



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

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

TITOLO TESI (Italiano)

IL PROCESSO DI TRADUZIONE "Repeat-Associated Non-ATG" (RAN) IN
ALCUNE PATOLOGIE NEUROLOGICHE

TITOLO TESI (Inglese)

REPEAT-ASSOCIATED NON-ATG (RAN) TRANSLATION IN NEUROLOGICAL DISEASES

Tesi di Laurea di:
di:

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Sessione ESTIVA

Anno Accademico 2019/2020

COSA SONO LE «RAN»

❖ Il genoma umano contiene:

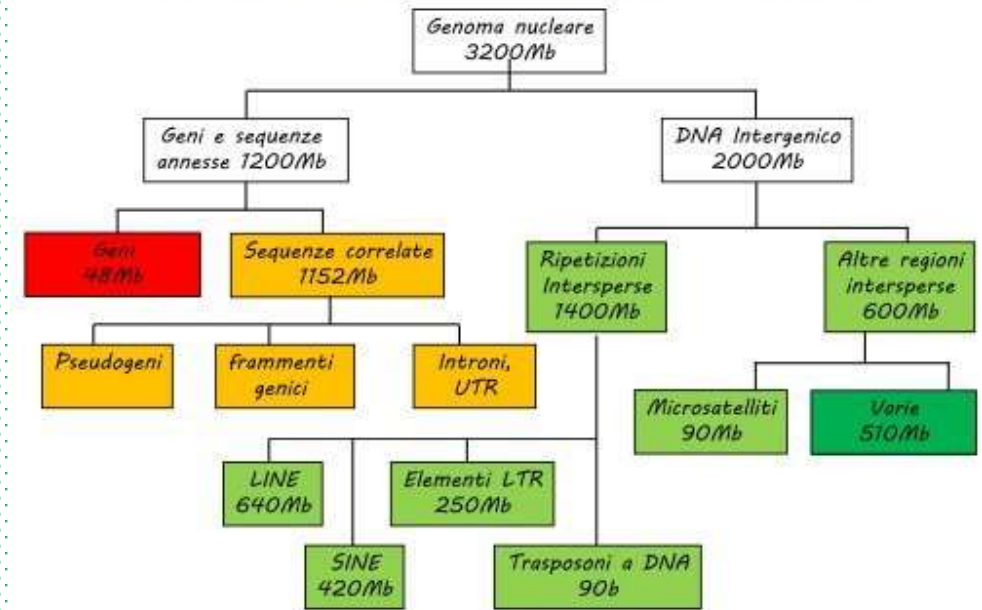
- sequenze uniche o quasi uniche
- sequenze ripetute in TANDEM o INTERSPERSE:

-DNA SATELLITE (altamente ripetuto)

- MICRO E MINISATELLITI (mediamente ripetuto)

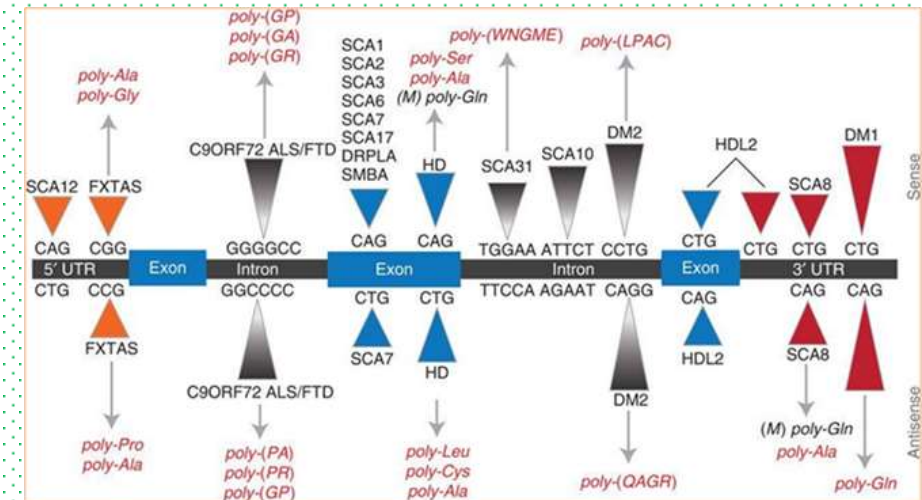
❖ **PATOLOGIE DA ESPANSIONI DI TRIPLETTE** sono causate da: espansioni di microsatelliti (trinucleotidi o tetranucleotidi) in particolari regioni del gene

Organizzazione del genoma umano



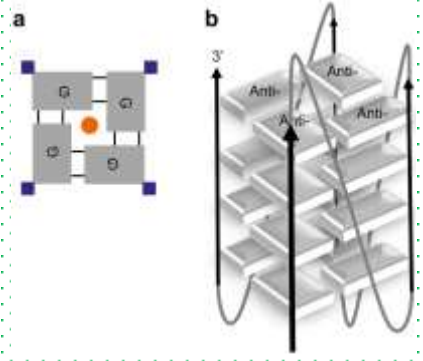
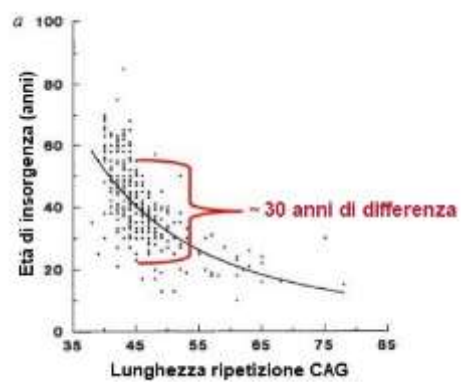
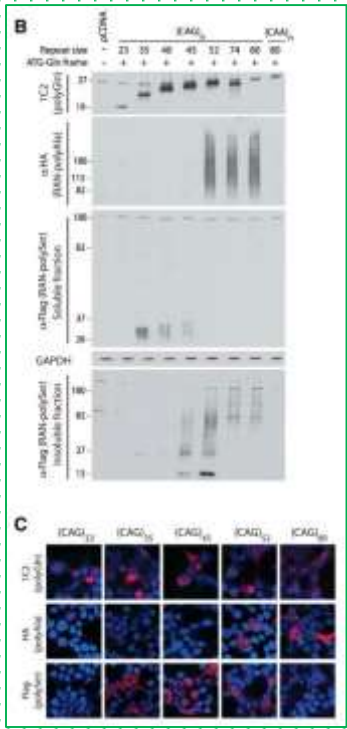
RAN(REPEAT ASSOCIATED NON-ATG) : particolari proteine sintetizzate a partire da tre frame di lettura e senza il codone di inizio AUG causate da una mutazione da espansione delle ripetizioni microsatelliti trascritte bidirezionalmente

