



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente

Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Lo stress da danno del DNA induce l'espressione genica della proteina ribosomiale S27a in maniera p53-dipendente.

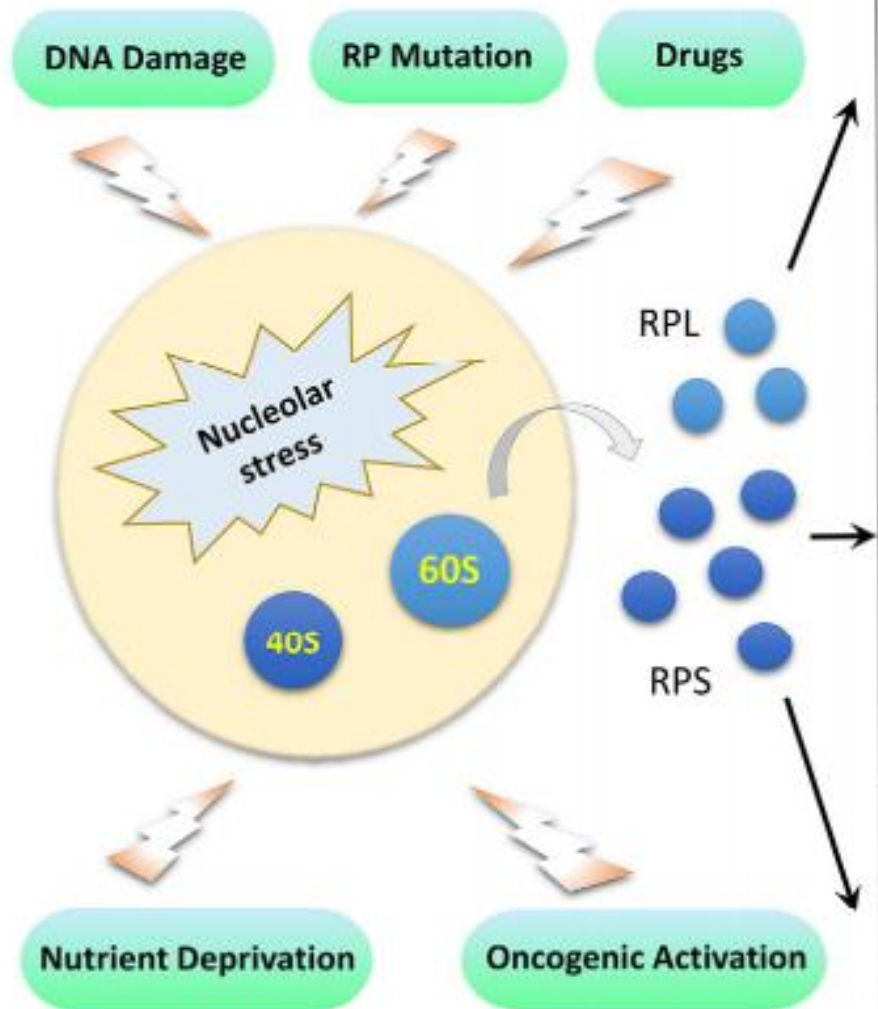
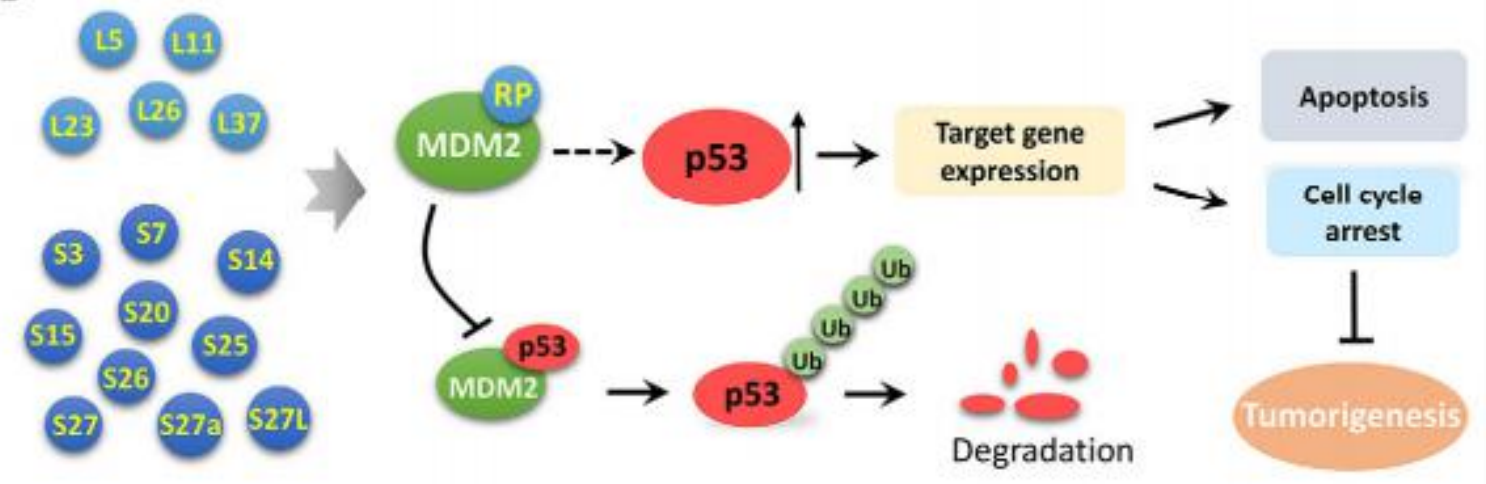
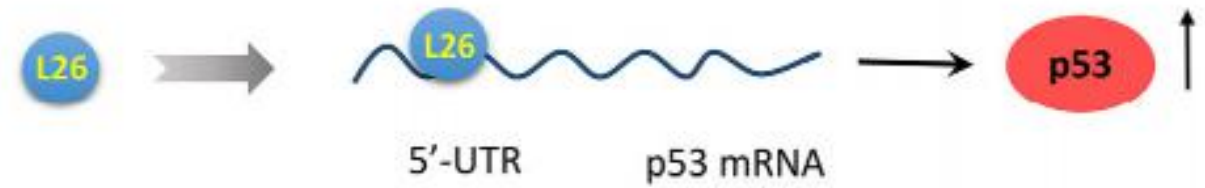
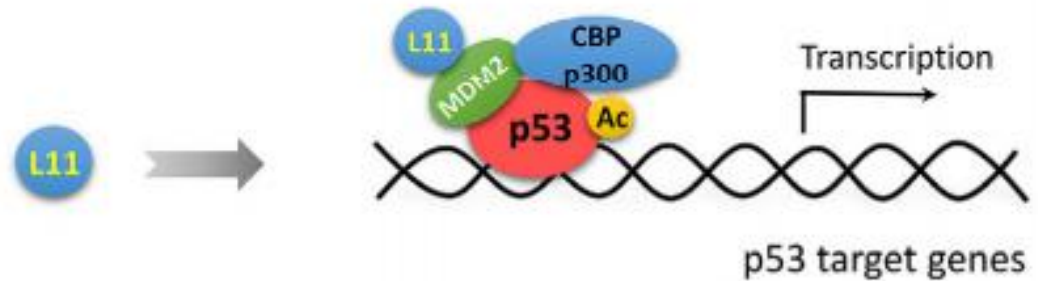
DNA damage stress induces the expression of Ribosomal Protein S27a gene in a p53-dependent manner.

