



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

LO SPLICING E LE SUE ALTERAZIONI NEL PROCESSO DI INVECCHIAMENTO FISILOGICO E
PATOLOGICO

SPLICING AND ITS ALTERATIONS IN THE PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PROCESS

Tesi di Laurea di:
EMANUELA FALCONE

Sessione di ottobre
Anno Accademico 2020-2021

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
ANNA LA TEANA

Il **processo di invecchiamento** consiste in un progressivo declino della forma fisica e della funzionalità degli organi, e rappresenta il preludio della morte in quanto inesorabilmente culmina in questa, anche in assenza di pregresse o concomitanti malattie.

Esso viene misurato attraverso due distinte tipologie di orologi:

**OROLOGIO CRONOLOGICO
DELL'ETÀ:**

conteggia il numero di mesi o anni
dalla nascita

OROLOGIO BIOLOGICO DELL'ETÀ:

rileva lo stato fisiologico e
fenotipico di cellule, tessuti e
organi

L'invecchiamento è associato al deterioramento e alla disorganizzazione dei tessuti a seguito di cambiamenti genomici e cellulari diffusi, tra i quali sono da ricordare:

- Perdita della capacità di rinnovamento delle cellule staminali
- Instabilità genomica
- Alterazioni metaboliche e della comunicazione cellulare
- Perdita di proteostasi
- Logoramento dei telomeri ed alterazioni epigenetiche
- Senescenza cellulare

In base alla presenza di questi cambiamenti, l'invecchiamento si può presentare sotto tre tipi:

1. **OTTIMALE**, con scarsi segni di declino funzionale di tessuti e organi;
2. **FISIOLOGICO**, senza malattie concomitanti;
3. **PATOLOGICO**, associato a malattie e invalidità di vario tipo.

ALTERAZIONI DELLE COMPONENTI REGOLATRICI DELLO SPLICING LEGATE ALL'ETÀ

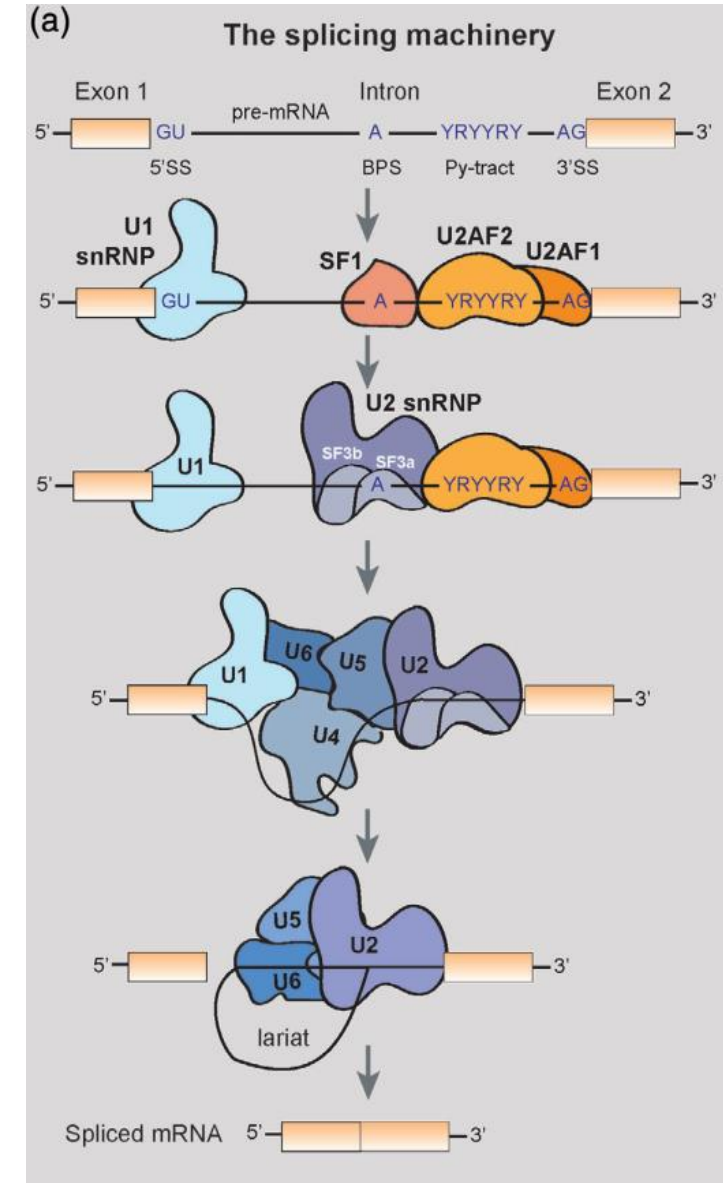
Lo splicing alternativo è un processo a valle del flusso dell'informazione genetica, che ha inizio dalla molecola di DNA, procede con la trascrizione di molecole di mRNA e termina con la traduzione delle stesse in prodotti proteici.

