



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**  
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Docente Referente  
Chiar.ma Proff.ssa

Anna La Teana

**UPSTREAM OPEN READING FRAMES:  
NEW PLAYERS IN THE LANDSCAPE OF  
CANCER GENE REGULATION**

Tesi di Laurea di:

**UPSTREAM OPEN READING FRAMES:  
NUOVI ATTORI NEL PANORAMA DELLA  
REGOLAZIONE GENICA DEL CANCRO**

Plaku Mattia

A.A 2023/2024

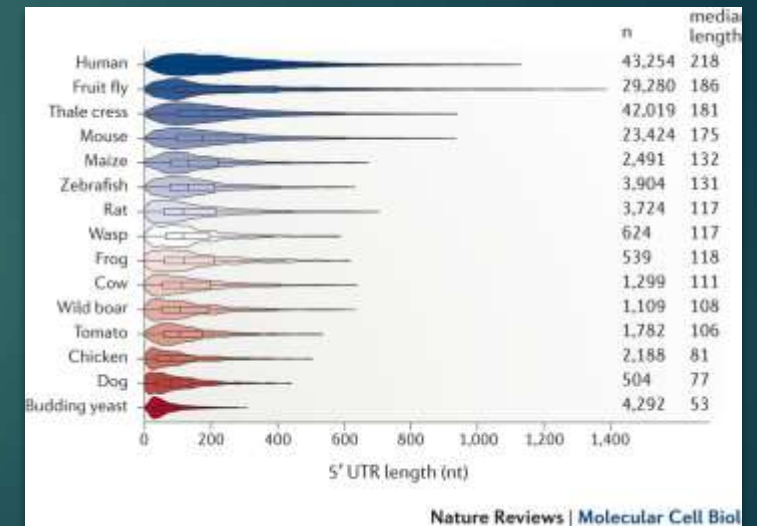
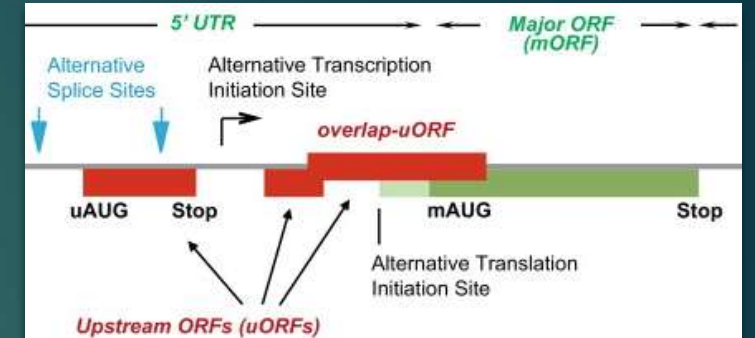
SESSIONE : AUTUNNALE OTTOBRE 2024

# INTRODUZIONE

Il cancro è caratterizzato da una proliferazione incontrollata di cellule con un'invasione dei tessuti circostanti e metastasi negli organi distanti. Questo set di comportamenti richiede una grande manipolazione dei meccanismi di replicazione e metabolici della cellula, uno dei processi fondamentali è la «mRNA translation». E' un argomento ampiamente approfondito nel corso degli anni specialmente la correlazione con la tumorigenesi, ma nuove ricerche verso il mondo delle *upstream open reading frames* (uORFs) dimostrano come questi piccoli fattori ignorato possano essere al centro di meccanismi di regolazioni per la lotta contro il cancro.