- Le RAN contribuiscono all' insorgenza di molte malattie: sclerosi amiotrofica laterale /demenza frontotemporale causate entrambe dal gene C9ORF72 (ALS/FTD), sindrome x fragile /atassia (FXTAS), Malattia di Huntington (HD), atassia spinocerebellare di diversi tipi(SCA 8 e SCA 31), distrofia miotonim,ca di tipo 1 e 2 (DM1,DM2)



Caratteristiche dei satelliti e della traduzione RAN

- Le ripetizioni sono trascritte BIDIREZIONALMENTE : trascritti senso e antisense
- La loro traduzione dipende da:
 - lunghezza della ripetizione : SCA8, DM1, DM2, FXTAS, HD
 - strutture stabili secondarie:



**QUARTETTI DI G:
ESPANSIONE G4C2**

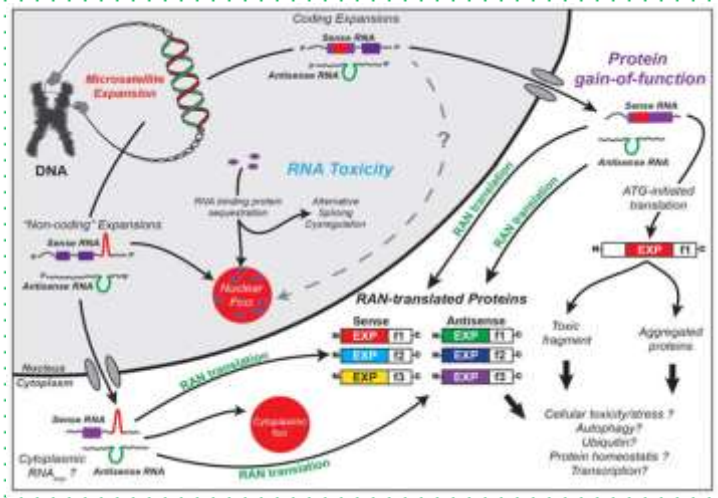
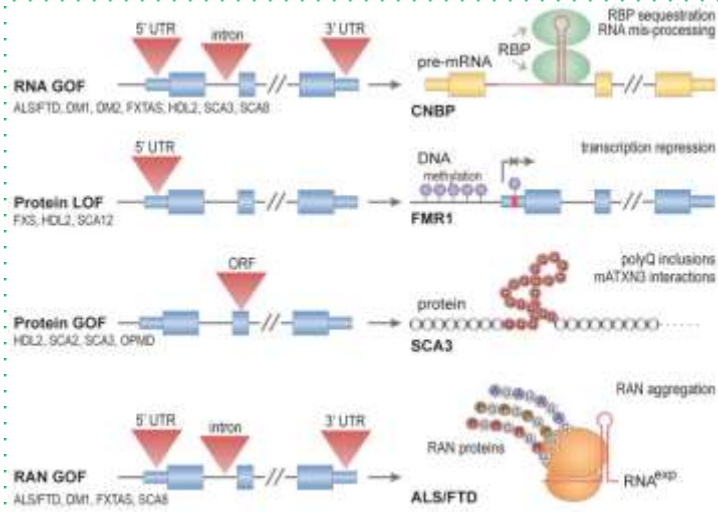


**FORCINA:
SCA8, DM1**

Ruolo della lunghezza delle ripetizioni nella malattia di Huntington

Meccanismi patologici

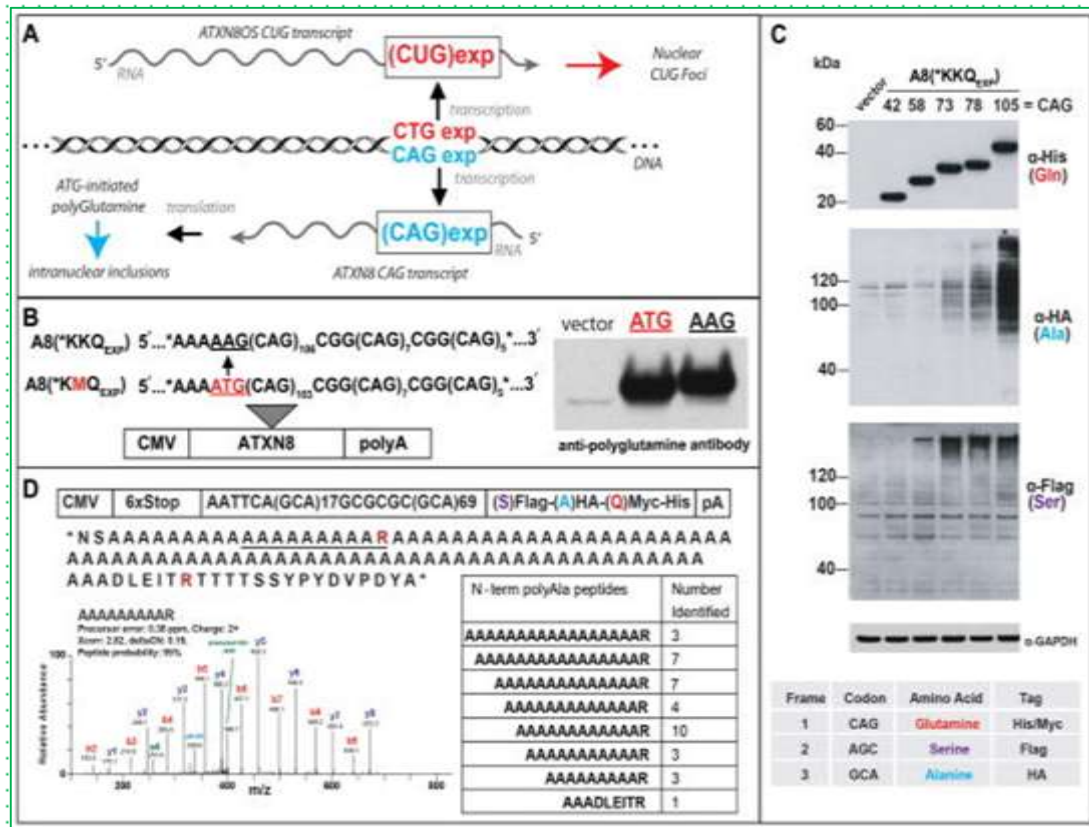
- GUADAGNO DI FUNZIONE
- PERDITA DI FUNZIONE
- RNA GAIN OF FUNCTION
- MECCANISMO DI TRADUZIONE RAN : neurodegenerazione nei sistemi modello



