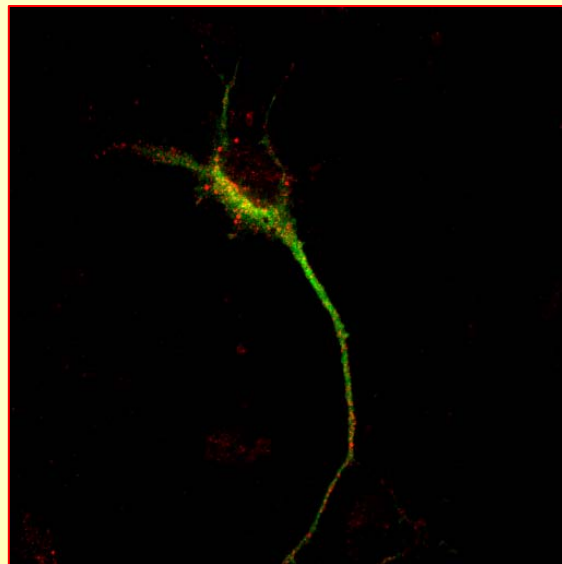




"Ruolo funzionale e localizzazione sub-
cellulare delle proteine Sm e Sm-like
nei neuroni"



Alessandra Di Penta

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze
Ciclo XIX

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

"Ruolo funzionale e localizzazione
sub-cellulare delle proteine Sm e
Sm-like nei neuroni"

Candidato

Alessandra Di Penta

Relatore

Dr. Tilmann Achsel

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze
Ciclo XIX

Indice

Riassunto	III
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Le proteine Sm- e loro funzione	1
1.2 Le proteine Sm-like	12
1.3 P-body e degradazione dell'mRNA	18
1.4 Complesso di SMN	21
1.5 Atrofia Spino Muscolare (SMA)	25
1.5.1 Basi genetiche molecolari della SMA	26
1.5.2 Influenza del numero di copie di SMN2 sul fenotipo SMA	31
1.6 Interazione del complesso SMN con altre proteine	32
1.7 RNA interference	36
2. SCOPO DELLA RICERCA	41
3. MATERIALI E METODI	43
4. RISULTATI	62
4.1 Modello cellulare di SMA	62
4.1.1 <i>Cloni stabili</i>	63
4.1.2 <i>Distribuzione delle proteine Sm e Sm-like in cellule SMN knock-down</i>	68
4.1.3 <i>Distribuzione di NF-H in cellule SMN knock-down</i>	71

4.1.4 <i>Sovra-espressione di SMN in linee di neuroblastoma wt</i>	73
4.2 Ruolo neuronale del complesso LSm1-7	76
4.2.1 <i>Localizzazione cellulare di LSm1 e LSm4 in vitro e in vivo</i>	76
4.2.2 <i>Funzione dei P-body nei neuroni</i>	80
4.2.3 <i>Ruolo di LSm1 nella degradazione dei messaggeri e nel metabolismo delle mRNPs</i>	84
4.2.4 <i>Analisi dello stato dei messaggeri</i>	91
4.2.5 <i>Ruolo di LSm1 nella localizzazione dendritica e/o nella traduzione</i>	93
5. DISCUSSIONE	100
5.1 Effetto della modulazione di SMN sulla localizzazione delle proteine Sm, Sm-like e neurofilamenti	100
5.2 Studio del ruolo neuronale del complesso LSm1-7	104
6. CONCLUSIONI	111
7. BIBLIOGRAFIA	115

RIASSUNTO

L'atrofia spino muscolare (SMA) è la più comune causa genetica di mortalità infantile avente come caratteristica la perdita selettiva degli α motoneuroni. La SMA è causata da mutazioni o delezioni della copia telomerica del gene *survival motor neuron 1 (SMN1)*. SMN gioca un ruolo essenziale nell'assemblaggio e nella rigenerazione delle snRNPs (small nuclear ribinucleoprotein) spliceosomali in tutti i tipi cellulari. Il meccanismo mediante il quale la delezione di SMN è responsabile del difetto neuromuscolare selettivo e la degenerazione specifica dei neuroni motori rimane ancora sconosciuto. Alcune linee di ricerca suggeriscono una funzione addizionale neurone-specifica di SMN. In questo lavoro, abbiamo voluto investigare sul possibile ruolo neuronale specifico di SMN e del ruolo neuronale del complesso LSm1-7, che è noto essere coinvolto nella degradazione degli mRNAs in cellule HeLa e probabilmente richiede SMN per il suo assemblaggio e la sua funzione. Utilizzando la tecnica dell'RNA interference sono state create delle linee stabili di neuroblastoma con bassi livelli di SMN utilizzabili come modelli cellulari di SMA. E' stato osservato che la diminuzione di SMN non abbassa l'efficienza di assemblaggio delle snRNPs e non influenza