# uORFs: agenti regolatori largamente ignorati

- ▶ Gli uORFs sono una classe di elementi cis regolatori presenti a monte della sequenza codificante altamente conservati, caratterizzati da corte sequenze all'interno della regione 5'UTR presente negli mRNA.
- ▶ Gli uORF sono correlati a livelli ridotti di espressione proteica poiché riducono l'efficienza dell'inizio della traduzione dell'ORF principale a valle (CDS). Tuttavia, in risposta allo stress cellulare, la presenza di uORF può promuovere l'aumento dell'espressione di alcuni mRNA legati allo stress (stress-related mRNA)
- ▶ 49% del trascrittoma umano contiene almeno un uORF
- ▶ Gli uORF sono correlati in geni oncogeni



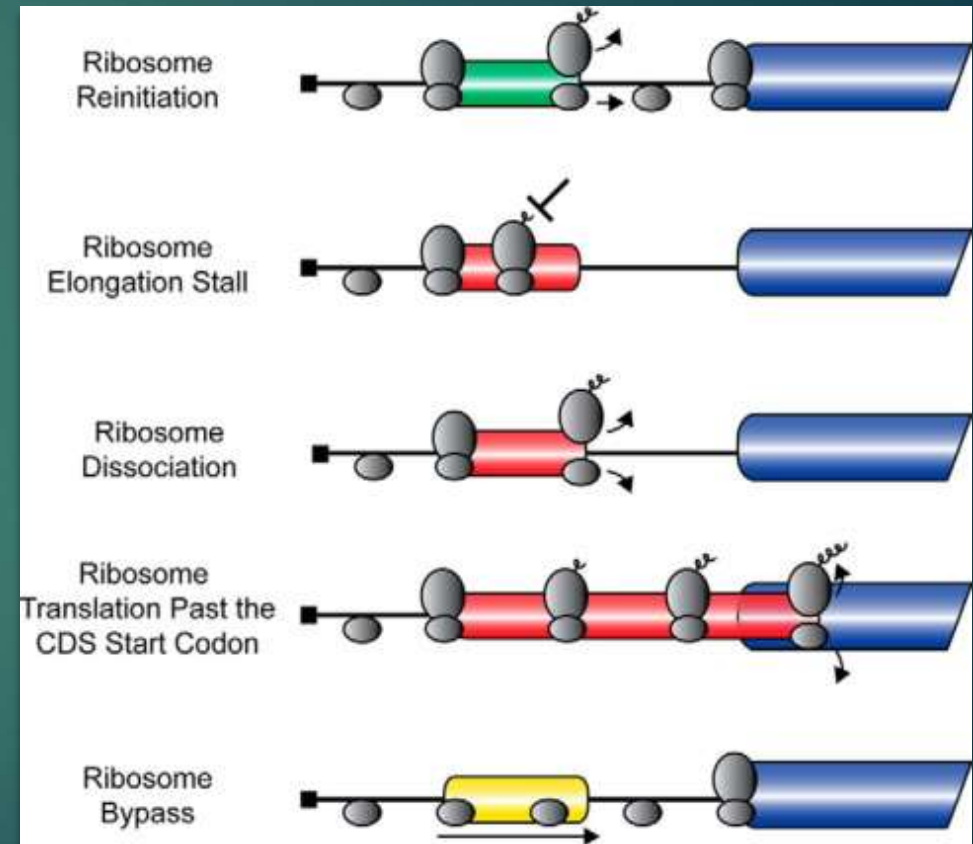
# Possibili interazioni tra uORF e RIBOSOMA

► Le interazioni tra uORF e ribosomi durante lo SCANNING vanno ad determinare il possibile effetto inibitorio delle uORF:

- LEAKY SCANNING
- REINITIATION
- STALLING
- PREEIMPTIVE REINITIATION

Non tutti gli uORF vengono tradotti, sono state scoperte diverse caratteristiche per una traduzione selettiva:

- I. Forte consenso uAUG
- II. Conservazione evolutiva
- III. Maggiore distanza dal cap
- IV. Presenza di molteplici uORF nella regione 5'