Candidato:
Visino Giulio

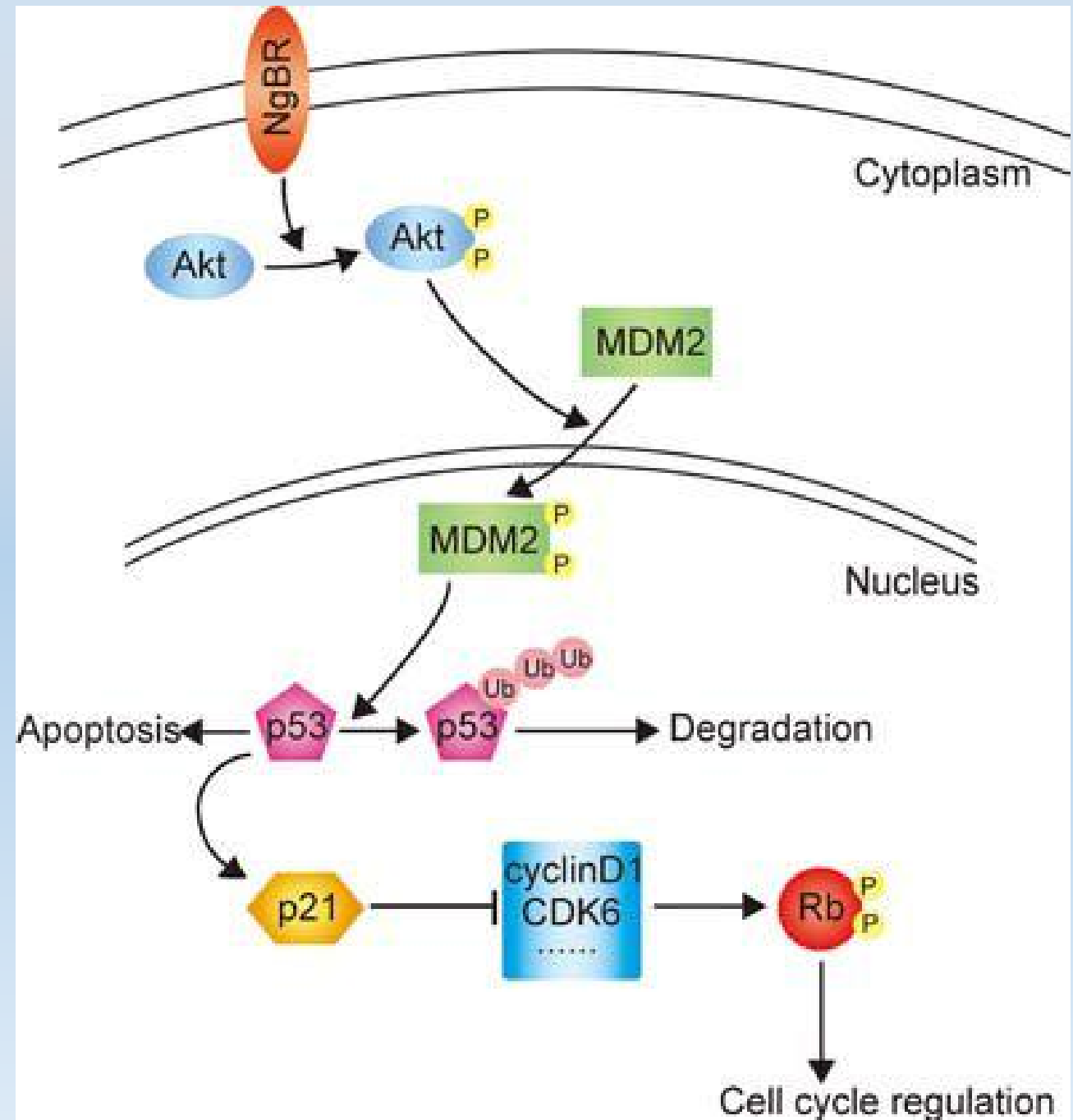
Anno accademico
2019/2020

Relatrice:
Cacciamani Tiziana

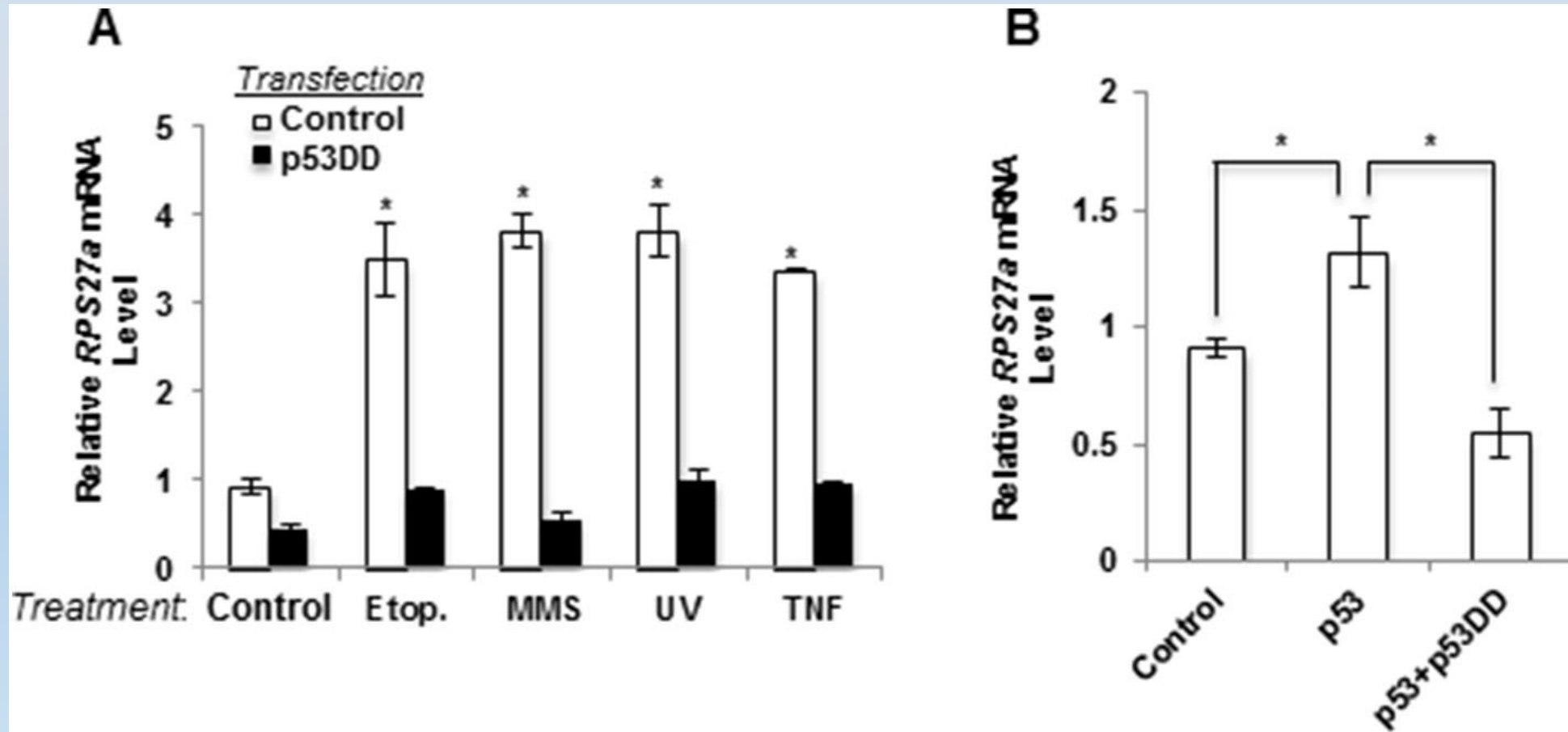
- Le proteine ribosomiali (RPs) sono delle proteine leganti l'RNA essenziali per la biogenesi dei ribosomi.
- Le RPs partecipano nella regolazione della p53 (proteina tumorale 53) e nell'apoptosi inibendo l'attività enzimatica di MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) e aumentando la traslocazione della p53 all'interno della cellula.
- A sua volta, la p53 risponde a diversi insulti cellulari attivando gli inibitori della CDK come p21Waf1, che partecipa nell'arresto del ciclo cellulare e nell'apoptosi.
- Lo studio in questione mette in risalto il ruolo significativo di RPS27a come trasmettitore di segnale tra il danno al DNA e la progressione del ciclo/biogenesi dei ribosomi.
- Il dominio N-terminale del gene UBCEP80 codifica per una mono ubiquitina fuso con la regione C-terminale che codifica per RPS27a che diventerà parte della subunità 40S.

A**B****C****D**

- In condizioni normali, i valori intracellulari di p53 sono regolati da processi di ubiquitinazione e degradazione mediati da MDM2.
- In condizioni di stress l'attività della MDM2 può essere ridotta portando alla stabilizzazione della p53.