SCOPERTA: ATASSIA SPINOCEREBELLARE DI TIPO 8 (SCA8)

LA TRADUZIONE DELLE RAN FU SCOPERTA NELL' ATASSIA CEREBELLARE DI TIPO 8 (SCA8) E NELLA DISTROFIA MIOTONICA (DM1) NEL 2006 DA MOSELEY E IL SUO GRUPPO DI RICERCA

PATOLOGIA	NUCLEOTIDI RIPETUTI ESPANSI	GENI	REGIONE	NUMERO DI RIPETIZIONI	SINTOMI
SCA8	CTG•CAG	ATXN80S/ATX8	3' UTR	16-37 110-250	Nistagmo, attacchi di vertigini , mancanza di equilibrio



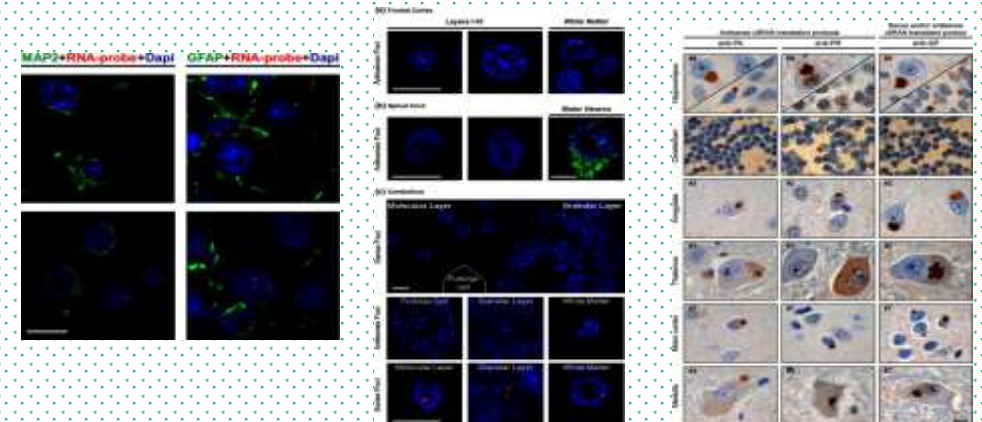
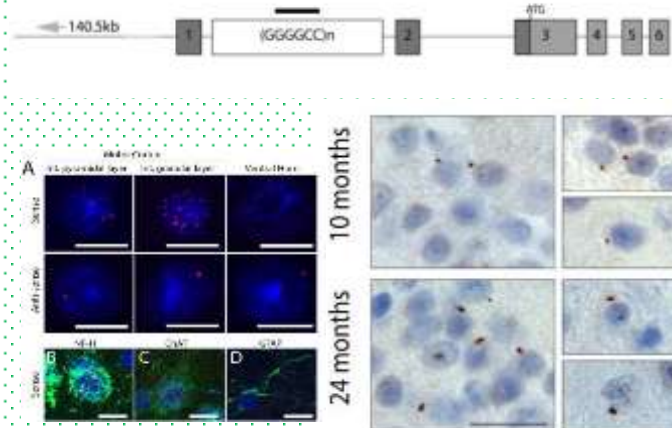
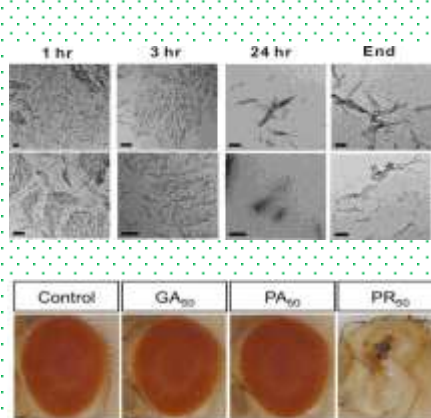
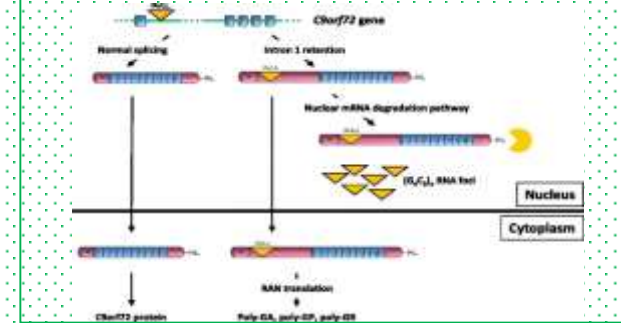
- ❖ ATXN80S CUG: forma un focolaio di RNA : GUADAGNO DI FUNZIONE DEGLI RNA (**RNA GOF**)
- ❖ ATX8 CAG: produce una polyGln
- ❖ Gli RNA con nucleotidi ripetuti CUG e CAG subiscono una nuova forma di traduzione che porta alla produzione di proteine OMOPOLIMERICHE (poli-Gln, poli-Ala, poli-Ser da CAG, poli-Leu, poli-Ala, poli-Cys da CUG) a partire da ORF che non presentavano un codone d' inizio AUG
- ❖ Le proteine RAN previste dagli esperimenti di coltura si accumulano in vivo nei tessuti umani :
 - SCA8 : polyAla nelle cellule del Purkinjje
 - DM1: polyGln nel muscolo scheletrico, nel cuore , nel sangue
- ❖ RIPETIZIONI LUNGHE AGGRAVANO LA MALATTIA

SCLELOROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA) E DEMENZA FRONTOTEMPORALE (FTD).