# LE MICROPROTEINE: mini-regolatori biologici

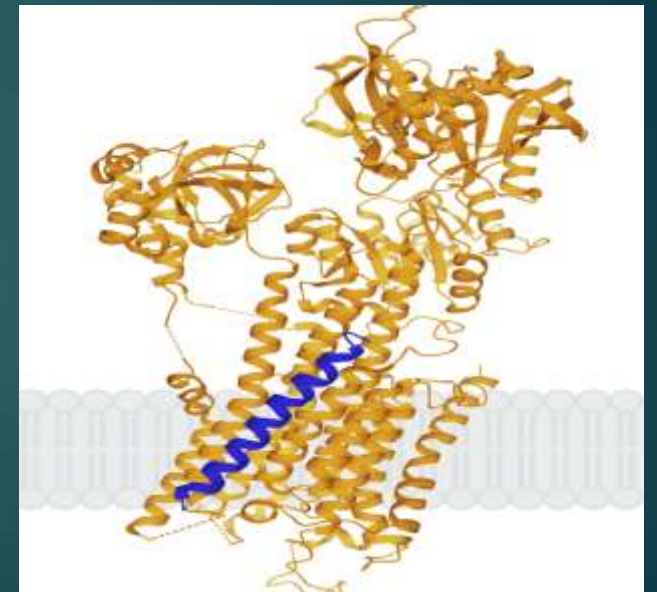
Oltre al ruolo regolativo della traduzione, le uORFs traducono le cosiddette «**microproteine**» (o micropeptidi) → >130 A.A.

## 1. **Microproteine VS “piccole proteine” (i peptidi):**

Le microproteine mature vs il prodotto di controlli post-traduzionali

## 2. **Mancanza di sequenza segnale N-terminale**

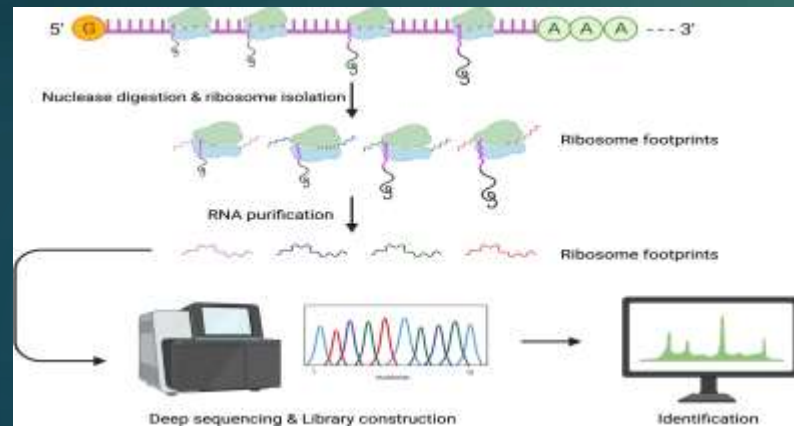
## 3. **PEPTOINTERRUTTORI:** Inibizione della sequenza a valle bloccando i ribosomi tramite piccole proteine