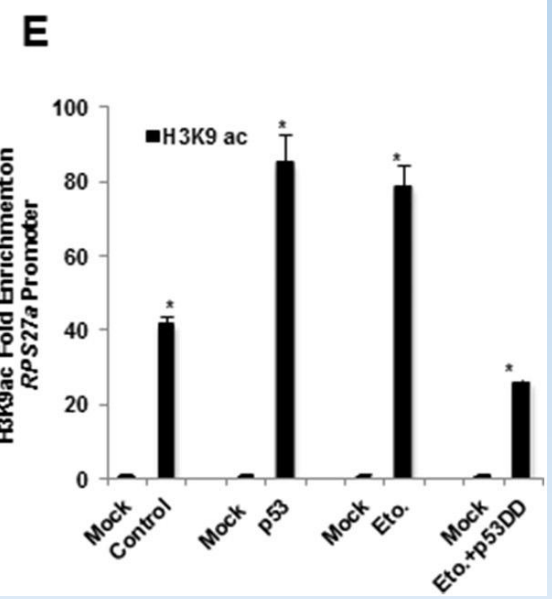
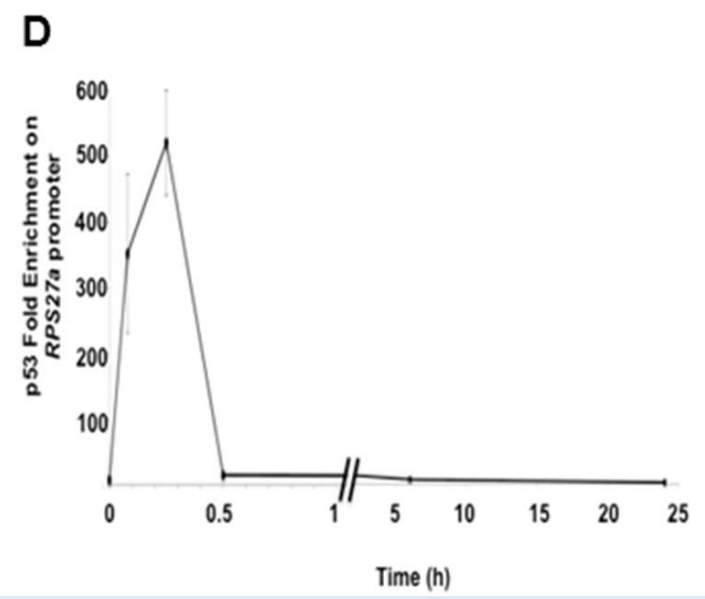
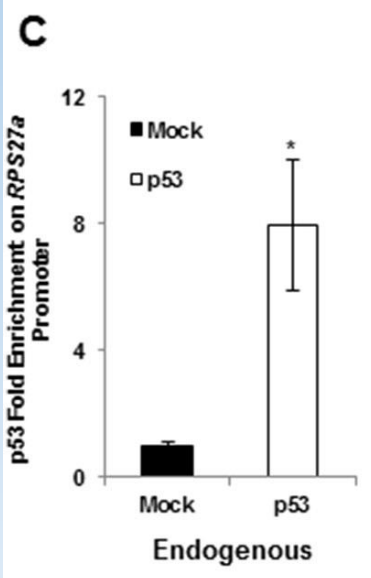
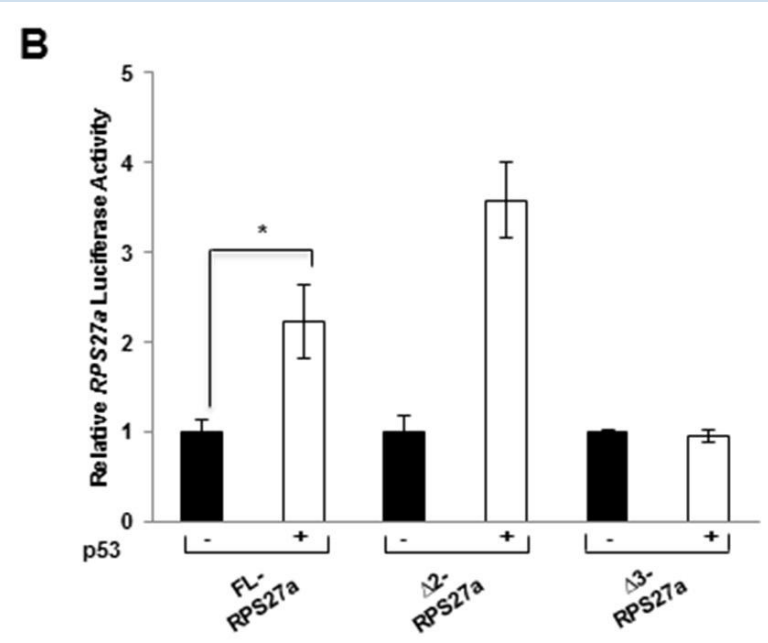
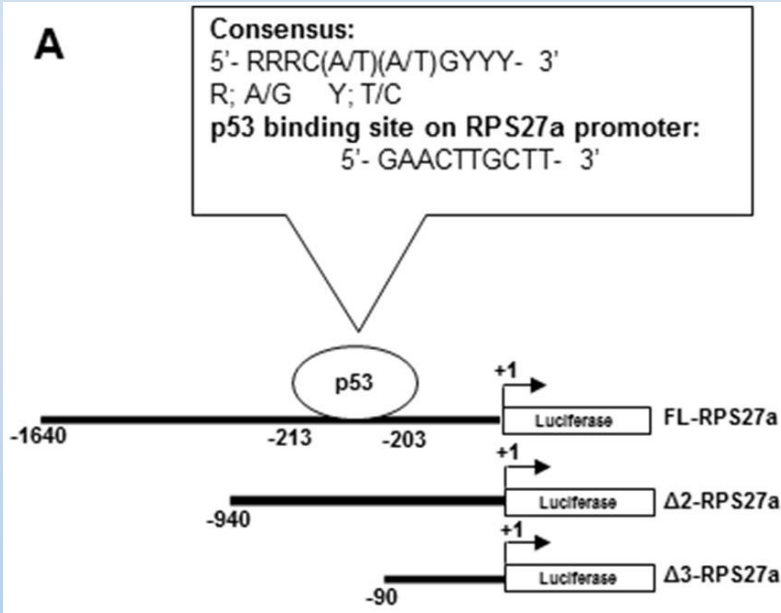
L'espressione della RPS27a in risposta a stress genotossico



- Quindi l'espressione del gene RPS27a dipende da p53 e può essere inibita dalla presenza di un inibitore di p53 (p53DD)