PATOLOGIA	NUCLEOTIDI RIPETUTI ESPANSI	GENI	REGIONE	SINTOMI
SLA/FTD	ESANUCLEOTIDE GGGGCC	C9ORF72 (cromosoma 9 orf72)	INTRONE 1	Sintomi psichiatrici associati alla demenza, difficoltà mnemoniche, deterioramento intellettuale, disturbi emotivi ecc..

- ❖ I trascritti con l'espansione possono:
 - formare focolai di RNA nel nucleo (**RNA GDF**) o
 - entrare nel citoplasma ed essere tradotti in proteine C9-RAN
- ❖ Le C9-RAN :
 - Presentano motivi ripetuti a seconda della direzione della trascrizione :
 - Sono caratteristiche solo di questa malattia
 - Presentano estremità carbossiliche che si estendono oltre il tratto ripetuto
 - Sono proteine tossiche e si accumulano come **AGGREGATI CITOPLASMATICI** in varie regioni del cervello:
- ❖ Effettuati numerosi studi sulla tossicità delle proteine RAN

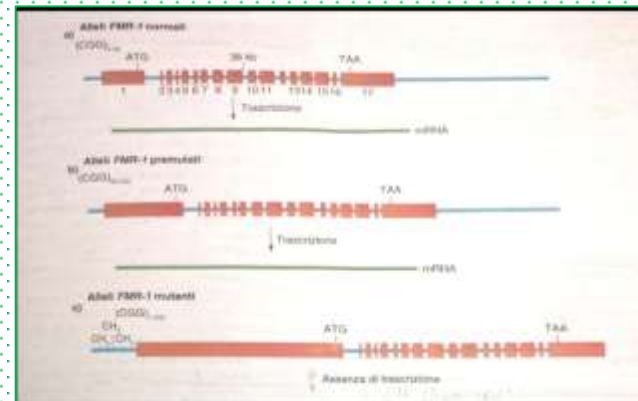
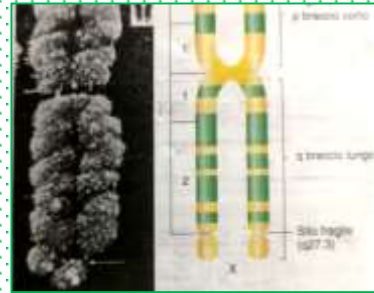
• MODELLO DI ELABORAZIONE ESTESA DELLE TRASCRIZIONI C9ORF72 CHE SPIEGA LE PRINCIPALI CARATTERISTICHE PATOLOGICHE DI QUESTE MALATTIE.



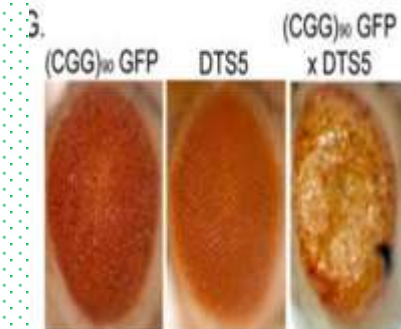
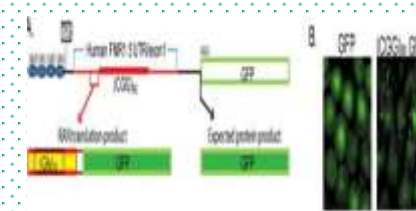
SINDROME DELL' ATASSIA ASSOCIATA ALL' X (FXTAS) E SINDROME DELL' X FRAGILE

PATOLOGIA	NUCLEOTIDI RIPETUTI ESPANSI	GENI	REGIONE	NUMERO DI RIPETIZIONI	SINTOMI
FXTAS X FRAGILE	CGG•GCC	GENE FMR1 (CROMOSOMA X)	5'UTR	Normali: 29 ripetizioni 55-200: PREMUTAZIONE(FXTAS) 200-1300 COPIE : MUTAZIONE COMPLESSA (X FRAGILE)	X FRAGILE: Forma più comune di ritardo mentale dopo la sindrome di Down FXTAS: tremore intenzionale, atassia cerebellare progressiva nella deambulazione, declino cognitivo ecc..

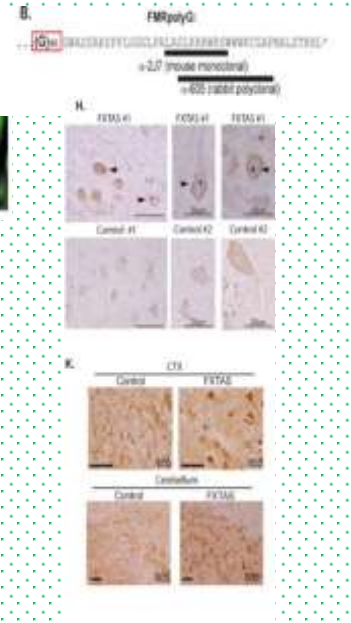
- ❖ Presenza di siti fragili sul cromosoma X
- ❖ Il gene FMR1 codifica per la **FMRP** attiva nelle sinapsi cerebrali (funzionalità di connessione tra neuroni)
- ❖ Il silenziamento del gene (metilazione delle citosine) : **PERDITA DI FUNZIONE DELLA PROTEINA (LOF) - > SINDROME X FRAGILE**
- ❖ Elevata espressione di m-RNA FMR1 -> **FXTAS**
- ❖ **Modello Drosophila:** aggregati positivi alla GFP
- ❖ **Cellule di mammifero: FMRpolyG**
Individuata nei tessuti tramite l' utilizzo di anticorpi
- ❖ Altre proteine OMOPOLIMERICHE : **polyPro, polyAla, polyArg**



