



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea  
Scienze Biologiche

---

DISREGOLAZIONE DELLA TRADUZIONE NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE: UN FOCUS  
SULLA SLA

TRANSLATION DYSREGULATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASES: A FOCUS ON ALS

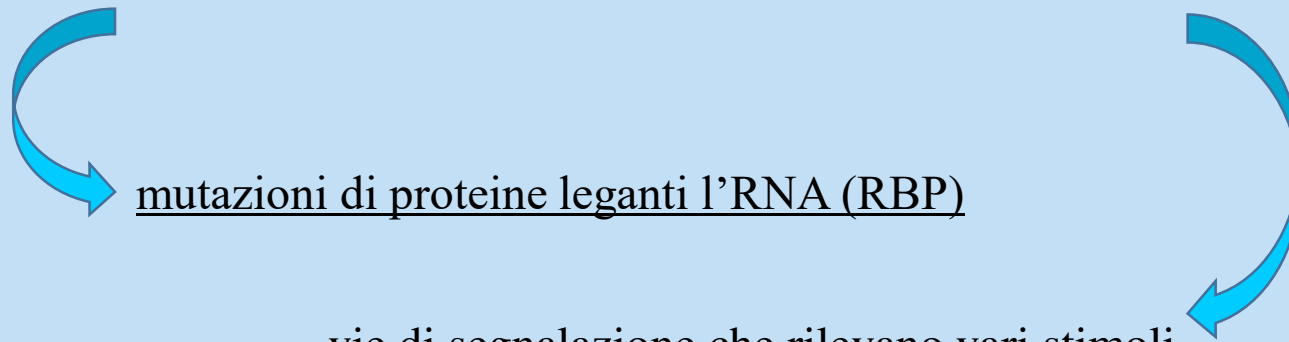
Tesi di Laurea di:  
Novelli Virginia

Docente referente:  
Anna La Teana

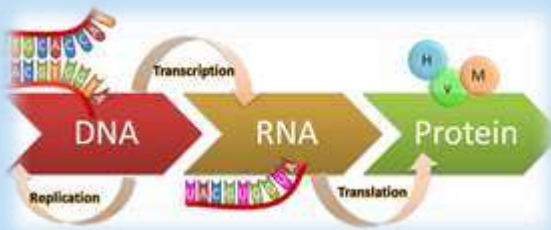
Sessione Estiva 2024  
Anno Accademico 2023-2024

# INTRODUZIONE

- La **traduzione** dell'RNA è strettamente controllata nelle cellule eucariotiche per regolare l'espressione genica e mantenere l'omeostasi del proteoma:
  - ciò è fondamentale per la funzione e la sopravvivenza cellulare;
- Una sua **disregolazione** può però causare **malattie neurodegenerative**, per diversi motivi:



- 1) stress ossidativo;
- 2) stress ER della risposta proteica non ripiegata;
- 3) difetti del metabolismo.



*Figura 1:* schema espressione genica,

da: <https://www.ilsuperuovo.it/aerosol-rna-cura-cancro-polmoni/>



*Figura 2:* rappresentazione della traduzione delle proteine,

da: <https://www.biopills.net/sintesi-proteica/>

# MORBO DI PARKINSON

- Malattia ad evoluzione lenta ma progressiva, che coinvolge principalmente funzioni quali il controllo dei movimenti e dell'equilibrio;
- Caratterizzata dallo **stress ossidativo**;

*STRESS OSSIDATIVO*: meccanismo di danno cellulare determinato da un eccesso di radicali liberi, caratterizzati da elevata instabilità chimica

È provocato/aumentato da:

- Espressione mutata delle proteine **Parkin** e **PINK-1**;
- **Tossine ambientali**;
- Alterazioni del metabolismo della **dopamina**;
- **Disfunzione mitocondriale**;