Nello splicing alternativo introni ed esoni possono essere inclusi o saltati nel trascritto maturo di RNA messaggero: tale processo è risultato essere determinante nel corso dell'evoluzione, in quanto ha permesso la **generazione di diversi trascritti di mRNA a partire da uno stesso gene**.

Lo splicing alternativo è un processo finemente regolato da due elementi :

1. SPLICEOSOMA

2. FATTORI DI REGOLAZIONE DELLO SPLICING

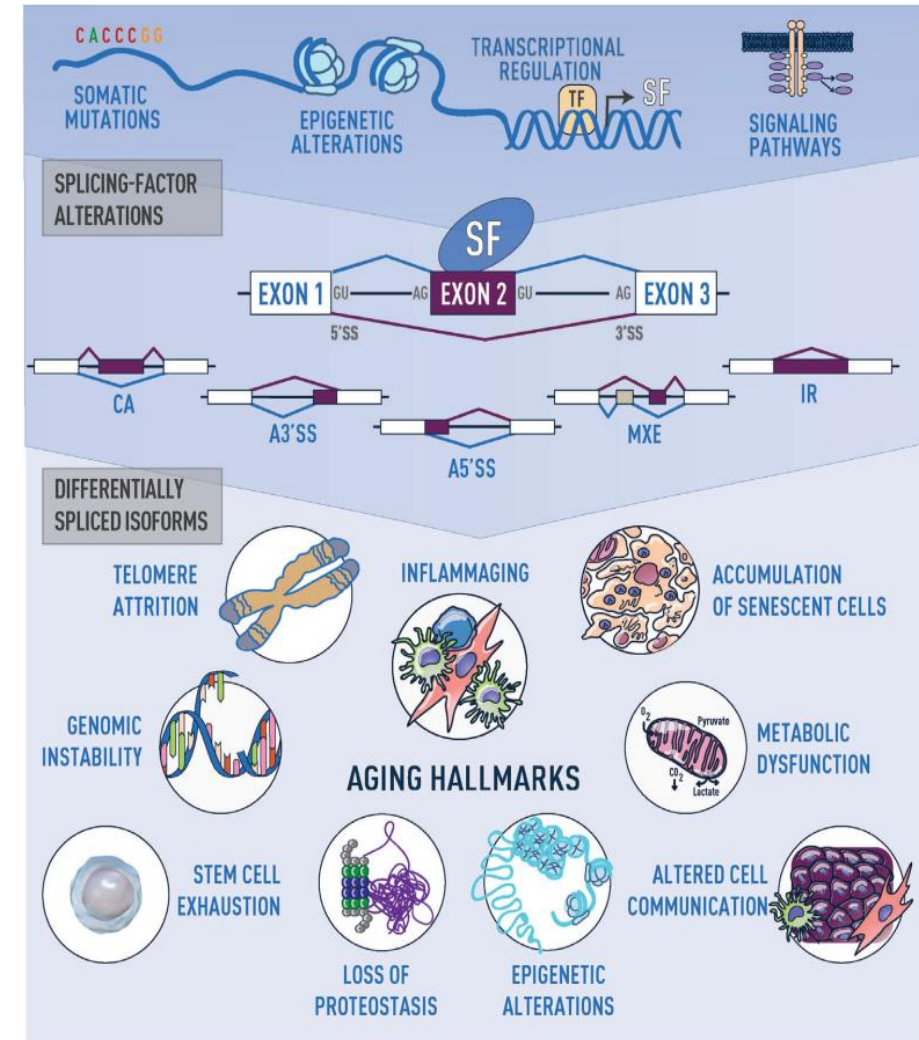


SEGNI DI INVECCHIAMENTO SANO E SPLICING

L'invecchiamento porta a cambiamenti caratteristici a livello cellulare e molecolare e da poco tempo gli studi hanno indirizzato la loro attenzione alla ricerca di un eventuale rapporto tra regolazione genica a livello di mRNA, quindi processo di splicing ed effetti correlati all'età.

CAMBIAMENTI RISCONTRABILI DURANTE L'INVECCHIAMENTO

