

PROGRAMMA DI RICERCA

Titolo: Studio delle dinamiche molecolari dei non-coding RNA come regolatori epigenetici in contesti patologici: focus sui tRNA-derived small RNA

Con il graduale aumento dell'aspettativa di vita, le patologie degenerative diventano più comuni e, essendo condizioni croniche, possono influenzare significativamente la qualità di vita di una persona. Tra queste patologie, l'insufficienza cardiaca (*heart failure*, HF) è un problema di salute pubblica sempre più rilevante in Italia, con una prevalenza in costante aumento ed un impatto significativo sia in termini di salute individuale che di costo per il sistema sanitario nazionale. L'osteoartrite (OA), invece, rappresenta l'insufficienza funzionale della cartilagine articolare, ed è la principale causa di disabilità cronica negli anziani. In quanto condizioni legate all'età, entrambe richiedono una gestione a lungo termine e strategie di trattamento volte ad alleviare i sintomi, rallentare la progressione e migliorare la funzione generale ed il benessere. L'OA e l'HF condividono vari aspetti molecolari e cellulari. Ad esempio, entrambe le condizioni coinvolgono un'inflammatione di basso grado e stress ossidativo che contribuiscono alla progressione patologica.

Sebbene siano stati compiuti progressi nel gestire i sintomi e migliorare gli esiti di tali patologie, terapie definitive in grado di modificarne completamente la progressione naturale devono ancora essere identificate. La ricerca riveste dunque un ruolo fondamentale in questo contesto. Studi finalizzati all'identificazione dei meccanismi molecolari alla base di tali condizioni e alla scoperta di nuovi target terapeutici sono essenziali per sviluppare approcci di cura più efficaci e mirati, rappresentando pertanto l'indispensabile premessa per trasferire nuove conoscenze scientifiche alla pratica clinica.

Tra i meccanismi molecolari alla base dei cambiamenti biochimici e fisio-patologici che caratterizzano gli eventi di degenerazione tissutale, come nel cuore insufficiente o nella cartilagine osteoartrotica, risulta di grande interesse il ruolo dei *non-coding* RNA (ncRNA). Infatti, negli ultimi anni lo sviluppo di tecnologie di *next-generation sequencing* (NGS) ha ampliato enormemente il panorama di tali molecole, portando alla luce nuove tipologie di ncRNA, che comprendono ad esempio, oltre ai più noti microRNA (miRNA) e *long non-coding* RNA (lncRNA), anche *Piwi-interacting* RNA (piRNA) e *circular non-coding* RNA (circRNA). Inoltre è stata recentemente descritta una nuova classe di piccoli ncRNA derivanti da tagli enzimatici dei *transfer* RNA (tRNA) chiamati *tRNA-derived small RNAs* (tsRNA). In particolare, si tratta di oligonucleotidi di 14-55 nt che possono originare dalle estremità 3' o 5' dei tRNA (in questo caso sono indicati come 3'tRF e 5'tRF), da regioni interne (itRFs) oppure, mediante un taglio a livello del loop che ospita l'anticodone, possono derivare i *tRNA-derived half sequence* (tiRNA). Se nel complesso questi tsRNA possono essere generati in condizioni fisiologiche e la loro stabilità può essere importante per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, d'altra parte diversi stress cellulari, quali ipossia, *starvation*, infiammazione e stress ossidativo, possono indurre la biogenesi di specifici tsRNA, le cui funzioni cellulari ad oggi sono solo parzialmente note. Alcuni di questi piccoli RNA possono interagire con il *RISC complex* e, contenendo una *seed sequence* in grado di riconoscere regioni target di mRNA, influenzarne la stabilità, svolgendo quindi una funzione *miRNA-like*. Oltre a questo meccanismo, i tsRNA sono coinvolti nella regolazione di processi quali la traduzione, la biogenesi ribosomiale, l'apoptosi, la proliferazione, la retrotrasposizione e la comunicazione intercellulare (1, 2).