Compromette la funzione di **UPS**

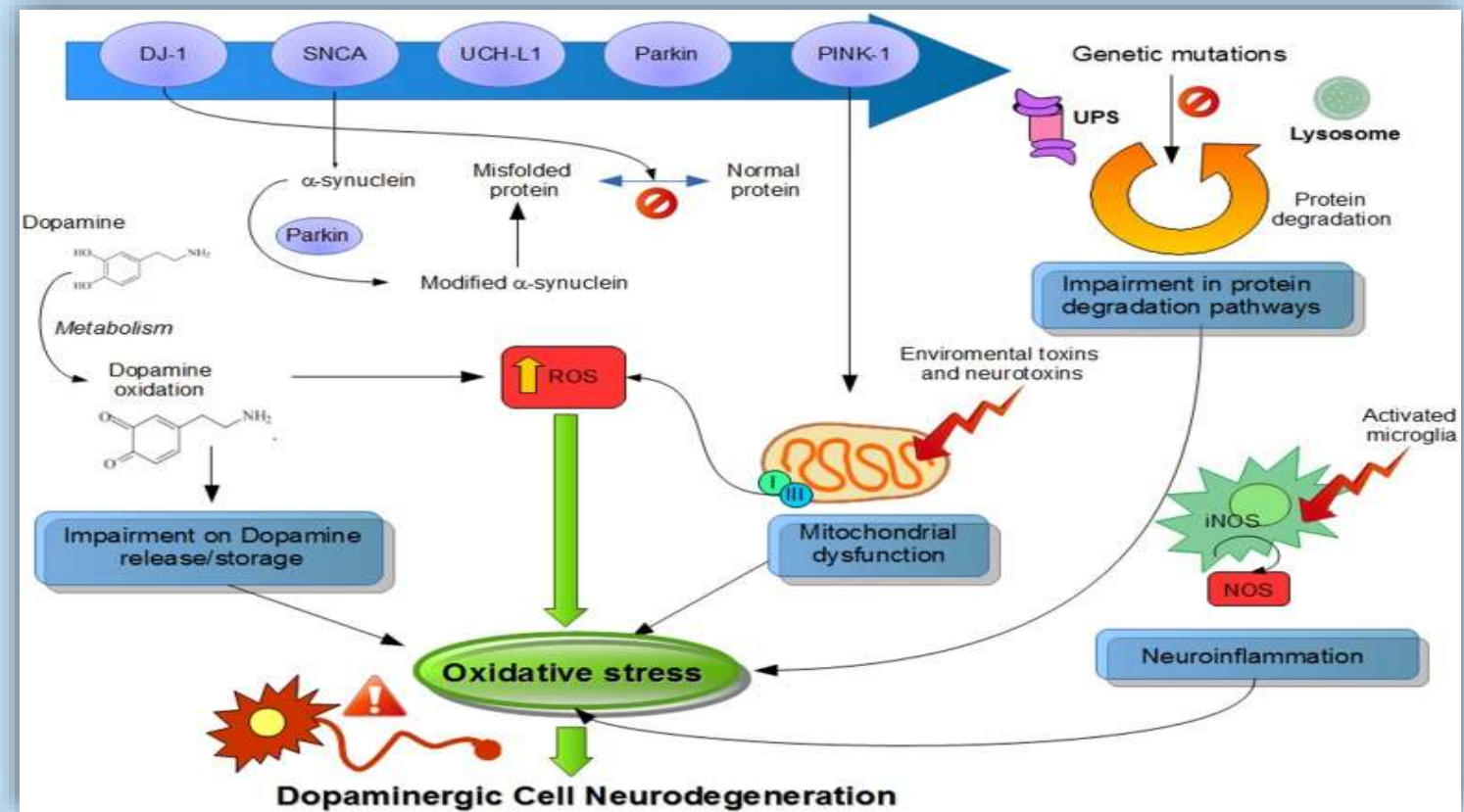


Figura 3: alcuni meccanismi molecolari che hanno luogo in pazienti affetti da Parkinson

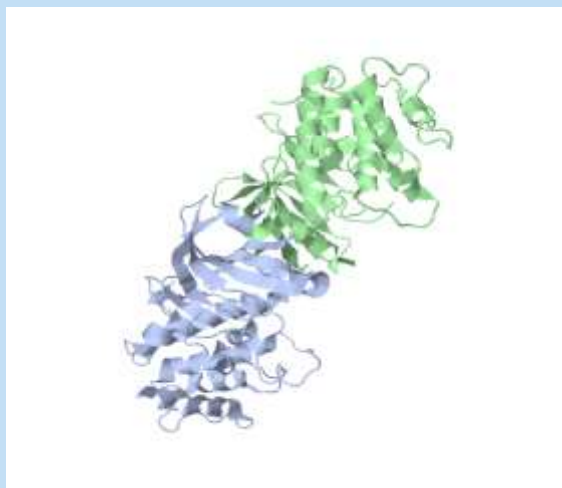
# MALATTIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH

- Disordine neurologico ereditario del SNP più diffuso; interessa i nervi periferici del controllo del movimento e sensoriali;
- È coinvolta la regolazione della **fase di allungamento** della traduzione:



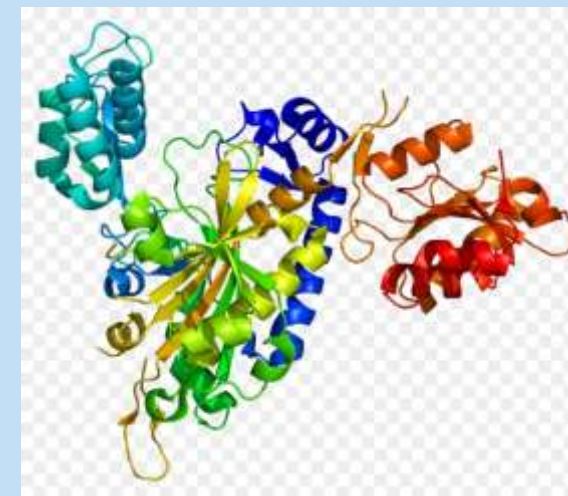
prima malattia collegata a mutazioni degli **AARS**  
(aminoacil-tRNA-sintetasi)

- Il caso più rilevante è quello delle mutazioni missenso del gene che codifica per **GARS** (glicil-tRNA sintetasi) → lega il  $tRNA^{Gly}$  ma non riesce a rilasciarlo;



*Figura 5:* struttura cristallina di GCN2

<https://en.wikipedia.org/wiki/Gcn2>



*Figura 4:* struttura di una GARS umana cristallizzata

[https://it.frwiki.wiki/wiki/Glycyl-ARNt\\_synth%C3%A9tase](https://it.frwiki.wiki/wiki/Glycyl-ARNt_synth%C3%A9tase)

- Si riscontra così uno stallo dei ribosomi nei codoni della glicina e l'attivazione della ISR attraverso la via **GCN2**.

