

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica

Dottorato di Ricerca in Genomica e Proteomica delle malattie
oncologiche ed endocrino-metaboliche
XXIV Ciclo

ROLE OF THE CHROMATIN REMODELER FACTOR ISWI IN TISSUE REGENERATION

Tutor: Dr. Davide Corona

Tesi di Dottorato di:
Giulia D'Angelo

Coordinatore: Prof. Salvatore Feo

Abstract

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Corso di Dottorato di Ricerca in Genomica e proteomica delle malattie oncologiche
ed endocrino-metaboliche

Tesi di Dottorato di: Giulia D'Angelo

Relatore: Dr. D. Corona

Ruolo del fattore di rimodellamento della cromatina ISWI nella rigenerazione
tissutale

Durante lo sviluppo degli organismi multicellulari, le modifiche epigenetiche della cromatina garantiscono l'attuazione dei programmi trascrizionali che guidano i processi di determinazione del destino cellulare. La presenza di modifiche epigenetiche della cromatina inoltre, assicura il mantenimento e la propagazione, nel corso delle divisioni mitotiche, di una memoria epigenetica cellulare.

Tuttavia, sono note almeno due eccezioni a questo processo: la rigenerazione e la transdeterminazione

Durante la rigenerazione tissutale, un fenomeno evolutivamente molto conservato, cellule già determinate affrontano cicli di proliferazione durante i quali possono riprogrammare la loro memoria epigenetica allo scopo di rigenerare parti di tessuto andate perdute. Sotto specifici stimoli inoltre, gli eventi di riprogrammazione epigenetica nelle cellule rigeneranti possono dar luogo ad un cambiamento del destino differenziativo cellulare, un fenomeno definito transdeterminazione.

La riprogrammazione epigenetica è mediata da specifici complessi nucleari multiproteici che, con la loro attività enzimatica dipendente dall'idrolisi dell'ATP, rimodellano la cromatina attivando e/o reprimendo l'espressione genica.

Studi recenti suggeriscono che i rimodellatori della cromatina abbiano un ruolo di cruciale importanza nei processi di riprogrammazione della memoria epigenetica che avvengono nella rigenerazione e della transdeterminazione. Tuttavia, rimangono da chiarire i meccanismi molecolari di questo coinvolgimento.

ISWI, un fattore di rimodellamento nucleosomale conservato in tutti i metazoi, è la subunità ATPasica di molteplici rimodellatori cromatinici noti per avere un ruolo importante in svariati processi biologici, tra cui la replicazione del DNA, il silenziamento dei telomeri, il differenziamento neuronale e la riprogrammazione epigenetica che avviene durante il trasferimento nucleare ai fini della clonazione.

Nello studio presentato, le funzioni di rimodellamento della cromatina mediate dalla proteina ISWI in *D.melanogaster*, sono state poste in relazione con gli eventi di riprogrammazione della memoria epigenetica che avvengono nei tessuti larvali delle ali e delle zampe indotti a rigenerare dopo danno tissutale. Saggi *in vivo* hanno permesso di osservare una diminuzione della capacità di transdeterminazione e di rigenerazione dei tessuti mutanti per il gene *ISWI* rispetto ai tessuti di mosche controllo.

Al fine di identificare su scala genomica i geni regolati dal rimodellatore ISWI durante la rigenerazione, ho estratto la cromatina dai tessuti rigeneranti. Successivamente, tramite la metodica di ChIP-seq, è stata ottenuta una mappa su scala genomica dei siti preferenzialmente legati dal rimodellatore ISWI durante la rigenerazione. Allo scopo di stabilire la variazione dell'espressione genica di tessuti controllo e mutanti per ISWI durante la rigenerazione, ho estratto l'RNA. Tramite la metodica di RNA-seq ho confrontato i trascrittomi di questi tessuti rigeneranti. Dall'analisi dei trascrittomi, i geni differenzialmente espressi sono stati paragonati con quelli preferenzialmente legati da ISWI, ottenendo così quei geni che durante la rigenerazione sono sotto il controllo trascrizionale di ISWI. Il mio studio ha portato all'identificazione di una preziosa collezione di network genetici sotto il controllo del rimodellatore della cromatina ISWI e coinvolti in eventi rigenerativi. Tali geni necessiteranno di un'ulteriore validazione biochimica e molecolare al fine di validare la loro capacità di modificare la capacità di rigenerazione dei tessuti.