A differenza degli RNA messaggeri (mRNA), che servono da matrici per la produzione di proteine, nel complesso i ncRNA possono svolgere ruoli fondamentali come regolatori epigenetici, modificatori post-trascrizionali e coordinatori traduzionali dell'espressione genica. Gli attuali approcci di profilazione dell'intero trascrittoma hanno permesso di evidenziare in modo sempre più chiaro l'espressione anomala dei ncRNA nei diversi contesti patologici, da una parte fornendo l'interessante prospettiva di sfruttare questi cambiamenti di espressione come potenziali marcatori a fini diagnostici e prognostici, dall'altra suggerendo la possibilità che tali molecole interferiscano con i meccanismi patogenetici alla base delle malattie e possano rappresentare *target* per nuove strategie terapeutiche e preventive.

Il presente progetto ha l'obiettivo di indagare le dinamiche molecolari dei ncRNA, ed in particolare dei tsRNA, nei contesti patologici dell'OA e dell'HF, al fine di:

- definire i meccanismi di biogenesi dei tsRNA in risposta a stimoli infiammatori/ipertrofici
- investigare il ruolo di tsRNA selezionati
- studio dell'interattoma di tsRNA selezionati
- definire la potenziale relazione tra deposizione di aggregati amiloidi e pre-amiloidi e la frammentazione dei tsRNA attraverso la formazione di *stress granules*.

Metodologia:

Tutte le metodologie proposte per il raggiungimento degli scopi prefissati sono basate su tecniche di ultima generazione, altamente standardizzate per lo studio dei miRNA e che possono essere utilizzate per lo studio di espressione e funzionale dei tRF.

Profiling di sncRNA: analisi di small RNA-sequencing sarà condotta per ottenere una panoramica dettagliata e completa del profilo di espressioni di questa classe di ncRNA nei nostri modelli in studio. L'estrazione sarà eseguita con kit Qiagen usati per i miRNA, in modo da preservare la componente di RNA a basso peso molecolare. I campioni di RNA saranno trattati con kit Arraystar che permettono la rimozione di modifiche dei tRNA e le librerie preparate con kit Qiagen. Il *sequencing* condotto con tecnologia Illumina Novaseq5000 sarà affidato a service esterno. L'analisi bioinformatica permetterà di discriminare non solo i miRNA, ma anche i piRNA e i tsRNA. In questo modo proponiamo di rivelare la presenza di nuovi *small* ncRNA precedentemente sconosciuti o sottorappresentati. Inoltre, valuteremo i target a valle predetti da tool bioinformatici come multiMiR (3), o individuati da database come TargetScan e miRanda (utili per la predizione di target di miRNA, ma anche di altri ncRNA), RNAplex e IntaRNA (per la predizione delle interazioni RNA-RNA basati su algoritmi di ricerca di strutture secondarie complementari). Un'analisi di *gene ontology* (GO) sarà effettuata mediante clusterProfiler (4) e shinyGO (5).

Analisi di espressione di tRNA, tsRNA, microRNA e mRNA: i livelli dei diversi RNA saranno quantificati usando diversi approcci di qPCR. Saggi di RT-qPCR customizzati (Qiagen), sviluppati per la *detection* dei miRNA saranno usati sugli stessi estratti di RNA dedicati al saggio di *small RNA-seq*. L'espressione genica dei trascritti degli enzimi dedicati alla biogenesi dei tsRNA sarà valutata tramite RT-qPCR convenzionale.

Colture cellulari e modulazione dei tsRNA: le colture cellulari (condrociti primari o in linea come le C28/I2, oppure cardiomiociti derivanti dal differenziamento di cellule staminali pluripotenti indotte) saranno mantenute in condizioni di controllo o esposte ad opportuni stimoli pro-infiammatori (ad esempio 10 µg/mL LPS) o ipertrofici (ad esempio endotelina-1 10 nM). Dopo la stimolazione i campioni saranno raccolti, pellettati a diversi *time point* (6-24-48 ore), a seconda dell'analisi sperimentale a valle, e conservati a -80°C. I livelli dei tsRNA saranno modulati usando oligonucleotidi sintetici (Qiagen). L'inibizione verrà eseguita con oligonucleotidi antisense complementari alle sequenze dei tsRNA e contenenti residui *locked nucleic acids* (LNA) per garantire maggiore stabilità alla struttura, resistenza alle nucleasi e potenziare il legame al target. Il legame comporta la degradazione del tsRNA e/o blocca la sua attività. Gli oligonucleotidi sintetici verranno usati per mimare la sequenza dei tsRNA. Gli oligonucleotidi biotinilati saranno trasferiti per esperimenti di *pull-down* volti ad identificare l'interattoma dei tsRNA.