# LA SLA E IL GENE C9ORF72 (1)

- Malattia neurodegenerativa che colpisce principalmente i **motoneuroni**;
- L'espansione ripetuta dell'esanucleotide **GGGGCC** nel primo introne del gene **C9ORF72** è la causa genetica più comune della SLA;



Queste ripetizioni, insieme a quelle antisenso CCCC GG, vengono poi usate per produrre cinque diverse proteine

DPR (**traduzione RAN**):

- 1) poli glicina-alanina;
- 2) poli glicina-arginina;
- 3) poli prolina-alanina;
- 4) poli prolina-arginina;
- 5) poli glicina-prolina.

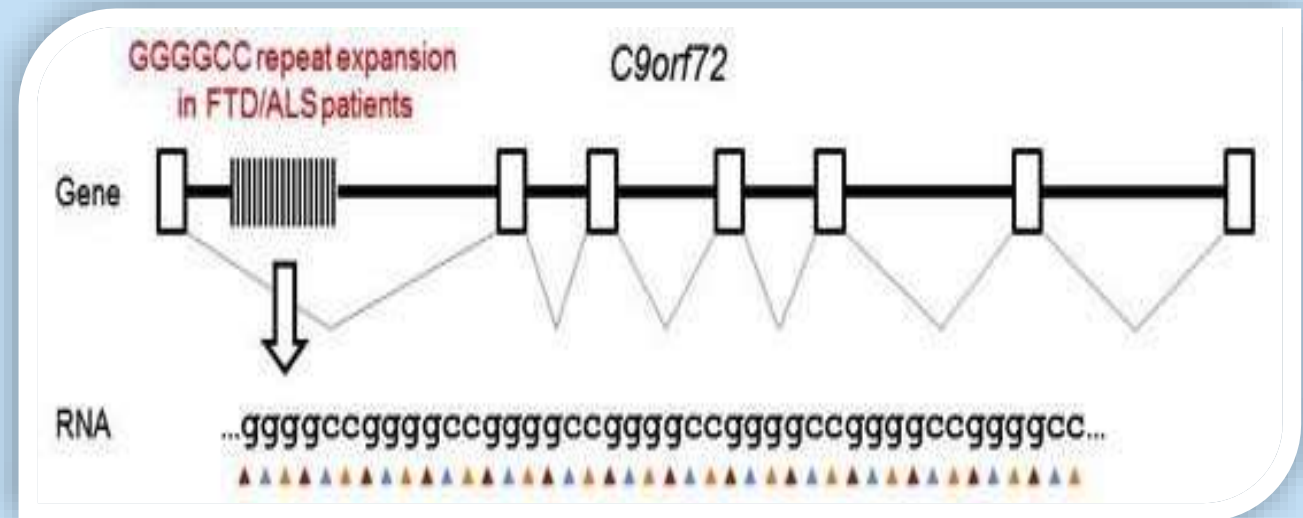


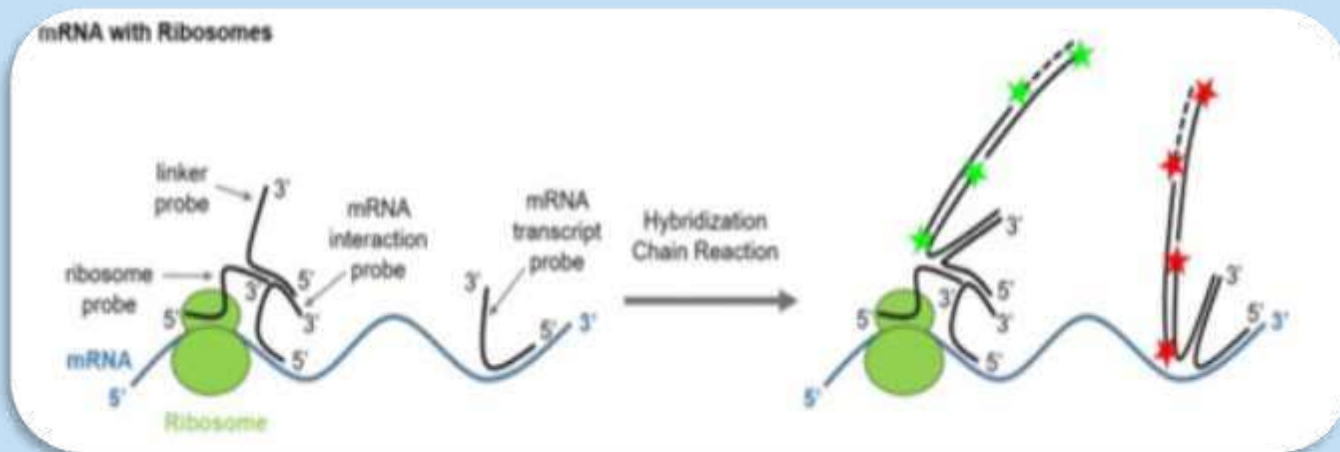
Figura 6: gene C9ORF72 e sua espansione ripetuta <http://neurowiki2014.wikidot.com/individual:0000>

# LA SLA E IL GENE C9ORF72 (2)

- Si è potuta osservare la localizzazione delle singole trascrizioni di RNA nelle cellule tramite la tecnica **smFISH**;

**smFISH**: le cellule vengono ibridate con una serie di sonde costituite da più oligonucleotidi di DNA marcati in modo fluorescente, che coprono la lunghezza dell'mRNA

