1:e1701. doi: 10.1002/wrna.1701. Epub ahead of print. PMID: 34725940.
- Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021 May;12(3):e1627. doi: 10.1002/wrna.1627. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32954644; PMCID: PMC8047885.
- Fuchs Wightman F, Giono LE, Fededa JP, de la Mata M. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front Genet*. 2018;9:435. Published 2018 Oct 2. doi:10.3389/fgene.2018.00435
- Laura B. Chipman, Amy E. Pasquinelli, miRNA Targeting: Growing beyond the Seed, *Trends in Genetic*, Volume 35, Issue 3, 2019, Pages 215-222, ISSN 0168-9525, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.12.005>.
- Tomasello Luisa, Distefano Rosario, Nigita Giovanni, Croce Carlo M. The MicroRNA Family Gets Wider: The IsomiRs Classification and Role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Volume 9. 2021. doi:10.3389/fcell.2021.668648

Bibliografia immagini e video

- Jessica Sheu-Gruttadauria et al. Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation, *Molecular Cell*, Volume 75, Issue 6, 2019, Pages 1243-1255.e7, ISSN 1097-2765, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.019>.
- Terai G, Okida H, Asai K, Mituyama T (2012) Prediction of Conserved Precursors of miRNAs and Their Mature Forms by Integrating Position-Specific Structural Features. *PLoS ONE* 7(9): e44314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044314>
- Liu C-H, Huang S, Britton WR, Chen J. MicroRNAs in Vascular Eye Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(2):649. <https://doi.org/10.3390/ijms21020649>