Sono convinta che la conoscenza del ruolo che i rimodellatori cromatinici come ISWI hanno negli eventi di riprogrammazione della memoria epigenetica si rivelerà di fondamentale importanza nello sviluppo di approcci biotecnologici che hanno come obiettivo la possibilità di controllare i processi di rigenerazione tissutale che seguono il danno tissutale.

Abstract

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Corso di Dottorato di Ricerca in Genomica e proteomica delle malattie oncologiche ed endocrino-metaboliche

PhD Thesis of: Giulia D'Angelo

Scientific supervisor: Dr. D. Corona

Role of ISWI chromatin remodelling factor in tissue regeneration

During the development of multicellular organisms, epigenetic modifications of chromatin ensure the implementation of the transcriptional programs characterizing cell fate determination. The presence of chromatin epigenetic modifications also guarantee the maintenance and propagation during the mitotic divisions of the so called epigenetic cell memory.

However, there are at least two exceptions to this process: the regeneration and transdetermination precesses.

During tissue regeneration, an evolutionarily conserved phenomenon, cells that undergo fast rounds of proliferation can reprogram their epigenetic memory in order to regenerate parts of missing tissue. Moreover, under specific stimuli, the events of epigenetic reprogramming in regenerating cells may give rise to a change in cell fate differentiation, a phenomenon known as transdetermination.

Epigenetic reprogramming events are mediated by specific nuclear multiprotein complexes that use the energy of ATP hydrolysis to remodel chromatin by activating and/or repressing gene expression.

Recent studies suggest that chromatin remodelers have a critical role in the reprogramming of epigenetic cell memory occurring during regeneration and transdetermination. However, it remains to clarify the molecular mechanisms underlying their involvement.

ISWI, a nucleosomal-stimulated remodeling factor conserved in all metazoans, is the ATPase subunit of multiple chromatin remodeling known to have an important role in various biological processes, including DNA replication, telomeres silencing, neuronal differentiation and epigenetic reprogramming that occurs during the nuclear transfer. In this study, a connection is proposed between the chromatin remodelling activity mediated by ISWI in *D. melanogaster* and the events of epigenetic memory reprogramming that occur in wings and legs larval tissues induced to regenerate. *In*

vivo assays highlighted that loss of *ISWI* induce a decrease in the ability of tissue to undergo transdetermination or to regenerate.

In order to identify on a genomic scale those genes that are regulated by *ISWI* during regeneration, I extracted chromatin from regenerating tissues. By the genome-wide ChIP-seq technique, I obtained a map of sites preferentially bound by *ISWI* remodeler during regeneration. In order to highlight differences in gene expression profiles between genotypic normal and heterozygous *ISWI* defective tissues during regeneration, I extracted the total RNA. By RNA sequencing I compared the transcriptomes of these regenerating tissues. Differentially expressed genes of transcriptomes were compared with those preferentially bound by *ISWI*, thus obtaining those genes that during regeneration are transcriptionally controlled by *ISWI*. My study has led to the identification of some genetic networks under the control of *ISWI* chromatin remodeler that are involved in regenerative events. These genes will be further validated by biochemistry and molecular assay in order to confirm their ability to modify the ability of tissue regeneration.

I am convinced that gaining a deep knowledge of the role of *ISWI* chromatin remodeler in the epigenetic memory reprogramming will be of critical importance in the development of biotechnological approaches aimed at the possibility to control tissue regeneration.