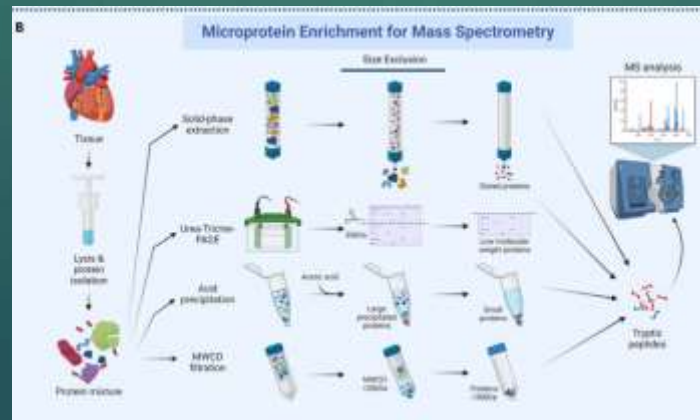
MICROPROTEINA PHOSPHOLEMMAN E  
POMPA DEL CALCIO SERCA

# TECNICHE PER IDENTIFICARE POTENZIALI MICROPROTEINE

## 1) RIBOSOME PROFILING (Ribo-Seq)



## 2) SPETTROMETRIA DI MASSA



## 3) TOOLS E DATABASE BIOINFORMATICI

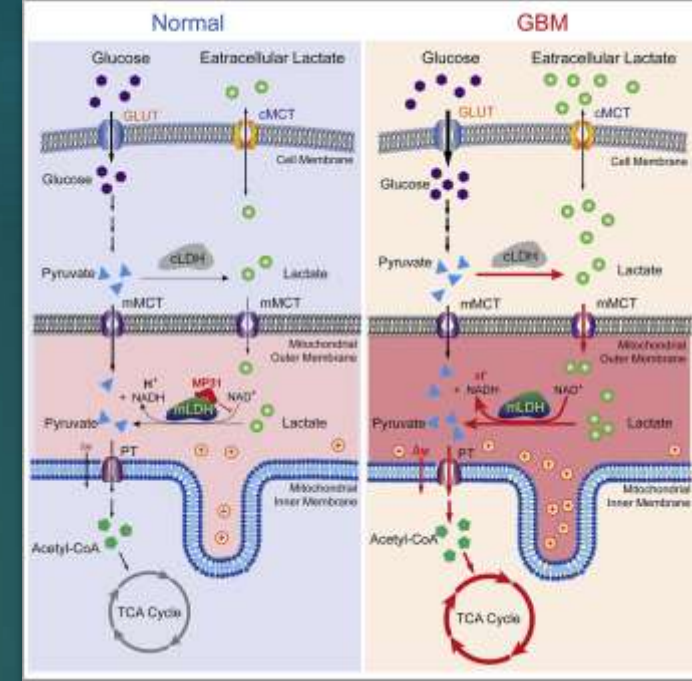
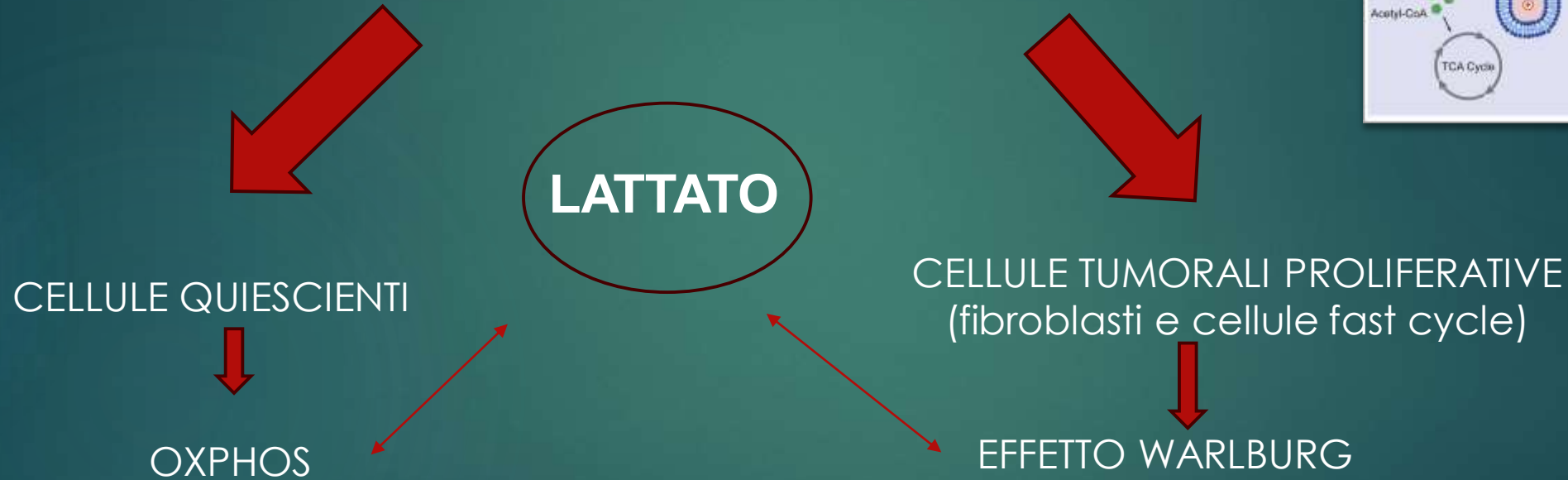
Table 1 Publicly available bioinformatic tools and databases