Drosophila:

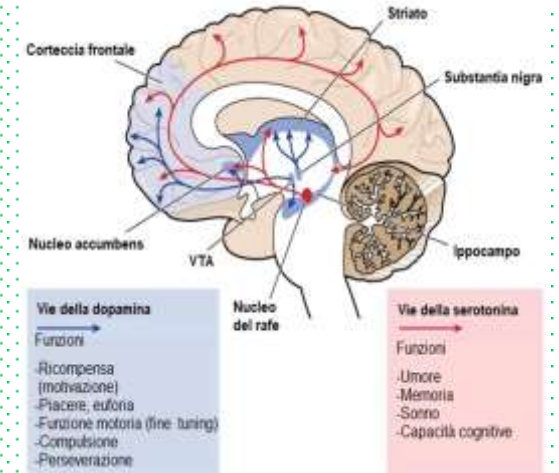


Mammifero



MALATTIA DI HUNTINGTON (HD)

PATOLOGIA	NUCLEOTIDI RIPETUTI ESPANSI	GENI	NUMERO DI RIPETIZIONI	SINTOMI
HD	CAG•CTG	« Huntington» (HTT) –gene essenziale-	9-36 > 37	Progressivo deterioramento fisico, cognitivo e psichiatrico che alla fine risulta fatale



❖ Fu descritta per la prima volta dal medico *George Huntington* nel 1872

❖ La proteina HUNTINGTINA neo-prodotta presenta un tratto di glutammina in più (**polyGln**): **GUADAGNO DI FUNZIONE**

❖ *Caratteristiche patologiche:*

▪ Presenza di aggregati nel **cervello**, **cervelletto** e **corteccia frontale**

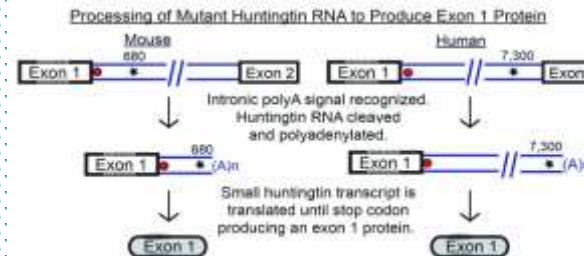
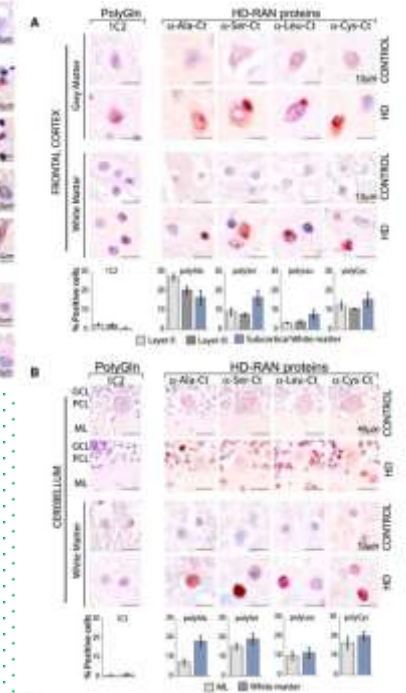
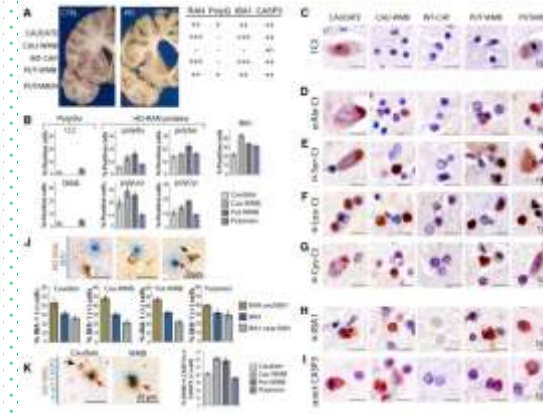
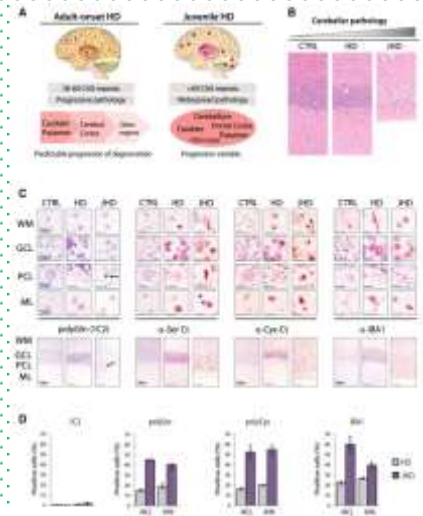
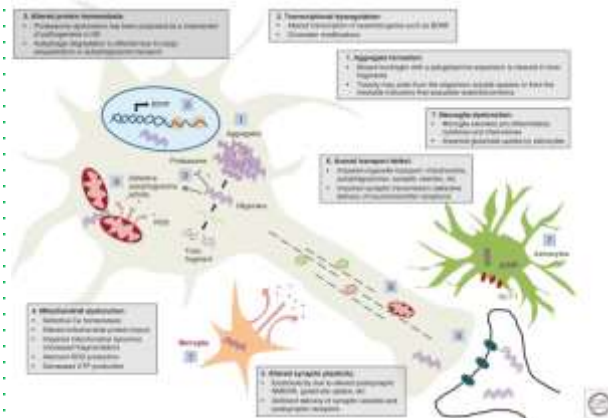
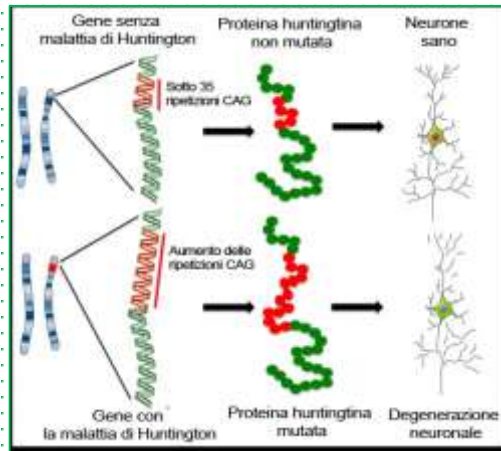
▪ I tessuti colpiti mostrano tutti **neuroinfiammazione** e **apoptosi**