- smFISH + trattamento con esonucleasi RNasi R: gli introni contenenti ripetizioni sono principalmente circolari → introni **lariat**



Gli elementi di RNA colpiti dalle sonde sono le anse dello stelo **MS2** e **PP7**

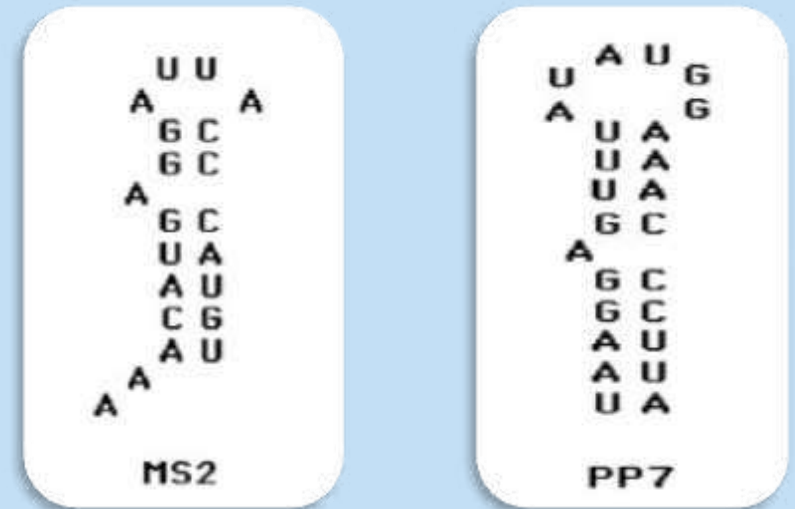
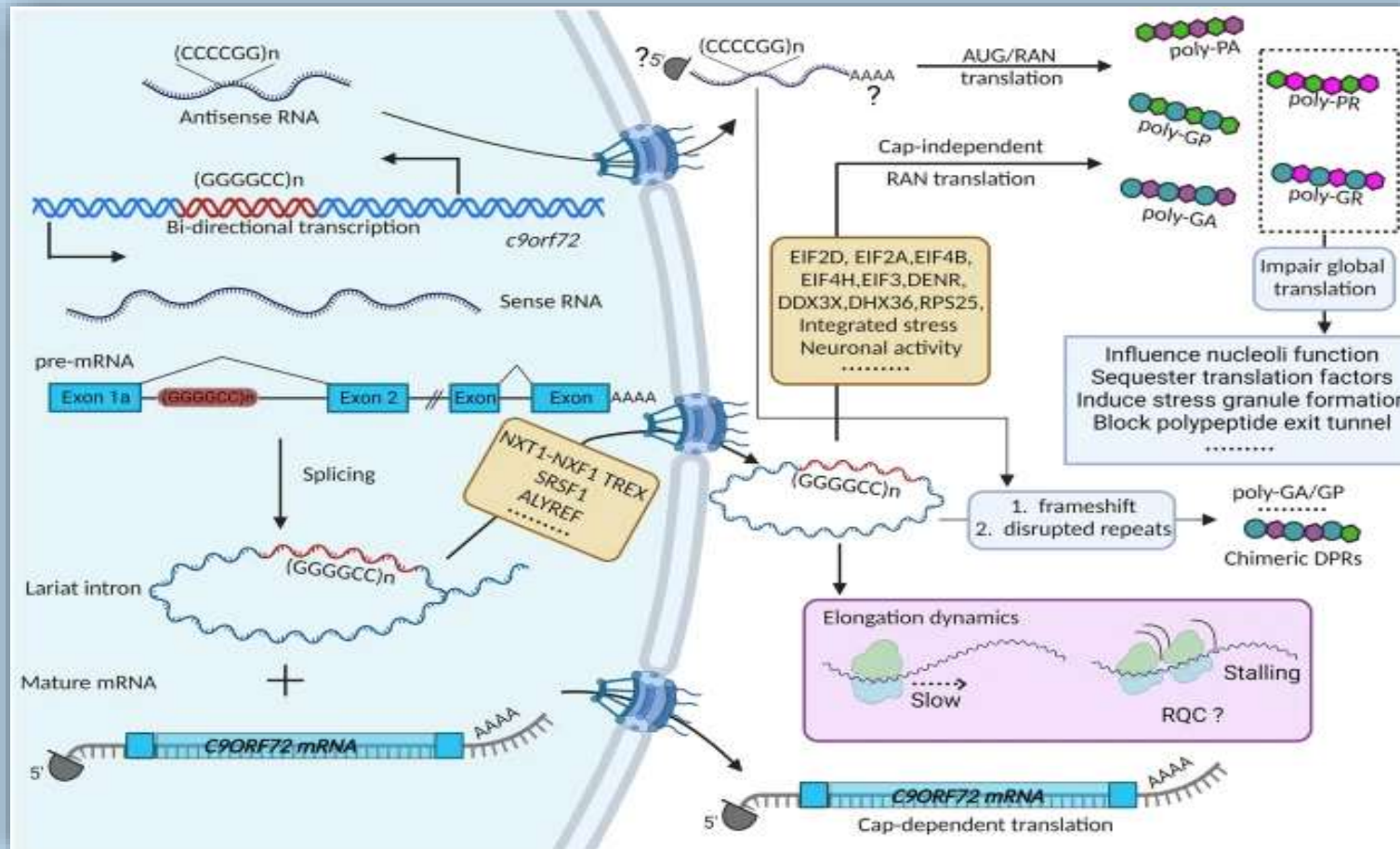