Bioinformatic tools and databases	Description	Reference
PhyloCSF	PhyloCSF analyzes and scores codon substitution frequencies across multiple mammalian species and applies phylogenetic models to identify conserved patterns of AA codons.	Lin et al. <sup>23</sup>
sORF.org	This is a public repository for sORFs that were identified using ribosome profiling and it incorporates the sORF Blast tool that looks at sequence similarities between species as well as MS data with their predictions.	Chiriac et al. <sup>24</sup>
MPeptide	The algorithm for MicroPeptide Identifier (MPeptide) uses machine learning from microprotein datasets rather than canonical proteins to identify microproteins from DNA sequences.	Zhu et al. <sup>25</sup>
smORFLocator	This tool is designed to predict the function and localization of sORF-encoded microproteins from nucleotide or AA sequences, or input human genome coordinates. This tool uses a nearest neighbor algorithm approach to predict their function.	Ji et al. <sup>21</sup>
iPEPperoni	This is a tool that uses sequence conservation techniques to detect ORFs in the 5' UTR regions of mRNAs. iPEPperoni incorporates substitution frequency scores and heatmaps that allow for visualization of conserved regions of an mRNA molecule.	Skarshewski et al. <sup>22</sup>
ORFPrimer	This MS-based proteomics tool uses polyclonal models for eukaryotes that allows the detection of multiple ORFs.	Sturek et al. <sup>26</sup>
SPADA	Small Peptide Alignment Discovery Application (SPADA) uses homology to predict plant microproteins-coding genes in a region of interest by analyzing its sequence and staging information from other gene families.	Zhou et al. <sup>20</sup>

# MICROPROTEINE CONTRO IL CANCRO

«Il particolare caso della microproteina MP31»

GLIOBLASTOMA: TUMORE ETEROGENEO



►MP31, microproteina regolatrice nei processi regolatori di cellule tumorali, glioblastoma

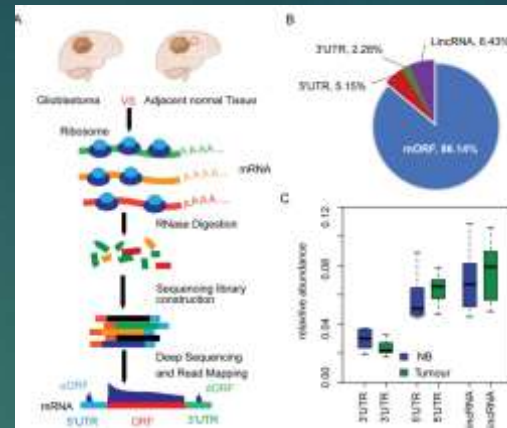
# 1) RIBOSOME PROFILING di 10 campioni di GBM e NB

«RIBOSOME PROTECTED FRAGMENTS» (RPF)

94,85%

5,15%

REGIONI 5'UTR



# 2) IDENTIFICAZIONE DI ORF non canonici attivamente tradotti

- Tramite «ribosome release score RRS» e «modified ORF scores»



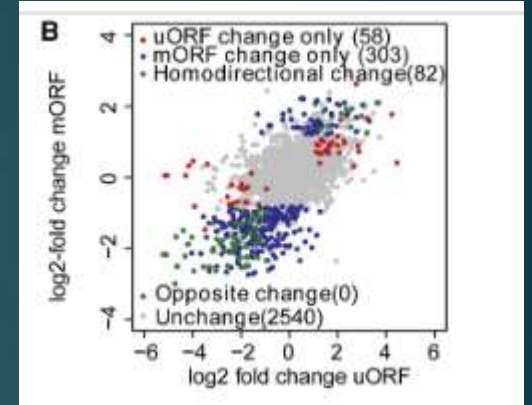
18 uORF espressi differemente

uORF putativo → PTEN\_31AA, localizzato nella regione 5'UTR del PTEN (-122 a -217)