▪ Formazione del frammento N-terminale (**errato splicing**)

▪ Alcune sono legate alle funzioni della proteina stessa (**fattore di trascrizione**, **impalcatura proteica**)

▪ **Alterazione omeostasi proteica**, **alterazione funzioni mitocondriali**, **gliosi ecc..**

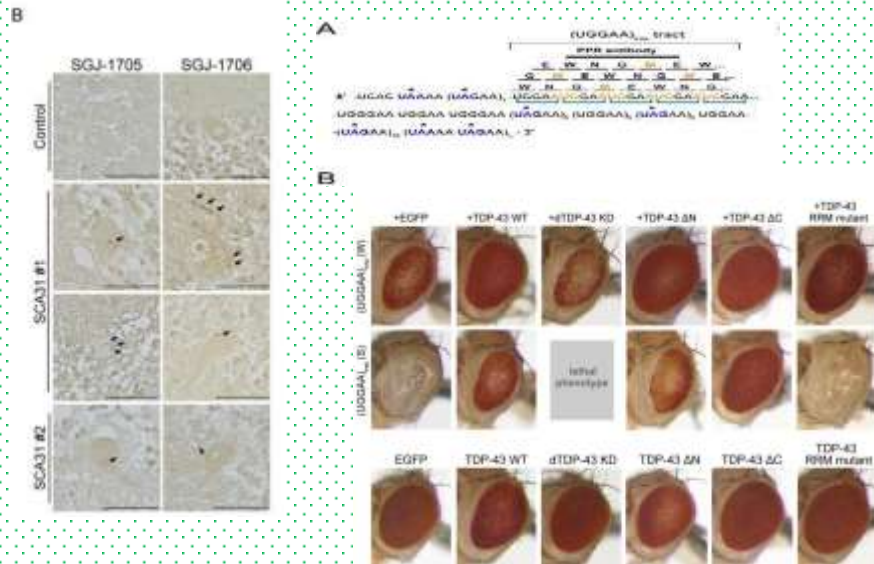
▪ Una ripetizione più lunga causa un maggior accumulo di proteine RAN e l' **esordio giovanile** della malattia (**corteccia frontale** e **cervelletto**)



TRADUZIONE RAN NEI DISORDINI DA ESPANSIONE DI TETRA- E PENTANUCLEOTIDI

• ATASSIA SPINOCEREBELLARE DI TIPO 31 (SCA31)

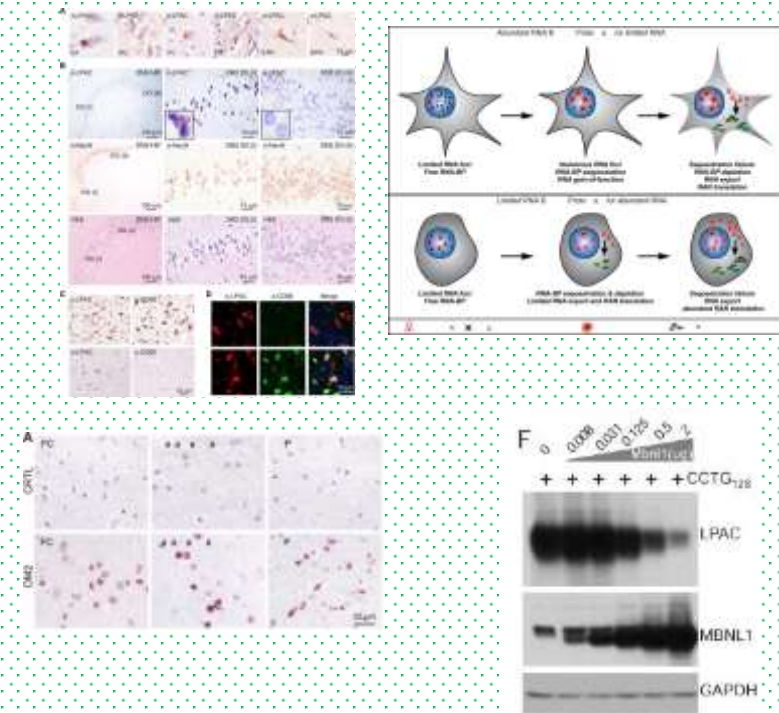
- ❖ È la forma di atassia più comune in Giappone
- ❖ Il segno patologico più evidenti è la formazione di focolai di RNA: **RNA GAIN OF FUNCTION (RNA GOF)**
- ❖ Tali RNA possono essere tradotti in una proteina che presentano un motivo PENTAPEPTIDICO ripetuto : **PPR**
- ❖ La proteina è stata rilevata sia in un modello di *Drosophila* ma anche in cellule nervose umane (**corpi cellulari, dendriti, cellule del Purkinje**)
- ❖ In *Drosophila* alcune RBP sembrano giocare un ruolo nella regolazione di questi RNA (EX: TDP43)



PATOLOGIA	NUCLEOTIDI RIPETUTI ESPANSI	GENI	REGIONE	NUMERO DI RIPETIZIONI	SINTOMI
SCA31	PENTANUCLEOTIDI	BEAN1 TK2	INTRONE		Atassia , disartria, nistagmo orizzontale
DM1	CTG•CAG	DMPK	3' UTR	5-37 50-3000	In entrambe le malattie sono stati riscontrati effetti simili su vari sistemi di organi : muscolo scheletrico , cuore, occhi, sistemi riproduttivo endocrino ma differiscono per i loro effetti sul cervello
DM2	CCTG•CAGG	CNBP		10-2675- 11000	