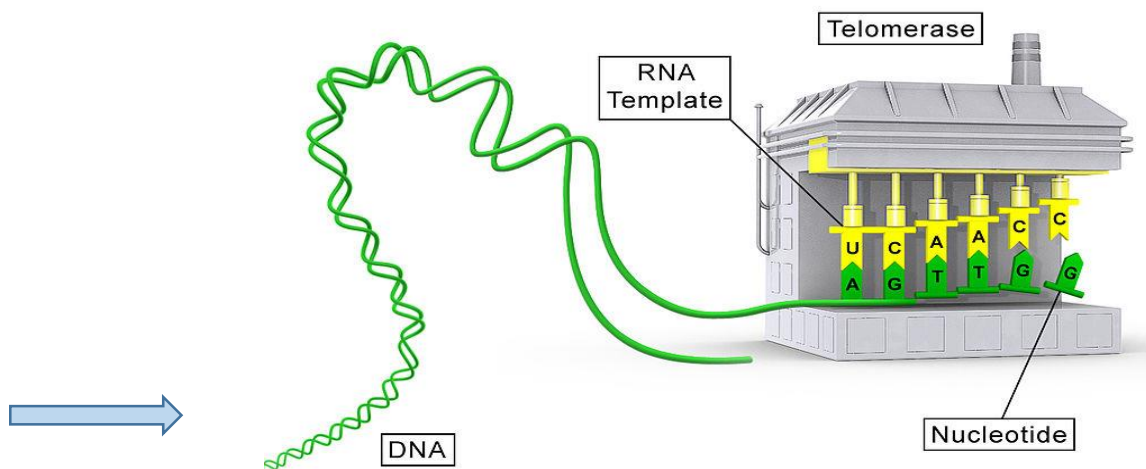
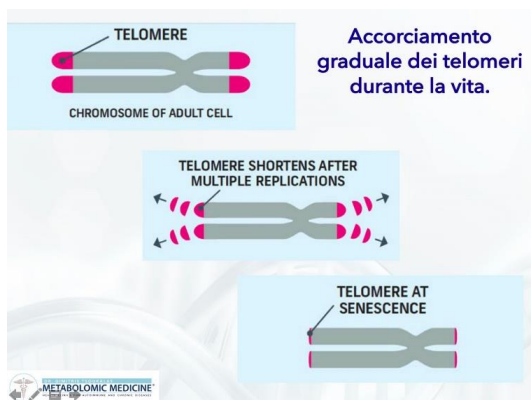
- Disfunzione metabolica e mitocondriale
- Logoramento dei telomeri
- Accumulo di cellule senescenti
- Instabilità genomica
- Infiammazione cronica di basso grado
- Alterazioni epigenetiche
- Alterata comunicazione cellulare
- Perdita di proteostasi



Citiamo alcuni di questi cambiamenti:

1) LOGORAMENTO DEI TELOMERI

- I telomeri preservano le informazioni del nostro genoma, proteggendolo dalla degradazione, ricombinazione, riparazione e fusione intercromosomica.
- I telomeri servono da orologi biologici per determinare la vita della cellula, in quanto ad ogni ciclo replicativo si ha perdita di una porzione di DNA telomerico, fino al raggiungimento di una lunghezza critica al di là della quale la cellula viene indotta a senescenza o apoptosi.