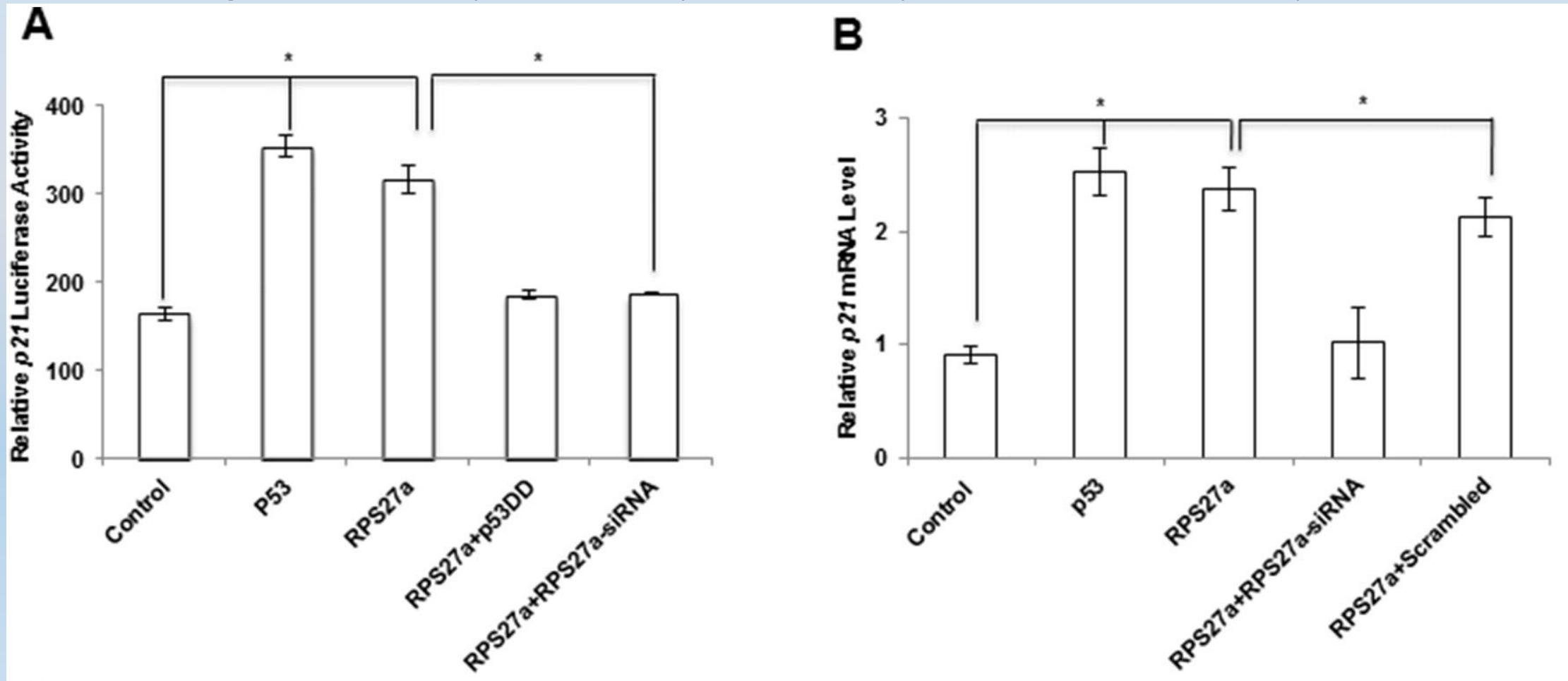
- I livelli del trascritto di RPS27a sono stati misurati tramite RT-qPCR dopo aver trattato gli IHH (Immortalized Human Hepatocyte) con alcuni agenti danneggianti il DNA:
 - Etoposide (50 μ M)
 - Metilsulfonilmetano (MSM, 0.02% m/v)
 - Fattore di necrosi tumorale (TNF, 50 ng/ml).
 - Ultravioletti (UV) tramite lampada germicida (254nm).