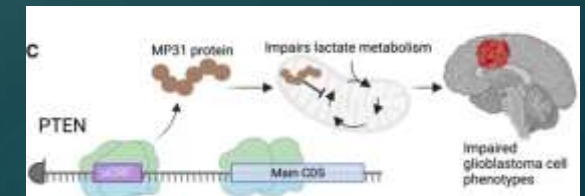


**MP31**

DIRETTA CORRELAZIONE TRA uORF ed mORF tramite volcano plot  $r^2 = 0.59$



**MP31 e PTEN sono spesso co-espressi e co-regolati in tessuti di GBM**





# MP31: MICROPROTEINA REGOLATRICE LOCALIZZATA NEL MITOCONDRIO

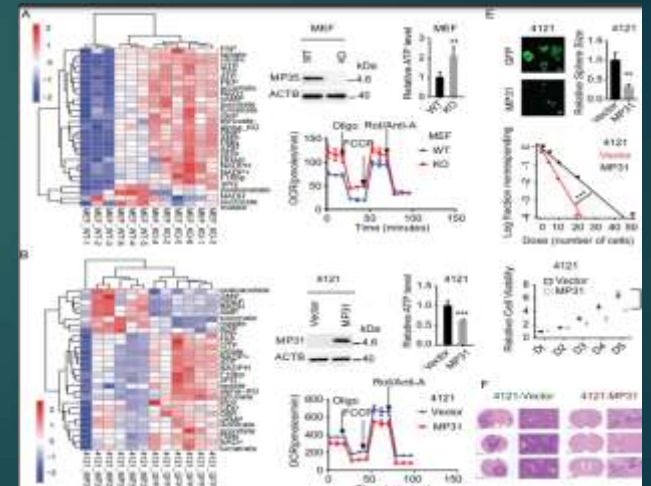
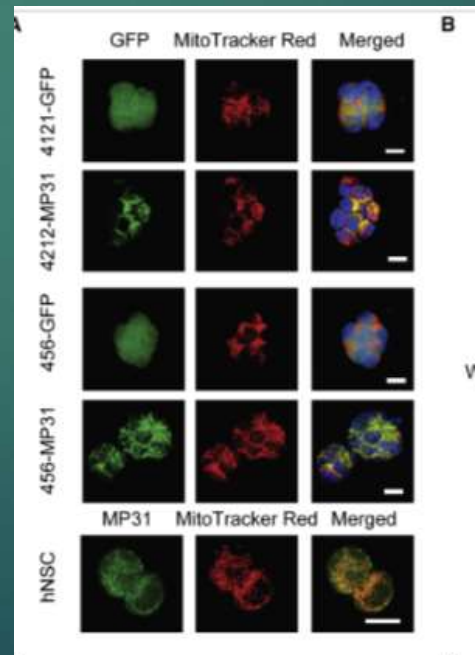
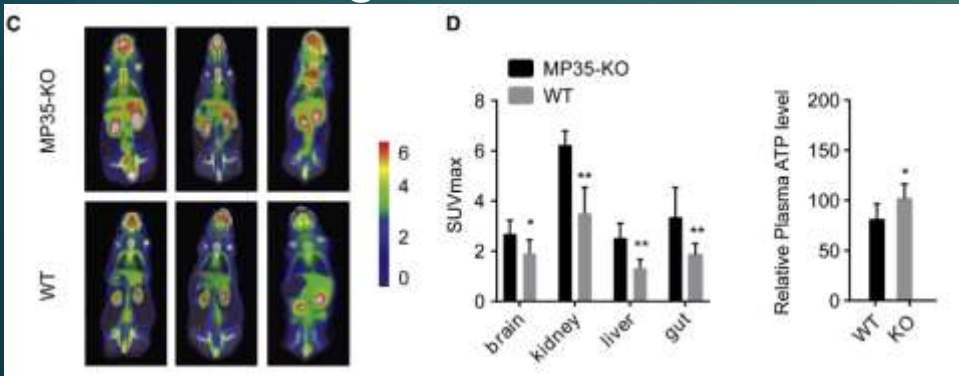
## MEF<sup>KO</sup> VS MEF<sup>WT</sup>

1. AUMENTO RESPIRAZIONE MITOCONDRIALE
2. AUMENTO METABOLITI TCA
3. AUMENTO LVL ATP

► In una linea cellulare 293T è stato osservato tramite immunoblotting come MP31 era effettivamente tradotta e che l'espressione proteica di MP31 era downregolata in GBM rispetto a cellule neurali normali ed astrociti umani.