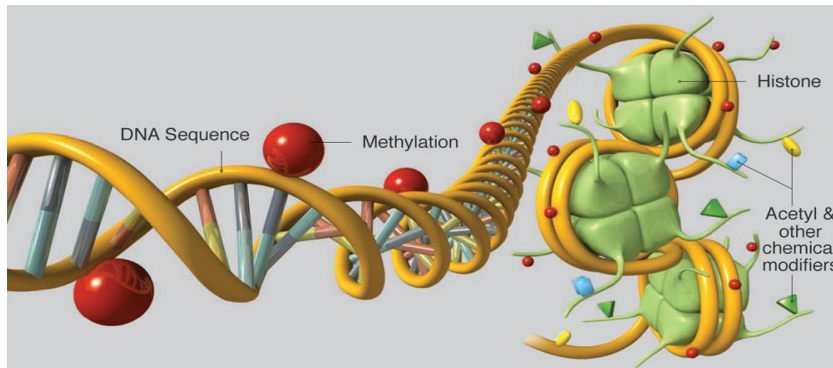


COLLEGAMENTO TRA SPLICING E LOGORAMENTO DEI TELOMERI

Nelle cellule tumorali le telomerasi vengono controllate in modo da mantenere i telomeri mediante sintesi ex novo delle sequenze telomeriche alle estremità. La trascrittasi inversa hTERT, componente della telomerasi, subisce un processo di splicing alternativo che genera 22 isoforme che differiscono nella loro attività. La riattivazione delle telomerasi nelle cellule tumorali è dovuta al coinvolgimento di isoforme di hTERT che portano alla formazione di telomerasi complete.

2) ALTERAZIONI EPIGENETICHE

- Le alterazioni epigenetiche, effetti connessi all'invecchiamento, sono modificazioni chimiche che non alterano la sequenza nucleotidica, ma influiscono su tutti i processi in cui è coinvolta la molecola di DNA;
- Una tra le più note modificazioni epigenetiche è la metilazione, la quale comporta l'aggiunta di gruppi metili in posizione C5 della citosina ad opera di enzimi, quali le metiltransferasi;
- Nei mammiferi il sito principale per la metilazione è costituito dai dinucleotidi CpG e le regioni ricche in CpG, chiamate isole CpG, si trovano spesso vicino ai promotori.



LEGAME TRA METILAZIONE E SPLICING

→ Gli studi effettuati su questa tematica evidenziano la presenza di due modelli principali, i quali descrivono i meccanismi d'azione attraverso cui la metilazione del DNA potrebbe influire sullo splicing:

↙

↘

La metilazione potrebbe reclutare dei fattori di regolazione per i siti di splicing.

La metilazione potrebbe alterare la cinetica della trascrizione e, a causa della natura co-trascrizionale dello splicing, ciò potrebbe incidere sullo splicing alternativo.

SPLICING E MALATTIE CORRELATE ALL'ETÀ

Le modificazioni dello splicing alternativo sono implicate, secondo un nesso causale, in una serie di malattie umane, che si rilevano con maggiore incidenza con l'avanzamento dell'età, tra le quali possono essere citate:

1. Progeria e malattie che mostrano fenotipi di invecchiamento prematuro
2. Cancro
3. Malattie Neurodegenerative

1. PROGERIA (HGPS)

- Si manifesta nei primi anni di vita con sintomi gravi, portando al decesso intorno ai vent'anni per malattie tipiche dell'età senile;
- Una delle forme più comuni è determinata dalla presenza di una mutazione silente nel gene LMNA, sul cromosoma 1, che codifica per la pre-lamina A, necessaria per il processo di trascrizione.