Figure 7 e 8: strutture anse dello stelo MS2 e PP7 [https://www.researchgate.net/figure/The-sequences-and-secondary-structures-of-translational-operators-from-MS2-O-and-PP7\\_fig1\\_12027142](https://www.researchgate.net/figure/The-sequences-and-secondary-structures-of-translational-operators-from-MS2-O-and-PP7_fig1_12027142)

Figura 9: schema tecnica smFISH <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445550/>

# LA SLA E IL GENE C9ORF72 (3)

- Molte **RBP** modulano l'esportazione dell'RNA ripetuto:



- 1) fattori di splicing ricchi di S e R (**SRSF**);
- 2) **ALYREF** e le subunità del complesso **TREX**;
- 3) il fattore di esportazione dell'RNA nucleare (**NXF1**) e il suo cofattore **NXT1**.

- L'inizio della traduzione è indipendente dal cappuccio in 5': si utilizza il sito di ingresso ribosomiale interno (**IRES**);
- Durante la traduzione potrebbe attivarsi la via **RQC**, che impedisce le collisioni ribosomiali.

# ALLUNGAMENTO DELLA TRADUZIONE DI DIVERSI FOTOGRAMMI DI LETTURA SULLE RIPETIZIONI

- La traduzione delle ripetizioni segue i canonici meccanismi di **allungamento**;
- Gli RNA contenenti **ripetizioni GGGGCC** formano una struttura a G-quadruplex e codificano amminoacidi ripetitivi:
  - ciò causa lo **stallo dei ribosomi**;
  - si attiva la via **RQC**;
- Proteina **ZNF598**: si propone che possa degradare il poly-GR.
- ESPERIMENTO**: osservazioni principali:
  - La sovraespressione di **GFP-GR100** interrompe l'integrità della lamina nucleare, ma l'effetto è contrastato dalla sovraespressione di **ZNF598 wild-type**;
  - La sovraespressione dei mutanti **ZNF598<sup>ΔRING</sup>** e **ZNF598<sup>R69C</sup>** non influenza in maniera significativa la tossicità di poly-GR;
  - In generale, l'attività di ZNF598 richiede il dominio RING ed è compromessa dalla **mutazione** che questa proteina subisce nella **SLA**.

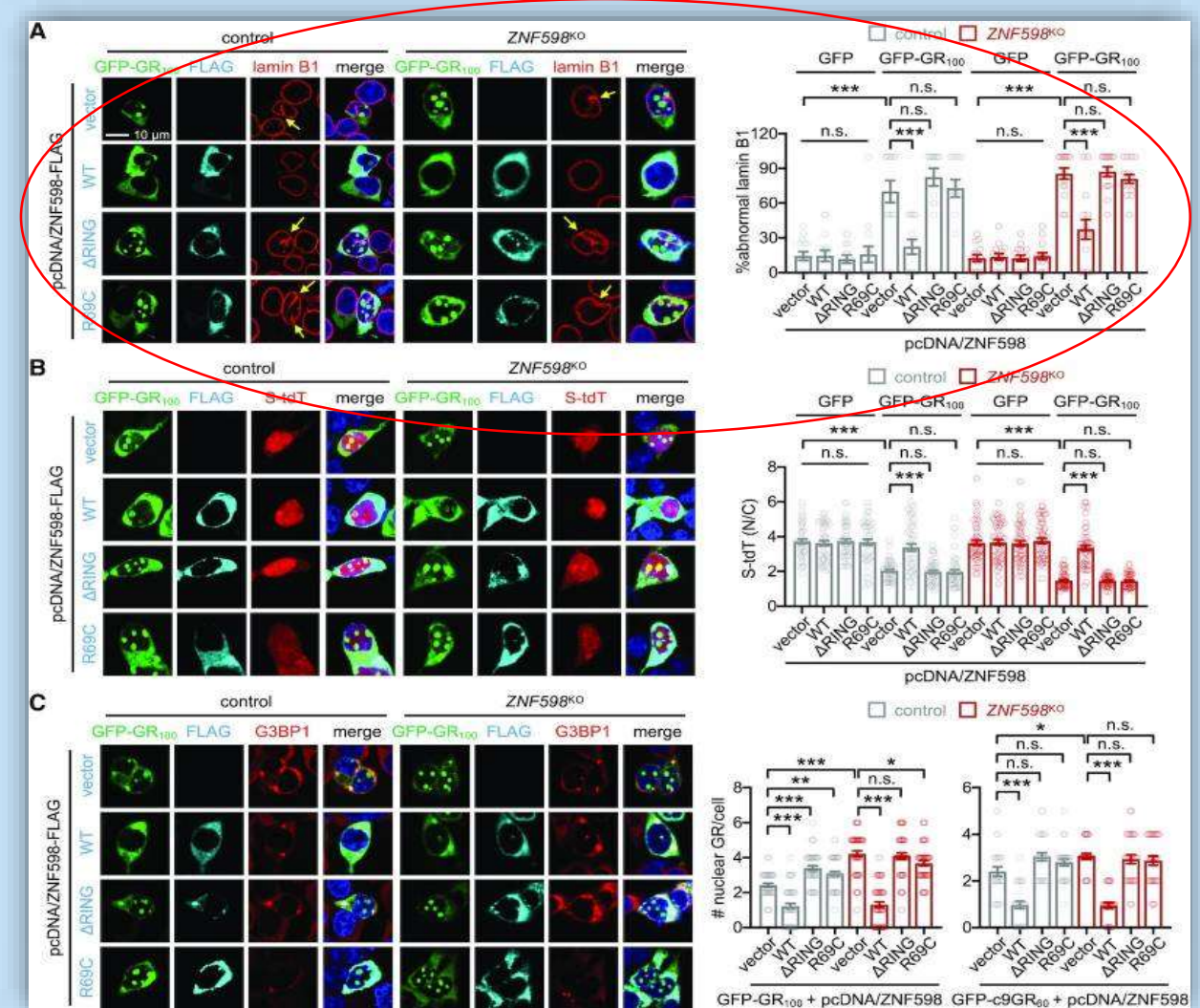
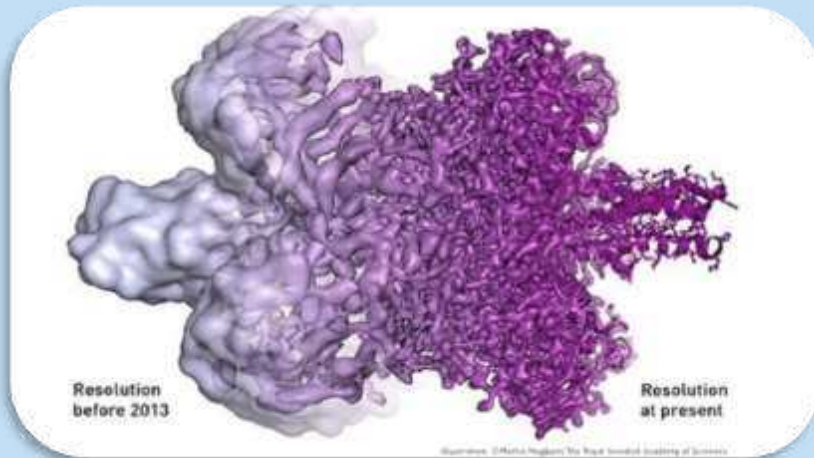