DISTROFIA MIOTONICA (DM1 E DM2)

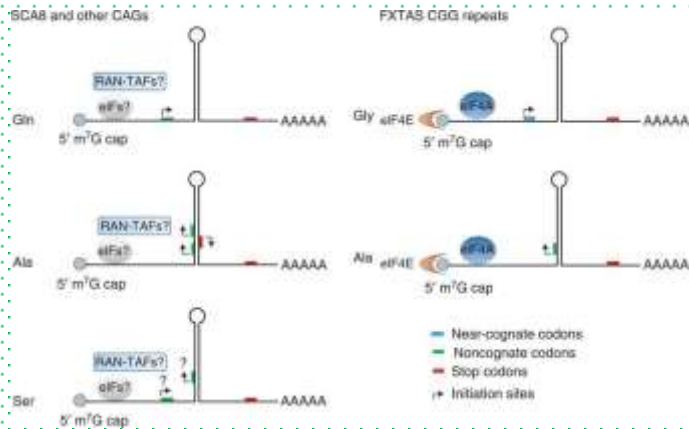
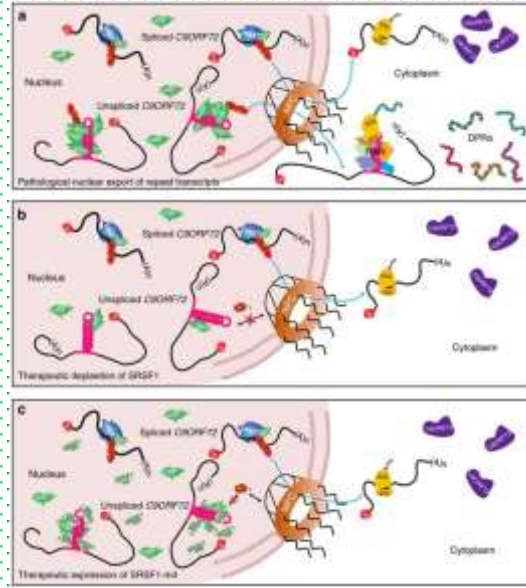
- ❖ La patogenesi delle DM coinvolge:
 - **Meccanismi di guadagno di funzione dell' RNA (RNA GOF)** : perdita o guadagno di funzione di una proteina
 - **Alterazione di modelli di splicing fetale nei tessuti adulti**
 - **Accumulo di proteine tossiche** : polyGln nel t. muscolare scheletrico, cuore, sangue (DM1); **TETRAPEPTIDI DI ESPANSIONE (LPAC e QAGR)** in DM2
- ❖ L'accumulo nei tessuti aumenta in base alla **LUNGHEZZA DELLE RIPETIZIONI** (relazione inversa tra i livelli nucleari di MBLN1 e l'espressione delle proteine RAN-LPAC);
- ❖ **MODELLO GENERALE DI SEQUESTRO DEGLI RNA DI ESPANSIONE** : meccanismi RNA GOF e traduzione RAN sono legati



MECCANISMO DI TRASPORTO NEL CITOPLASMA DEGLI RNA ESPANSI E TRADUZIONE NELLE PROTEINE «RAN»

❖ Trasporto nel citoplasma è favorito :

- dall' incremento del legame dell' espansione della ripetizione G4C2 all' ADATTATORE NUCLEARE DA ESPORTO (**SRSF1**):**via del recettore NXF1**
- dal processo di RITENZIONE DEGLI INTRONI (ex: SLA/FTD: ritenzione dell' introne 1)
- dalla compromissione del funzionamento del complesso dei PORI NUCLEARI (**NPC**) che regola il trasporto **nucleocitoplasmatico** (ex: *mutazione delle nucleoporine, SLA/FTD*)



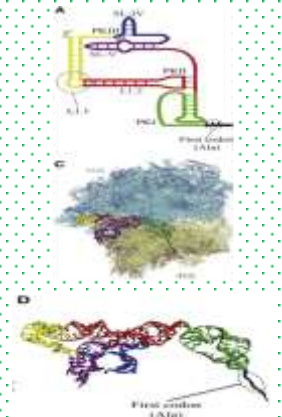
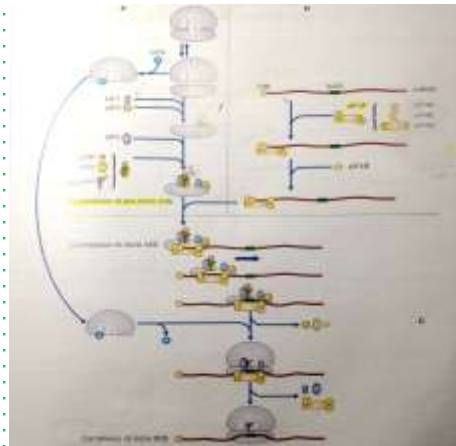
❖ Inizio della traduzione mediante:

▪ meccanismo **CANONICO** o **meccanismo CAP- DIPENDENTE**

ex: FXTAS nel frame di lettura poliGly:

- presenta un codone d'inizio affine ACG a monte della ripetizione
- l' amminoacido aminoterminale è rappresentato da una metionina nei mammiferi
- È indipendente dalla lunghezza della ripetizione
- Necessita del **cap m7G**, di fattori di inizio della trascrizione e dello **scanning del ribosoma 40S** : **CARICAMENTO COMPLESSO PRE-INIZIO e SCANNER RIBOSOMIALE**
- Meccanismo non canonico simile a **IRES** rilevato anche nei virus (CrPV)

Ex: SCA8 e altre espansioni CAG



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

ULTERIORI STUDI SARANNO NECESSARI PER :