► Esperimenti di frazionamento mitocondriale hanno dimostrato la localizzazione del MP31 all'interno della matrice mitocondriale.

### MP-35=Omologo murino del MP31



HEATMAP DI METABOLITI NEL METABOLISMO GLICOLICO; MEFWT VS MEFKO

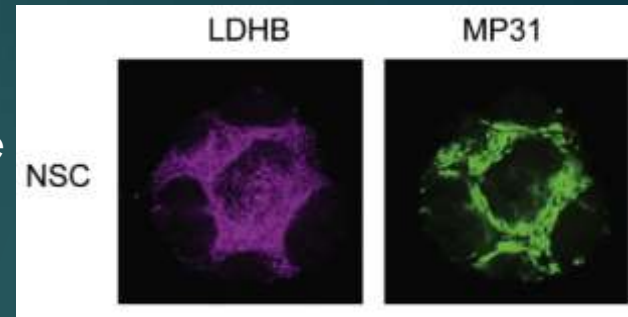
# MP31 INIBISCE LA PRODUZIONE DI LATTATO INTRACELLULARE: INTERAZIONE CON mLDH

► Ricercare le possibili interazioni tramite immunoblotting (IB)



## LDH/MP31 INTERACTION

- Co-localizzazione cellulare



► Docking molecolare tramite simulazioni

1. Ponti salini
2. Legami idrogeno

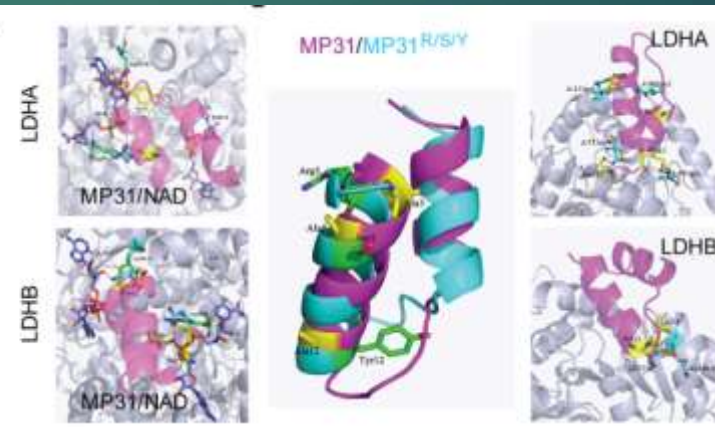
### DOCKING MOLECOLARE

The contact list between the peptide and LDHA

The residue in MP31	The residues in LDHA	
Ser5OG	Arg98: BNH1	NAD binding site
Tyr12O	Lys56: ANZ	NAD binding site

The contact list between the peptide and LDHB

The residue in MP31	The residues in LDHB	
Ser5O	Arg99: A.NH1/NH2	NAD binding site
Tyr12CB	Asp52: AOD2	NAD binding site