Questa mutazione attiva un sito di splicing criptico, che porterà alla traduzione di un prodotto proteico tronco, chiamato progerina, incapace di svolgere le sue funzioni originarie.

2. CANCRO

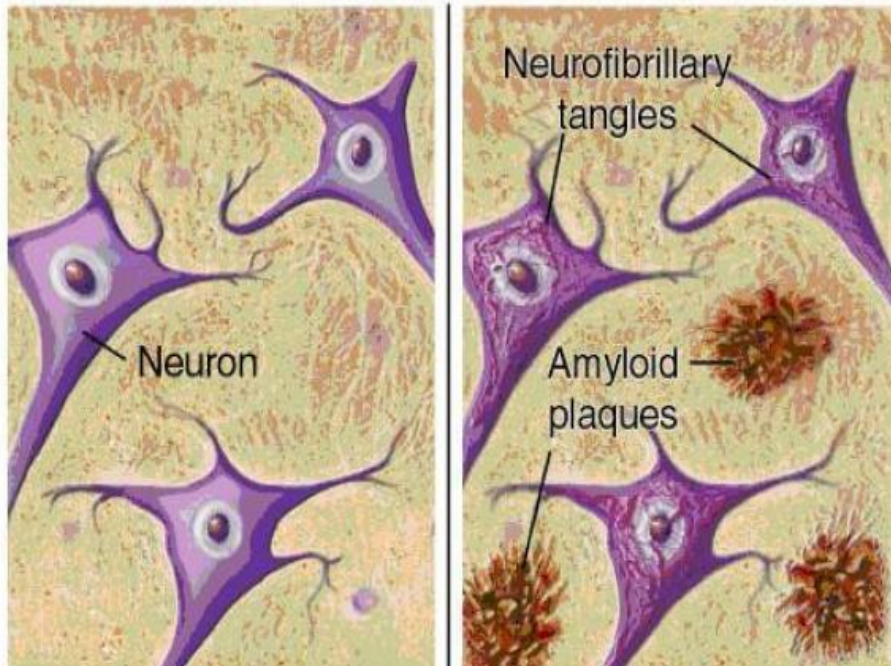
- Il principale fattore di rischio per lo sviluppo del cancro è l'età: di conseguenza esso è considerato una malattia legata all'invecchiamento;
- Una caratteristica comune sia all'invecchiamento che al cancro è la disregolazione del macchinario di splicing:



Le alterazioni nello splicing dell'RNA associate al tumore derivano da mutazioni nei geni che codificano per i fattori di regolazione dello splicing o da cambiamenti nei componenti del macchinario di splicing, che differiscono in base alla natura, liquida o solida, del tumore.

3. MALATTIE NEURODEGENERATIVE: MALATTIA DI ALZHEIMER

- La malattia di Alzheimer è la più frequente causa di demenza negli adulti anziani, con incidenza crescente in funzione dell'età;
- La malattia diventa evidente con l'alterazione delle funzioni cognitive superiori; con il progredire della malattia emergono deficit dell'orientamento visuo-spaziale, di giudizio, di personalità e di linguaggio, fino a che il paziente diventa profondamente disabile, muto ed immobile;

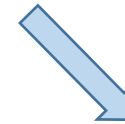


L'anomalia fondamentale nella malattia di Alzheimer è la **deposizione di due proteine** (peptide $A\beta$ e τ) in regioni cerebrali specifiche, probabilmente come risultato di una produzione eccessiva e di un difetto di rimozione.

Le due caratteristiche patologiche della malattia di Alzheimer, particolarmente evidenti negli stadi terminali della malattia, sono:



Le **PLACCHE**: depositi di peptidi $A\beta$ aggregati nella regione compresa tra i vari corpi cellulari dei neuroni.