Figura 11: schema esperimento <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8565315/>



# I POLY-GR/PR INFLUENZANO LA TRADUZIONE GLOBALE

- I **poly-GR** e i **poly-PR** si localizzano nei nucleoli → compromissione di dinamica e funzione dei ribosomi;  
→ **rRNA** totale significativamente ridotto → compromissione della traduzione;
- La sovraespressione di **eIF1A** può però alleviare la repressione della traduzione;
- Si può attivare la via **RQC** in seguito allo stallo dei ribosomi causato dai poly GR/PR (il loro meccanismo d'azione è stato osservato tramite la **crio-microscopia elettronica**).



**CRIO-MICROSCOPIA ELETTRO-**  
**NICA:** permette di vedere in 3D  
le molecole biologiche. La strut-  
tura da osservare viene congelata  
tramite vetrificazione, in modo da  
preservarne la qualità e la traspa-  
renza

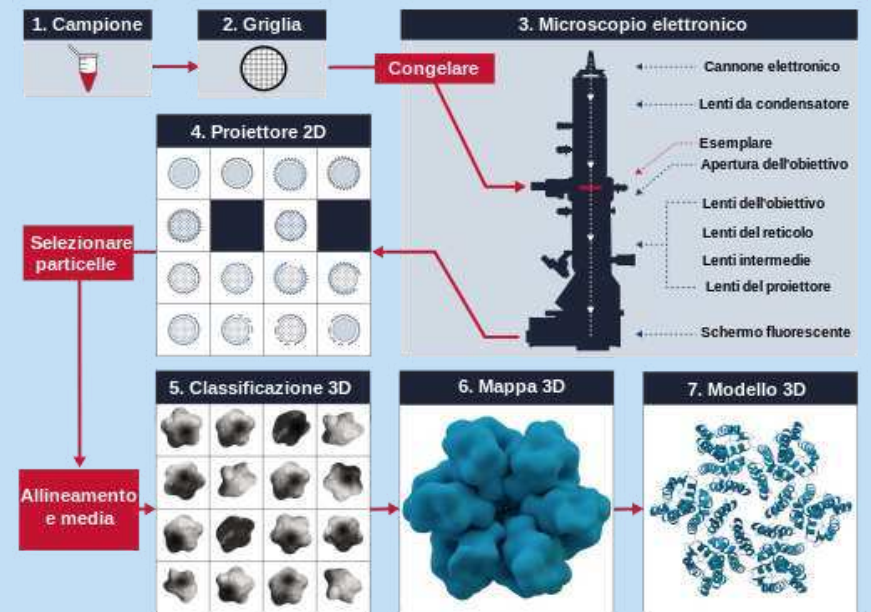


Figura 12: struttura di un ribosoma ottenuta tramite crio-EM <https://www.biopills.net/crio-microscopia-elettronica/>

Figura 13: schema tecnica crio-EM [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flusso\\_della\\_microscopia\\_crioelettronica.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flusso_della_microscopia_crioelettronica.svg)