MP31: R3, S5, Y12 e R21

LDH(A): D55, R98, K56 e Q100

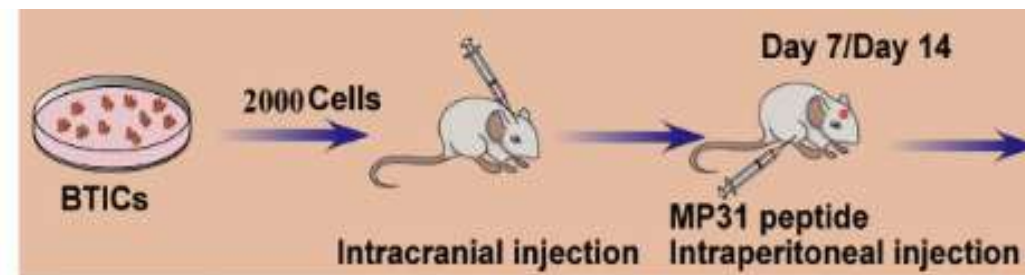
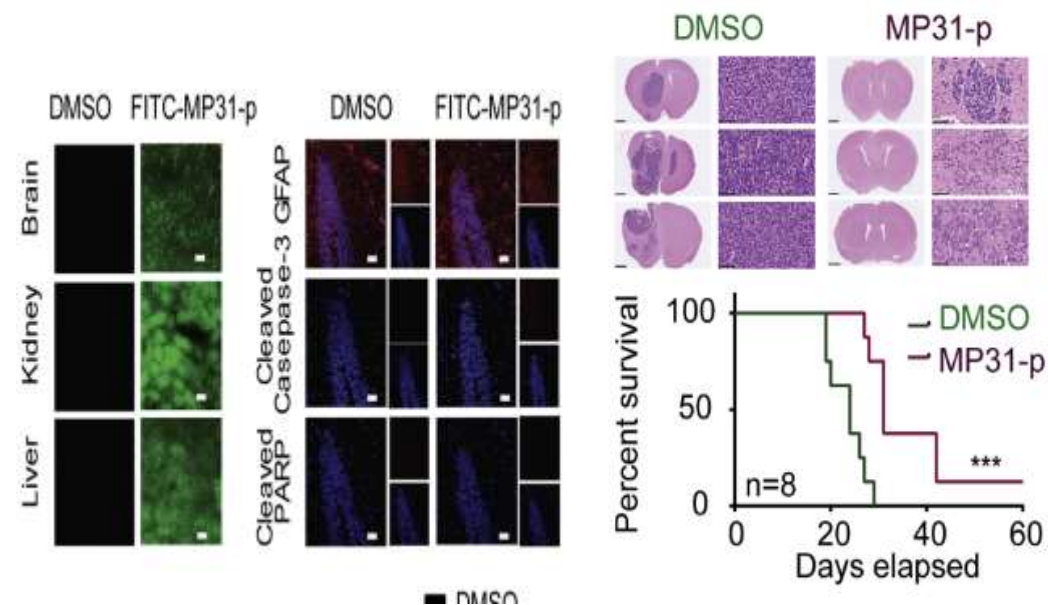
LDH(B): Q101, R99, D52, D56 E E102

# PROSPETTIVE CLINICHE DEL MP31:

A seguire uno xenotrapianto di GBM, intracranialmente a modelli di topo nudo (10 mg/kg; 30 giorni) seguiti da iniezioni di MP31 ricombinante+DMSO (7° giorno):

I topi hanno dimostrato una percentuale di sopravvivenza maggiorata con una diminuita formazione di tumori cerebrali indotti da GBM.

**MP31 AGISCE DA SUPPRESSORE TUMOROGENICO**



# RIASSUNTO

Il testo esamina approfonditamente l'utilizzo di elementi regolatori nel processo traduttivo ed il possibile ruolo chiave nella biologia del cancro. La tesi discute come viene attuata la regolazione e si focalizza sulle piccole proteine codificate definite «microproteine». Viene discussa la loro storia, differenze sostanziali dai peptidi conosciuti e metodica sperimentale per identificarle, viene inoltre osservata una particolare microproteina bioattiva MP31 ed il suo ruolo regolativo del metabolismo lattico nel tumore maligno Glioblastoma. Le conclusioni suggeriscono il futuro utilizzo di microproteine come target terapeutici, portando a significativi progressi nella conoscenza dei meccanismi biologici di cellule tumorali per la continua lotta contro il cancro.

## RIFERIMENTI:

- [Gene expression regulation by upstream open reading frames and human ...](#)
- [An Upstream Open Reading Frame in Phosphatase and Tensin Homolog ...](#)
- [Micropeptide - PMC - National Center for Biotechnology Information](#)
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31342439/>