Regolazione trascrizionale del promotore di RPS27a in funzione di p53

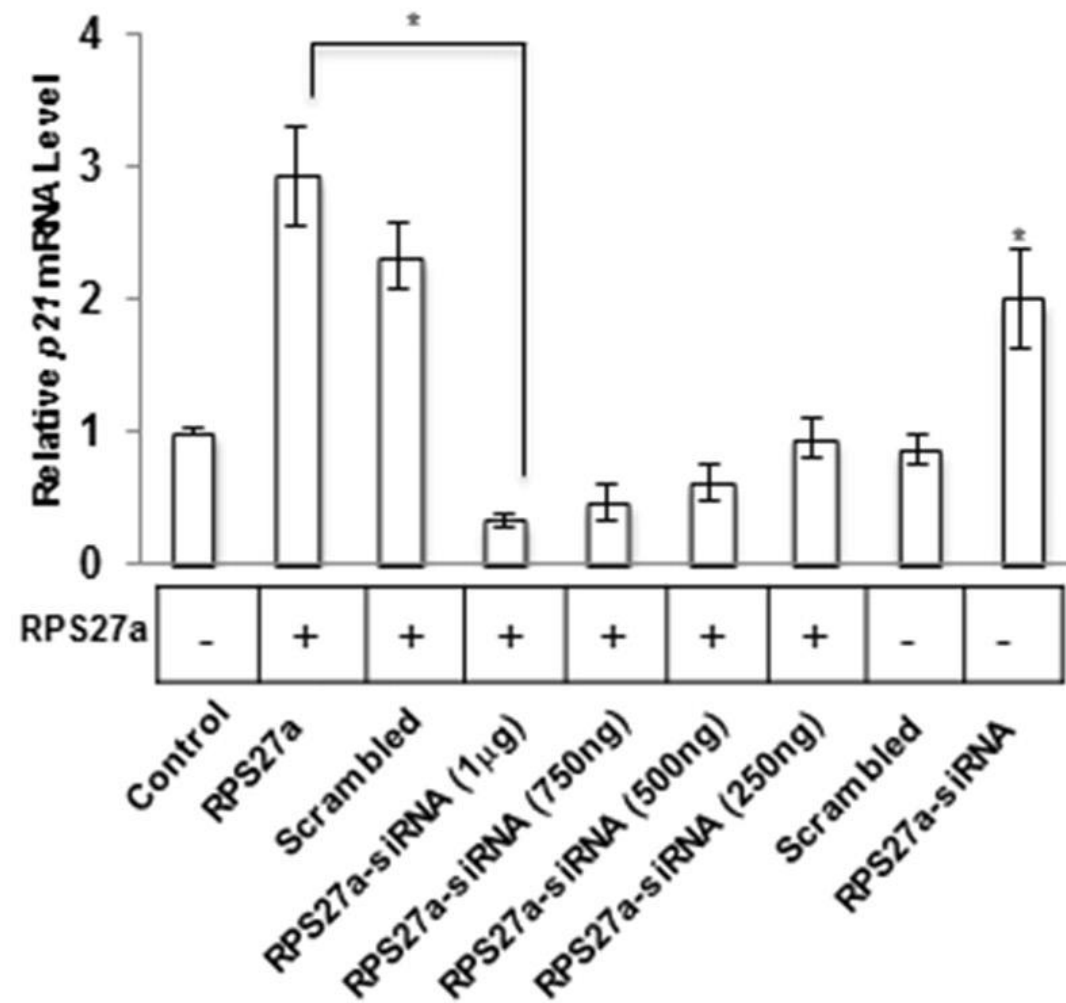
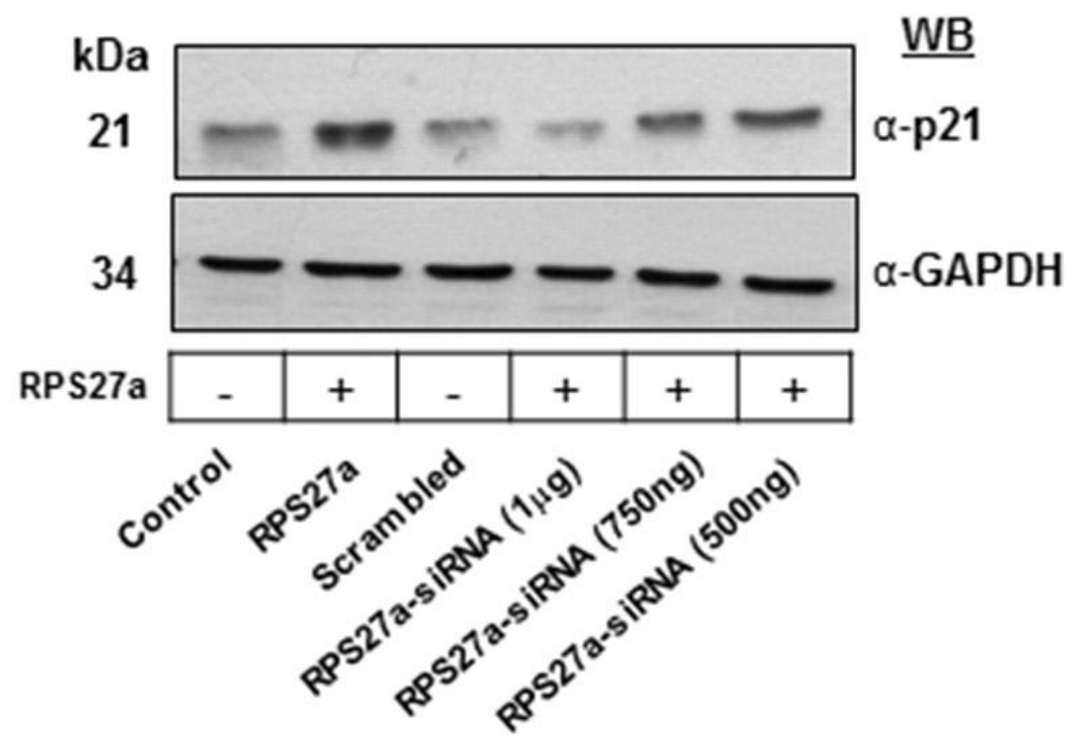