1. DEFINIRE L'INIZIO E LA FINE DI QUESTE PROTEINE

2. APPROFONDIRE I FATTORI MOLECOLARI DELLA
TRADUZIONE RAN

3. CAPIRE IL RUOLO DI UNA PROTEINA RAN NELLA MALATTIA

RIASSUNTO ESTESO

Alcune malattie neurologiche possono essere causate da espansioni di microsatelliti (trinucleotidi o tetranucleotidi) in particolari regioni del gene. Queste espansioni del DNA possono essere trascritte in RNA tossici che formano focolai di RNA nel nucleo e sequestrano le proteine leganti l' RNA (come le MBLN) causando tossicità cellulare e l' insorgenza di una determinata malattia. Esempi di questo primo meccanismo patologico – **RNA GAIN OF FUNCTION**- sono le *atassie spinocerebellari (8,31)*, *le distrofie miotoniche*, *la SLA/FTD e FXTAS*. Altri disturbi sono generati a seconda se l' espansione è presente in una regione codificante o non codificante: nel primo caso si ottiene una proteina che ha subito un **guadagno di funzione** che va a interferire con i normali processi cellulari (HD) ; nel secondo caso la proteina tradotta subisce una **perdita di funzione** (sindrome X fragile). Gli RNA espansi possono entrare nel citoplasma –mediante diversi meccanismi- e subire una nuova forma di traduzione «**RAN**» scoperta nel 2006, che non richiede un codone d'inizio AUG (**REPEAT ASSOCIATED NON-ATG**) e che è stata individuata per la prima volta nella SCA8 e nella DM1. Questa nuova forma di traduzione dipende dalla lunghezza dell' espansione ripetuta, dalla presenza di strutture secondarie e a seconda della malattia, può avvenire sia attraverso un meccanismo cap-dipendente sia mediante meccanismi simili a quelli incontrati nei virus (IRES). L' accumulo di proteine RAN, rilevate nel corso di numerosi studi ,nei tessuti del SNC dei pazienti malati hanno rilevato la tossicità di queste proteine che nell' uomo in particolare causano tutta questa serie di disturbi neurodegenerativi. Nonostante siano stati fatti passi enormi dalla loro scoperta, saranno ancora molti i meccanismi da comprendere sia per cercare una patologia comune a tutta questa serie di disturbi, sia per aprire la strada a nuovi campi di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- Repeat-Associated Non-ATG Translation in Neurological Diseases Tao Zu1,2, Amrutha Pattamatta1,2, and Laura P.W. Ranum1,2,3,4 1Center for Neuro-Genetics, University of Florida, Gainesville, Florida 32610; 2Departments of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, Florida 32610
- Sequenze ripetute nei genomi eucariotici : pag. 110-111-112; definizione microsatelliti : pag. 114-115-116 ;quartetti di G: FIG, 2,24 A,B struttura FORGINE: 2,27 ; traduzione canonica/non canonica : fig. 15,7 pag. 405 e 15,8 pag 407 (LIBRO « BIOLOGIA MOLECOLARE « AMALDI TERZA EDIZIONE)
- Definizione mutazione dinamica; pag.131 ; definizione microsatelliti : pag. 248 ; meccanismi molecolari sindrome X fragile e FXTAS : 131,132,331. IMMAGINE 7.17 PAG 133,330,331,417 A (LIBRO «GENETICA UN APPROCCIO MOLECOLARE» QUARTA EDIZIONE)
- Conseguenze cellulari delle ripetute microsatelliti espanse e della traduzione non ATG (RAN) associata alla ripetizione : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC35951168/figure/F1/>
- Cleary JD, Ranum LP. Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders. Curr Opin Genet Dev. 2014;26:6-15. doi:10.1016/j.gde.2014.03.002
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940602/>
- <https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fwww.ehdn.org%2F1%2Fabout-hd%2F&psig=AOvVaw0s98QHAv-2abYse3wUjM&ust=1593439987860000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxaFwoTCkDo1NjYpOoCFQAAAAAAdAAAAABBS>
- <http://www.ehdn.org/it/about-hd/>
- <https://www.omim.org/entry/143100#pathogenesis>
- <https://www.omim.org/entry/300623#molecularGenetics>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4483269/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4483269/>
- SINTOMI Sca8:https://it.wikipedia.org/wiki/Atassia_spinocerebellare#definizione_di_atassia: <https://www.atassia.it/atassie/>
- Ftd: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=IT&Expert=275872
- Fxtas: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=IT&Expert=93256
- Disartria definizione: <https://www.humanitas.it/sintomi/disartria>
- Atassia 31: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=IT&data_id=18808&MISSING%20CONTENT=Spinocerebellar_ataxia_type_31&search=Disease_Search_Simple&title=Spinocerebellar%20ataxia%20type%2031
- https://it.wikipedia.org/wiki/DNA_non_codificante
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301445/>
- Ayhan F, Ikeda Y, Dalton JC, Day JW, Ranum LPW. Spinocerebellar Ataxia Type 8. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993
- Daughters RS, Tuttle DL, Gao W, et al. RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. PLoS Genet. 2009;5(8):e1000600. doi:10.1371/journal.pgen.1000600
- Cleary JD, Ranum LP. Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders. Curr Opin Genet Dev. 2014;26:6-15. doi:10.1016/j.gde.2014.03.002
- Niblock M, Smith BN, Lee YB, et al. Retention of hexanucleotide repeat-containing intron in C9orf72 mRNA: implications for the pathogenesis of ALS/FTD. Acta Neuropathol Commun. 2016;4:18. Published 2016 Feb 25. doi:10.1186/s40478-016-0289-4
- Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, et al. Antisense transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. Acta Neuropathol. 2013;126(6):829-844. doi:10.1007/s00401-013-1192-8
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3831531/figure/F1/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3907474/figure/F2/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527825/figure/f1/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777828/figure/F3/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632245/figure/F6/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017093/figure/figure1/>
- <http://www.fondazionemalattiemiotoniche.org/la-ran-translation-un-meccanismo-nella-dm2/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951173/figure/F6/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5504286/figure/f9/>