Saggi funzionali: la valutazione a valle delle modulazioni dei livelli dei tsRNA sarà eseguita tramite: quantificazione di marker genici infiammatori (COX2, iNOS, SOD2), di catabolismo (MMP13, COL2A1, TIMP3), di ipertrofia (NPPA, NPPB, RUNX2), di alterazione della proteostasi (forma di *splicing* e totale di XBP1 come marker di stress del reticolo endoplasmico, LC3 e P62 come marker autofagici, HSP70, HSP27, HSP90); saggi di western blot per testare i pathway di regolazione della proteostasi (calnexin, BIP, CHOP, p-EIF2a, ubiquitina, p62, LC3I/II); valutazione dell'attività proteasomale tramite saggio enzimatico con substrato fluorogenico suc-LLVY-AMC.

Pull-down e spettrometria di massa: In seguito alla trasfezione con oligonucleotidi biotinilati, le cellule saranno esposte agli UV per permettere il cross-link e "congelare" le interazioni RNA-proteina. Dopo la lisi gli oligonucleotidi biotinilati saranno *pulled-down* usando biglie di streptavidina e le proteine co-precipitate saranno identificate usando lo spettrometro di massa.

Co-staining amiloide-tsRNA-stress granules: per valutare la co-localizzazione di aggregati, tsRNA e formazione di *stress granules*, verranno combinati saggi di ibridazione in situ tramite l'uso di oligonucleotidi coniugati con DIG in grado di legare sequenze dei tsRNA, con staining degli aggregati di amiloide (CongoRed o Tioflavina-T) e con analisi di immunofluorescenza con anticorpi per marker degli *stress granules* (G3BP1, Tia-1, HuR). Le immagini saranno acquisite al microscopio confocale.

1. Yu X, Xie Y, Zhang S, Song X, Xiao B, Yan Z. tRNA-derived fragments: Mechanisms underlying their regulation of gene expression and potential applications as therapeutic targets in cancers and virus infections. *Theranostics*. 2021;11(1):461-9.
2. Bayazit MB, Jacovetti C, Cosentino C, Sobel J, Wu K, Brozzi F, et al. Small RNAs derived from tRNA fragmentation regulate the functional maturation of neonatal β cells. *Cell Rep*. 2022;40(2):111069.
3. Ru Y, Kechris KJ, Tabakoff B, Hoffman P, Radcliffe RA, Bowler R, et al. The multiMiR R package and database: integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(17):e133-e.
4. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2012;16(5):284-7.
5. Ge SX, Jung D, Yao R, Valencia A. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 2020;36(8):2628-9.

PIANO DI FORMAZIONE DELL'ASSEGNISTA

L'assegnista, per poter realizzare il presente progetto dovrà essere in possesso di alcune tecniche fondamentali:

- Colture cellulari *in vitro* di linee immortalizzate (C28I2, H9c2), cellule primarie (condrociti da paziente), differenziamento di cellule staminali pluripotenti-indotte in senso cardiomiocitario;
- Analisi di espressione genica ed approcci bioinformatici per l'elaborazione dei dati
- Valutazione dei target a valle predetti da *tool* bioinformatici come multimiR, o individuati da database come TargetScan e miRanda (utili per la predizione di target di miRNA, ma anche di altri ncRNA), RNAplex e IntaRNA (per la predizione delle interazioni RNA-RNA basati su algoritmi di ricerca di strutture secondarie complementari).
- Analisi di *gene ontology* (GO) mediante clusterProfiler e shinyGO.
- Analisi di espressione proteica mediante Western Blot
- Analisi in immunofluorescenza e colorazioni su colture cellulari fissate
- Analisi statistiche

Il programma di formazione dell'assegnista avrà quindi l'obiettivo di fornire le conoscenze teoriche e pratiche necessarie per raggiungere gli obiettivi del progetto. È prevista quindi la partecipazione dell'assegnista alla programmazione degli esperimenti e alla elaborazione dei dati, l'acquisizione della capacità di saper valutare criticamente i risultati e presentarli in pubblico, la partecipazione a seminari e congressi scientifici pertinenti ed utili per lo svolgimento della ricerca.