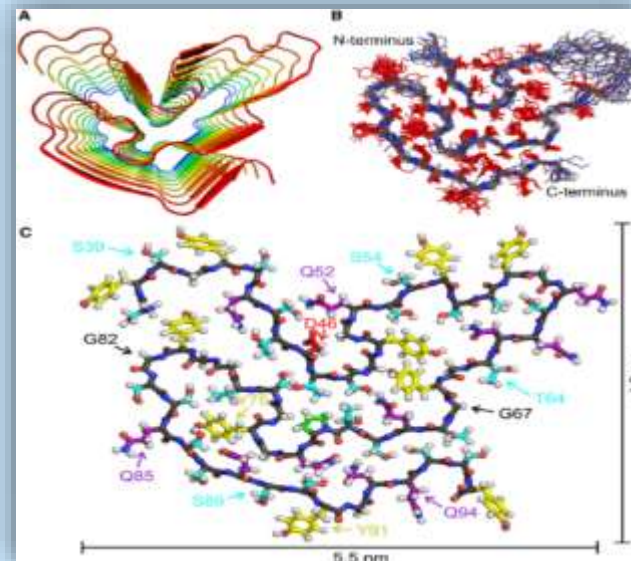
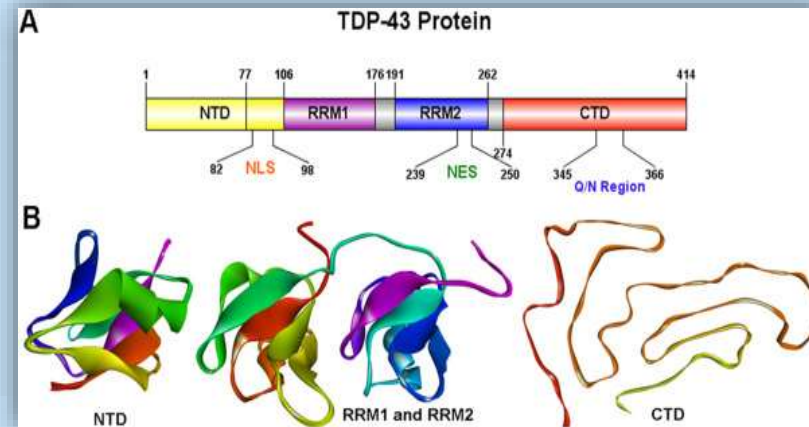
# FUS E TDP43

## FUS

- Proteina **simile al prione** legante l'RNA;
- Si localizza prevalentemente nel **nucleo**;
- Contiene quattro **domini** di legame dell'RNA:
  - 1) due box di arginina-glicina-glicina (**RGG**);
  - 2) un motivo di riconoscimento dell'RNA (**RRM**);
  - 3) un dominio dito di zinco (**ZnF**).
- Il ruolo fisiologico del FUS richiede la formazione di **compartimenti dinamici** simili a liquidi;
- Con il tempo, le goccioline liquide si convertono a uno **stato aggregato**, e ciò è accelerato da mutazioni.

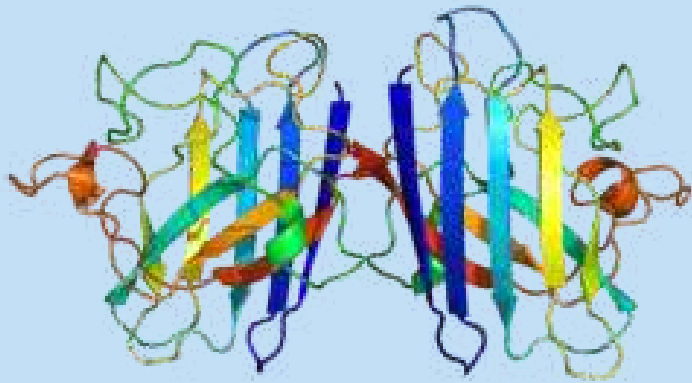
## TDP43

- Appartiene alla famiglia delle **ribonucleo-proteine** nucleari eterogenee;
- Si trova prevalentemente nel **nucleo**;
- Consiste di quattro **domini**:
  - 1) dominio N-terminale (**NTD**);
  - 2) due motivi **RRM1** e **RRM2**;
  - 3) un dominio C-terminale.
- È associato ai ribosomi in condizioni di stress e localizzato nei **granuli di stress**;
- I **condensati assonali** di TDP43 inibiscono la sintesi proteica locale delle proteine mitocondriali codificate nel nucleo.



# CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

- Negli ultimi anni sono state scoperte diverse **RBP**, le cui **mutazioni** sono state fortemente collegate alla SLA;  
→ alterano il normale funzionamento della traduzione e molte sono componenti dei granuli di stress;
- È un bene concentrarsi anche sulla **fase di allungamento** della traduzione, quindi sul frameshifting, e su RQC:



*Figura 16:* struttura cristallina di SOD1 <https://en.wikipedia.org/wiki/SOD1>

Buon punto di partenza per lo studio di **nuove terapie**



- Studio di **SOD1**: la sua forma mutante produce aggregati proteici tossici per il motoneurone;
- Sembra però che l'utilizzo di **Tofersen** sia in grado di bloccare questa attività anomala;  
→ **stabilizzazione** della forza e del controllo muscolare;
- La **prospettiva** è perciò quella di individuare **nuovi biomarkers**.



*Figura 17:* <https://www.revertonlus.org/sla-tofersen/>

# RIASSUNTO

La traduzione dell'RNA è strettamente controllata nelle cellule eucariotiche, per regolare l'espressione genica e mantenere l'omeostasi del proteoma. Può però subire disregolazioni e dare origine a malattie neurodegenerative. Ad esempio, nel morbo di Parkinson lo stress ossidativo attenua la traduzione globale, che porta a disfunzione sinaptica e perdita neuronale; nella malattia di Charcot-Marie-Tooth si verificano mutazioni delle amminoacil-tRNA-sintetasi, in particolare delle GARS, che compromettono la fase di allungamento.