- p53 si lega rapidamente al sito specifico sul promotore di RPS27a e ne stimola la trascrizione in condizioni di stress del DNA

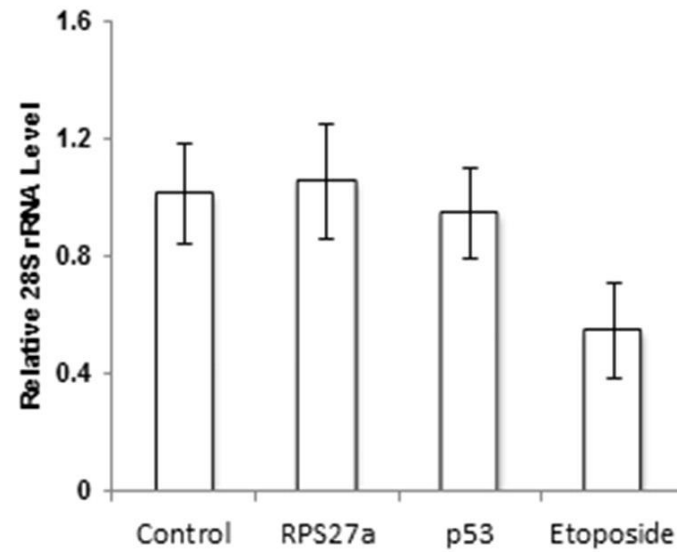
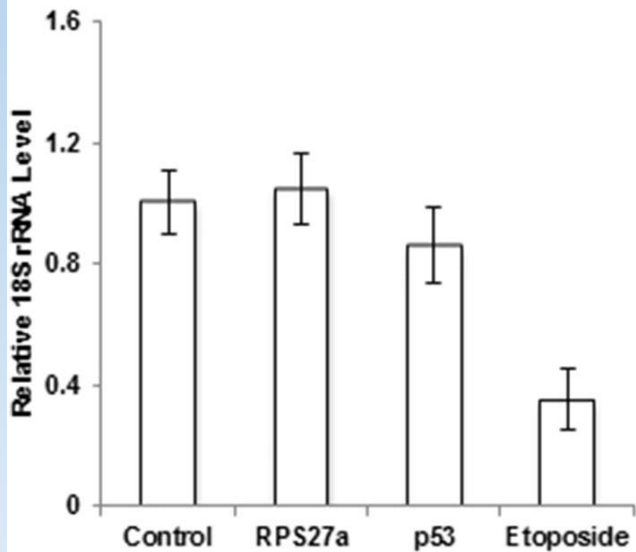
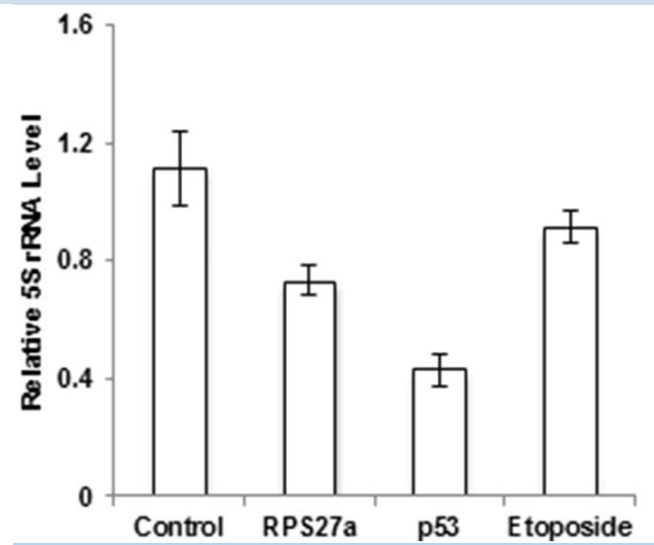
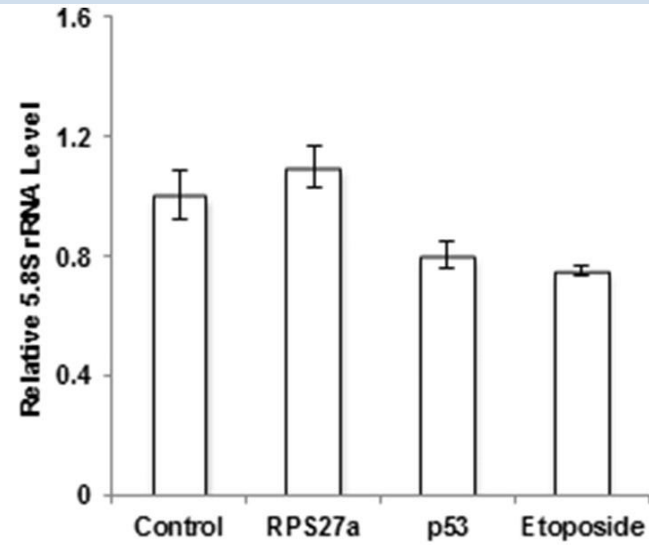
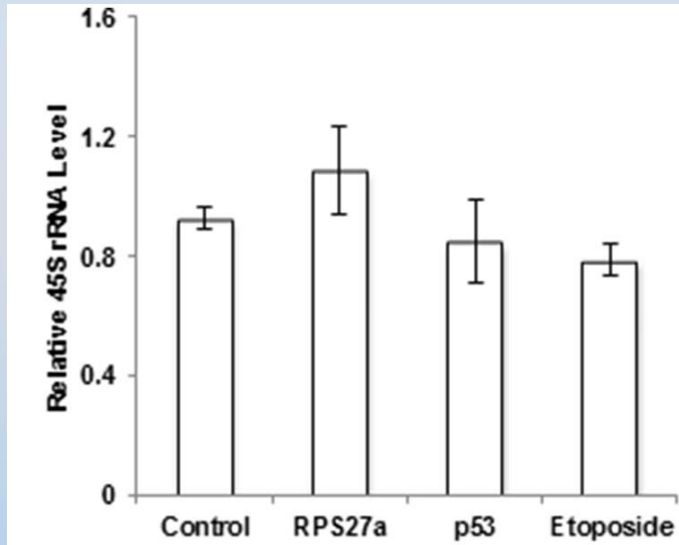
Regolazione del promotore p21Waf1 in presenza di RPS27a e p53