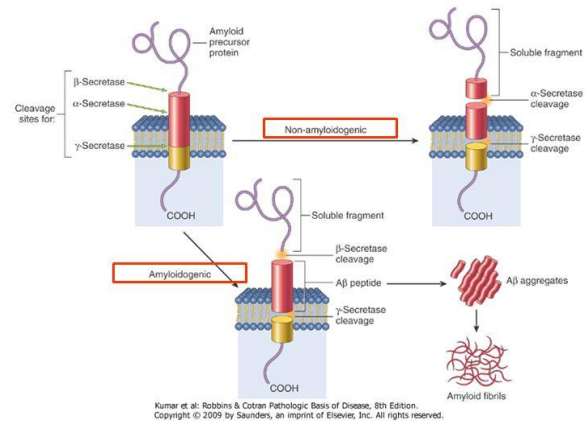
Gli **AMMASSI**: aggregati di proteina τ , che si sviluppano a livello intracellulare e persistono poi a livello extracellulare dopo la morte neuronale.

PROTEINA APP E GENE PRECURSORNE DELLA PROTEINA AMILOIDE

La proteina precursore dell'amiloide è presente sulla superficie cellulare, mentre la porzione A β della proteina si estende dalla regione extracellulare al dominio transmembrana.

Clivaggio dell'APP

Il clivaggio della APP mediante β -secretasi e γ -secretasi in assenza di α -secretasi, determina la produzione di frammenti di amiloide β (A β), che si aggregano in fibrille di amiloide

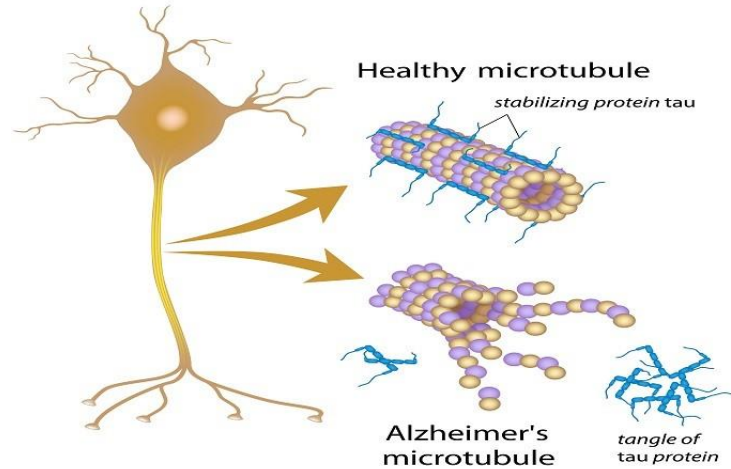


- Il **PEPTIDE A β** si forma mediante scissione proteolitica della proteina APP, processo conosciuto come via amiloidogena;
- A questo punto i monomeri A β sono altamente inclini ad aggregarsi e a formare piccoli **OLIGOMERI**;
- Questi a loro volta formano **AGGREGATI A β** ;
- L'associazione degli aggregati darà origine alle **FIBRILLE AMILOIDI**, che determineranno la formazione delle placche nello spazio extracellulare tra i neuroni.



- Il gene APP che contiene la sequenza che codifica per il dominio A β , è collocato sul cromosoma 21 ed è costituito da 18 esoni;
- Il dominio A β è derivato dalla scissione proteolitica di proteine APP, presenti in 3 isoforme, APP 770, APP 751, APP 695, generate mediante un processo di splicing alternativo;
- L'isoforma APP 695, mancante dell'esone 7, è espressa prevalentemente nei neuroni, mentre quella 751, avente l'esone 7 ma carente dell'8, è espressa in tutti i tessuti.

PROTEINA TAU E SPLICING ALTERNATIVO DEL GENE TAU



- Tau è una proteina microtubulo-associata presente negli assoni;
- La **fosforilazione** della proteina Tau determina due effetti altamente dannosi:



Disassemblaggio della proteina Tau dai microtubuli, in modo che essa perda la sua funzione stabilizzatrice.

Induzione della proteina Tau a formare degli ammassi intracellulari, provocando nella cellula una risposta allo stress.