Nella SLA invece il meccanismo più comune di errata traduzione delle proteine è l'espansione ripetuta dell'esanucleotide GGGGCC nel primo introne del gene C9ORF72. Infatti, attraverso la trascrizione bidirezionale, sia l'RNA contenente ripetizioni senso (GGGGCC) che quello contenente ripetizioni antisense (CCCCGG) vengono sintetizzati dal primo introne di questo gene e utilizzati per produrre cinque proteine DPR, che si accumulano nel cervello del paziente durante le prime fasi della malattia. La localizzazione spaziale delle singole trascrizioni di RNA nelle cellule si è potuta osservare tramite la smFISH. Si è notato anche che queste ripetizioni contenenti introni esistono principalmente in forma circolare, a causa della difettosa deramificazione dell'introne lariat, indotto proprio dalla ripetizione GGGGCC.

È poi stato scoperto che molte RBP modulano l'esportazione e la traduzione nucleare dell'RNA ripetuto, e che per l'espansione della ripetizione C9ORF72 è importante l'inizio della traduzione indipendente dal cappuccio situato in 5': si utilizza in questo caso il sito di ingresso ribosomiale interno. Inoltre, la subunità ribosomiale 25 può regolare selettivamente la traduzione RAN associata a GGGGCC, e si riesce a ridurre il livello di DPR tramite knockout di questa subunità. Durante la traduzione poi, le ripetizioni GGGGCC formano strutture a G-quadruplex e codificano amminoacidi ripetitivi: ciò può causare lo stallo dei ribosomi e attivare la via RQC. Una delle proteine di questa via, ZNF598, promuove la degradazione del poly-GR. La sovraespressione di quest'ultimo, e di poly-PR, può promuovere l'assemblaggio spontaneo di granuli di stress e inibire la traduzione globale. Più precisamente, uno studio di microscopia elettronica criogenica rivela che entrambi inibiscono in particolare la fase di allungamento. Tutto ciò può attivare sempre la via RQC.

Al centro della SLA vi sono anche l'aggregazione dei compartimenti liquidi formati dalla proteina FUS nei siti di danno al DNA e i condensati assonali della proteina TDP43, che inibiscono la sintesi proteica locale delle proteine mitocondriali codificate nel nucleo, importanti per la giunzione neuromuscolare.

Negli ultimi anni sono state scoperte diverse mutazioni delle RBP, fortemente collegate alla SLA: alterano la traduzione e molte sono componenti dei granuli di stress. È bene concentrare gli studi anche sulla fase di allungamento della traduzione, quindi sul frameshifting, e sulla via RQC. Una nuova prospettiva terapeutica è quella che coinvolge la forma mutante di SOD1, che produce aggregati proteici tossici per il motoneurone: sembra che l'utilizzo di Tofersen sia in grado di bloccare questa attività anomala, risultato che apre nuove prospettive nei confronti della SLA e della sua evoluzione. In generale, l'obiettivo è quello di individuare nuovi biomarkers, che potranno essere utili per una migliore comprensione di questa malattia e per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

# BIBLIOGRAFIA

- <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-023-00642-3#Bib1> (ARTICOLO);
- [https://www.treccani.it/enciclopedia/stress-ossidativo\\_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/stress-ossidativo_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/) (Stress ossidativo);
- <https://blog.performancelab16.com/stress-ossidativo/> (Stress ossidativo);
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.cad.univpm.it/26217195/> (Parkinson);
- <https://www.acmt-rete.it/patologia/la-malattia-di-charcot-marie-tooth-cmt> (CMT);
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917338/> (GCN2);
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8839980/>, [https://www.pianetachimica.it/mol\\_mese/mol\\_mese\\_2001/04\\_amminoacil\\_tRNA\\_sintetasi/Amminoacil\\_tRNA\\_sintetasi.htm](https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2001/04_amminoacil_tRNA_sintetasi/Amminoacil_tRNA_sintetasi.htm) (glicil tRNA sintetasi);
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5303742/> (C9ORF72);
- <https://www.nature.com/articles/s41467-017-02200-0> (Traduzione RAN);
- <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/fluorescence-microscopy/super-resolution-microscopes/single-molecule-fish-smfish-rna-visualization-and-quantification.html> (smFISH);
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35452614/> (via RQC);
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8565315/> (esperimento);
- <https://www.focus.it/scienza/scienze/che-cose-la-microscopia-crioelettronica#:~:text=La%20microscopia%20crioelettronica%20o%20Cryo,macchina%20fotografica%20molto%20pi%C3%B9%20precisa> (crio-EM);
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9120013/> (poly-GR/PR);
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26317470/> (FUS);
- <https://www.osservatoriomalattie.it/malattie-rare/sla/18570-sla-il-ruolo-della-proteina-tdp-43-al-centro-degli-studi-sulla-patologia> (TDP43);
- <https://assisa.it/roma-sla-nuovo-indizio-sulle-cause-della-malattia/> (SOD1);
- <https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/neuroscienze/sla-sod1-passi-avanti-nella-ricerca-ma-la-cura-e-ancora-lontana> (SOD1 e Tofersen).