- La sovraespressione di p53 e RPS27a fanno aumentare l'attività del promotore e i livelli di mRNA per p21, ma l'uso di inibitori conferma che a monte agisce p53 e RPS27a è coinvolta probabilmente poichè viene indotta da p53

C**D**

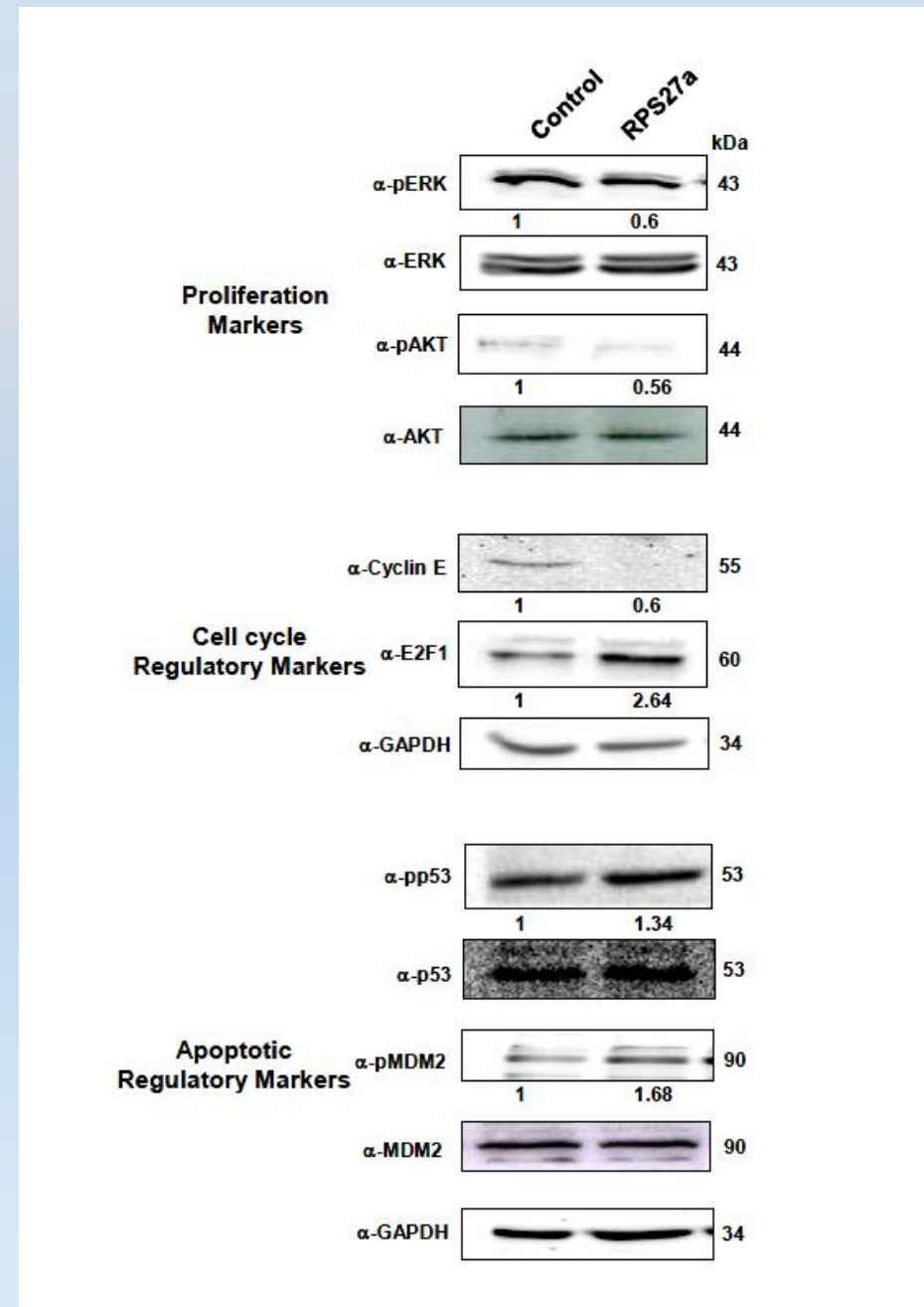
Espressione dei geni dei rRNA in presenza di RPS27a