- Il gene Tau si trova sul cromosoma 17 ed è costituito da 16 esoni;
- Il gene è trascritto in 3 RNA, espressi in maniera differenziale nel sistema nervoso, in base allo stato di maturazione e al tipo di neurone;
- Dal processo di slicing alternativo si ottengono 6 trascritti di mRNA che codificano proteine diverse;
- Lo splicing alternativo del gene Tau si verifica a livello degli esoni 2, 3 e 10 e la sua modalità corrisponde al tipo in cui si verifica esclusione o inclusione dell'esone.



R: Repeat (IKGG5)

BIBLIOGRAFIA

Angarola BL, Anczuków O. Splicing alterations in healthy aging and disease. WIREs RNA. 2021;e1643. <https://doi.org/10.1002/wrna.1643>

J. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick, *Biologia molecolare del gene*, a cura di V. De Pinto e A. Messina, Zanichelli, settima edizione

G. M. Pontieri, *Elementi di patologia generale e fisiopatologia generale*, Piccin, IV edizione

V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, Robbins e Cotran *Le basi patologiche delle malattie*, Masson, nona edizione

Gonzalo Emiliano Aranda Abreu, Sonia Lilia Mestizo Gutiérrez, María Elena Hernández Aguilar and Fausto Rojas Durán (September 28th 2016). Alternative Splicing and Alzheimer's Disease, Update on Dementia, Davide Vito Moretti, IntechOpen, DOI: 10.5772/64513.

Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/52167>

RIFERIMENTI PER LE IMMAGINI

Angarola BL, Anczuków O. Splicing alterations in healthy aging and disease. WIREs RNA. 2021;e1643. <https://doi.org/10.1002/wrna.1643>

J. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick, *Biologia molecolare del gene*, a cura di V. De Pinto e A. Messina, Zanichelli, settima edizione

<https://it.wikipedia.org/wiki/Telomerasi>

https://www.metabolomicmedicine.com/italian/ricercatori_riescono_a_ringiovanire_cellule_invecchiate-na-199.html

<http://www.persongene.com/2019/01/18/la-metilazione-del-dna/>

[.blastingnews.com/salute/2016/11/morbo-di-alzheimer-scoperto-l-enzima-che-rende-innocue-le-placche-amiloidi-001257643.html](http://www.blastingnews.com/salute/2016/11/morbo-di-alzheimer-scoperto-l-enzima-che-rende-innocue-le-placche-amiloidi-001257643.html)

V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, Robbins e Cotran *Le basi patologiche delle malattie*, Masson, nona edizione

Gonzalo Emiliano Aranda Abreu, Sonia Lilia Mestizo Gutiérrez, María Elena Hernández Aguilar and Fausto Rojas Durán (September 28th 2016). Alternative Splicing and Alzheimer's Disease, Update on Dementia, Davide Vito Moretti, IntechOpen, DOI: 10.5772/64513.

Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/52167>

<https://cordis.europa.eu/article/id/411682-the-breakdown-of-clumped-tau-proteins-to-cure-alzheimer-s-disease/it>

RIASSUNTO

Lo splicing alternativo dell'RNA è un passaggio chiave nell'espressione genica che consente la generazione di numerosi trascritti di RNA messaggero che codificano proteine aventi diverse funzioni, a partire dallo stesso gene. Alterazioni nello splicing alternativo dell'RNA sono state osservate sia durante l'invecchiamento in buona salute sia in una serie di malattie umane, molte delle quali manifestano fenotipi di invecchiamento precoce o aumento della loro incidenza con l'età.

Le alterazioni dello splicing associate all'età includono modificazioni nello splicing dei geni associati a tutte le caratteristiche dell'invecchiamento, nonché cambiamenti nell'espressione dei geni del core dello spliceosoma e di quelli dei fattori di regolazione dello splicing, i quali determinano a loro volta dei cambiamenti più a valle nel processo di splicing di altri RNA messaggeri, che codificano per proteine implicate nei normali processi fisiologici delle cellule.



Grazie per l'attenzione