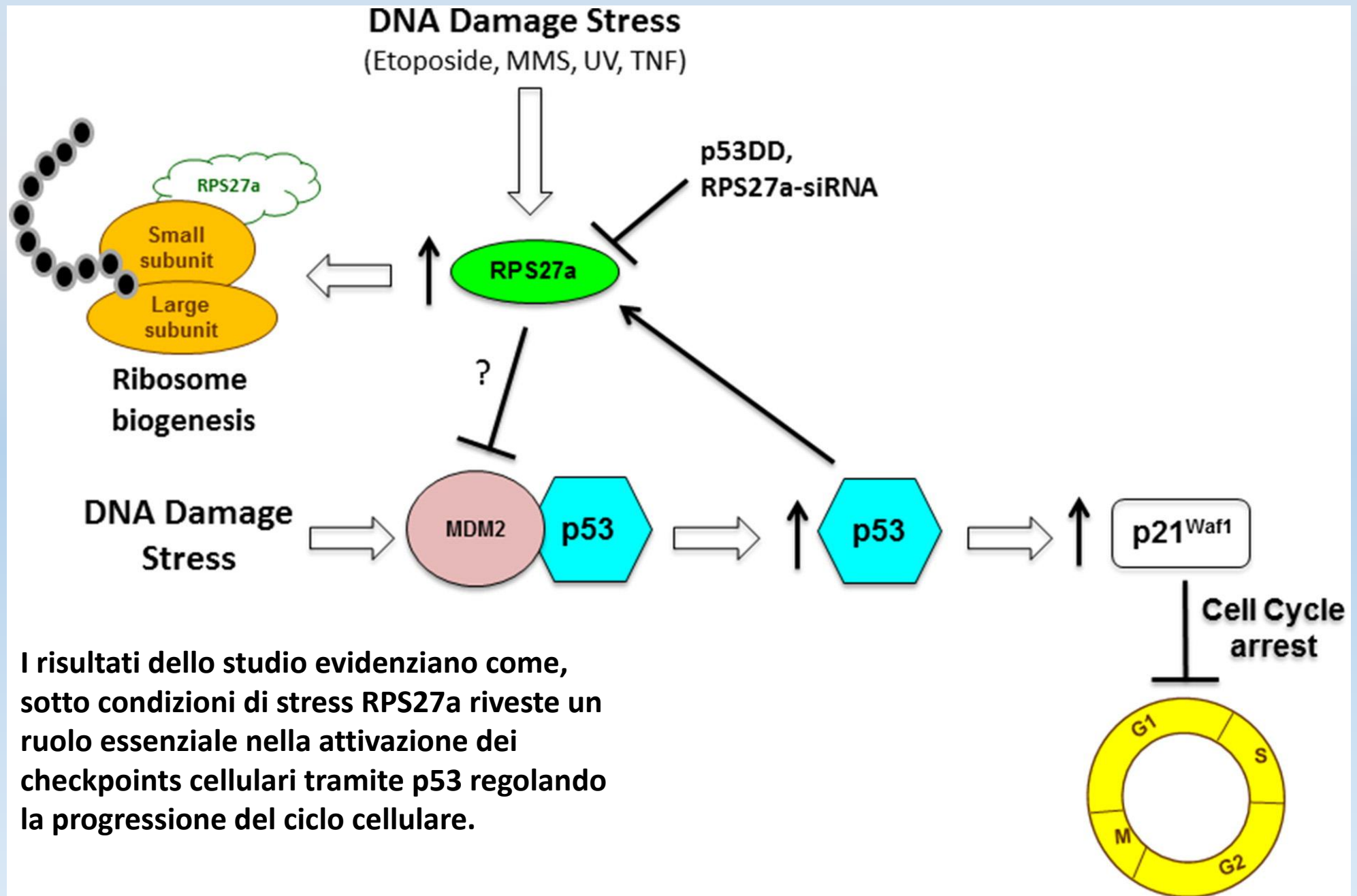


- L'mRNA ARPP è stato usato come controllo interno.

Stato dei segnali mitogenici, proliferativi e marker apoptotici in presenza di RPS27a

- L'analisi dei livelli dei differenti marker delle cellule proliferative e apoptotiche, evidenziano in queste cellule meccanismi di down-regolazione di pERK (protein R-like endoplasmic reticulum kinase), pAKT (protein-kinase B) e ciclina E.
- Al contrario, c'è un marginale incremento nei livelli dei marker pro-apoptotici come p53 fosforilata e Mdm2.
- Questi risultati mettono in evidenza il ruolo di RPS27a come un sensore molecolare che monitora il potenziale di sopravvivenza delle cellule sane e le dirotta verso l'apoptosi in risposta al danno al DNA.





RIASSUNTO ESTESO

Lo studio mette in risalto il ruolo significativo di RPS27a come trasmettitore di segnale tra il danno al DNA e la progressione del ciclo cellulare regolando l'attività di p53 e la biogenesi dei ribosomi, utilizzando geni reporter, qRT-PCR e CHIP.

I dati mostrano un rapido reclutamento di p53 (picco dopo 15 minuti dal trattamento) sul promotore del gene RPS27a in risposta al DDR e evidenziano l'acetilazione dell'istone H3K9ac sul promotore RPS27a sotto trattamento con Etoposide oppure con sovraespressione di p53 (inibita da p53DD)

L'elevata espressione e stabilità di RPS27a sotto condizioni di stress sembra giocare un ruolo significativo nella trasduzione del segnale di p53 sugli effettori a valle come CDK2, p21Waf1 per ritardare o inibire la transizione dalla fase G1 a S.

Gli attivatori del DDR (come Etoposide) o le pathways ARF tumor suppressor (come radiazioni UV) possono indurre l'espressione di RPS27a in entrambi modi ed essere indipendenti l'uno con gli altri.

Quando l'espressione di RPS27a viene arrestata dagli RNA a interferenza anche i livelli di mRNA di p21Waf1 e p53 sono ridotti.

Non sono stati osservati significanti cambiamenti nei livelli dei trascritti di rRNA sotto condizioni sperimentali. Tuttavia, nonostante il DDR regola il metabolismo degli rRNA, si è osservato un marginale declino degli rRNA 5.8S, 18S e 28S sotto trattamento con Etoposide.

Nessun cambiamento degli rRNA 45S è stato misurato in queste condizioni.

Quindi, RPS27a appare essere un nuovo sensore di stress cellulare, che rapidamente si accumula sotto condizioni di stress e agisce come amplificatore della risposta di p53 per arrestare il ciclo cellulare nella fase G1.

Referenze

- Warner, J.R., McIntosh, K.B., 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol. Cell* 34, 3–11.
- Wool, I.G., 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21,164–165.
- Dai, M.S., Lu, H., 2004. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* 279, 44475–44482.
- Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., Lu, H., 2004. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7654–7668.
- Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., Vousden, K.H., 2003. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577–587.
- Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W.A., Xiong, Y., 2003. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8902–8912.
- Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A., Zhang, Y., 2004. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J.* 23, 2402–2412.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., Zhang, Y., 2004. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7669–7680.
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., Kastan, M.B., 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49–63.
- Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B., Oren, M., 2008. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol. Cell* 32, 180–189.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26, 5029–5037.

Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X., Prives, C., 2009. Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol. Cell* 35, 316–326.

Beckerman, R., Prives, C., 2010. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000935.

Ozaki, T., Nakagawara, A., Nagase, H., 2013. RUNX family participates in the regulation of p53-dependent DNA damage response. *Int. J. Genomics* 2013, 271347.

Carvajal, L.A., Manfredi, J.J., 2013. Another fork in the road-life or death decisions by the tumor suppressor p53. *EMBO Rep.* 14, 414–421.

Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T., 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 9, 935–944.

Berkers, C.R., Maddocks, O.D., Cheung, E.C., Mor, I., Vousden, K.H., 2013. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab.* 18, 617–633.

https://www.researchgate.net/publication/292978235/figure/fig7/AS:570793209888768@1513099114169/The-proposed-working-model-elucidating-the-roles-of-NgBR-in-regulating-the_Q640.jpg

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fcontent%2Fpdf%2F10.1007%2Fs11427-016-0018-0.pdf&psig=AOvVaw0rGo1WJJNgQuw876pjJuMI&ust=1606956028955000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCPi0j56Lru0CFQAAAAAdAAAAABAD>

Grazie per l'attenzione.