l'assemblaggio del complesso LSm1-7. In questi cloni è stata riscontrata una distribuzione citoplasmatica della proteina LSm1 in strutture puntate chiamate P-body osservata anche nelle cellule di controllo ed in altri tipi di linee cellulari. Inoltre, nei cloni SMN knock-down viene osservata una anormale distribuzione di neurofilamenti, i quali si aggregano nel corpo cellulare, indicando che l'abbassamento di SMN influisce sulla localizzazione dei neurofilamenti (NFH). Su linee cellulari wild type di neuroblastoma, esperimenti di sovra-espressione di SMN hanno evidenziato la presenza di aggregati in corpi di inclusione suggerendo una interazione tra SMN e NFH. Anche se questi cloni SMN knock-down presentano caratteristiche tipiche delle malattie che colpiscono i neuroni motori, potrebbero non avere dei livelli di SMN tali da disturbare la biogenesi delle snRNPs. E' possibile che nei neuroni primari esista una differente via di regolazione non caratterizzabile in linee cellulari. Infatti, i nostri studi condotti su neuroni di midollo spinale, cellule del Purkinje e neuroni ippocampali hanno evidenziato un meccanismo di localizzazione dendritica mai osservata in linee cellulari. Per la prima volta è stato osservato che la proteina LSm1 oltre a localizzarsi in strutture puntate coinvolte nella degradazione dei messaggeri (P-body) nel corpo cellulare, si localizza lungo i

dendriti in strutture puntate che non contengono enzimi di degradazione come ad esempio Dcp1a. Inoltre, LSM1 lega specifici mRNA dendritici indicando una sua implicazione nel trasporto dei messaggeri e/o nella locale sintesi proteica. In conclusione, abbiamo dimostrato che LSM1 può formare nuovi complessi con funzioni specifiche neuronali ed ipotizziamo che per tali funzioni possa essere richiesta la presenza di SMN.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le proteine Sm e loro funzione

Le proteine Sm sono un gruppo di sette proteine trovate in tutte le snRNPs spliceosomali (small nuclear ribonucleoproteins) e oltre ad essere richieste per la corretta biogenesi delle snRNPs sono anche necessarie per la loro stabilità. Apparentemente non giocano un ruolo immediato nello splicing ma risultano cruciali per le U snRNP e così per lo splicing dei pre-mRNA.

Le sette proteine Sm sono state ben caratterizzate e sono chiamate B/B', D1, D2, D3, E, F, e G, le quali hanno un intervallo di dimensioni tra 241 (B') e 76 (G) aminoacidi; dunque, le proteine Sm risultano essere piuttosto piccole. B e B' sono prodotti dallo stesso gene per splicing alternativo e differiscono per 11 aminoacidi al loro C-terminale. Le sette proteine Sm contengono un doppio motivo Sm, chiamati motivi Sm1 e Sm2, altamente conservati (Figura 1.1A).

Nel 1999 Kambach et al. hanno risolto la struttura cristallografica di due sub-complessi delle proteine Sm, D1/D2 e D3/B. Le quattro proteine Sm mostrano un comune avvolgimento contenente un corto N-terminale ad α elica seguito da un foglietto β antiparallelo a cinque filamenti. I filamenti 1-3 del foglietto β

sono costituiti da residui all'interno del motivo Sm1, la connessione di lunghezza variabile tra i due motivi forma un loop e i residui del motivo Sm2 costituiscono i filamenti β 4 e 5. I filamenti 2, 3 e 4 sono fortemente piegati. Il filamento 5 si ripiega verso il filamento 1 e la principale interfaccia di interazione di entrambi i complessi contiene il filamento β 4 di un partner (D2 o B) appaiato con il filamento β 5 dell'altro (D1 o D3, rispettivamente), quindi il seguente foglietto β rimane libero per l'interazione con le altre proteine. Le strutture dimeriche di D1/D2 e D3/B mostrano che ogni proteina Sm può avere due vicini: uno con un filamento β 4 e l'altro con un filamento β 5. L'angolo presente fra le due proteine in ciascun dimero permette di chiudere un cerchio con sette membri. Questo porta alla conclusione che le sette proteine Sm formano un anello completo (Figura 1.1B). Le dimensioni della struttura dell'anello è ben correlabile alla morfologia delle proteine Sm legate agli snRNAs. Una possibilità è che i contatti tra le proteine Sm e il sito Sm sull'RNA avvengono sulla superficie interna dell'anello Sm, come suggerito dall'accumulo di residui aminoacidici carichi positivi all'interno dell'anello Sm.

Utilizzando approcci di UV cross-linking combinati con analisi sui siti di cross-linking sono state analizzate le basi molecolari

dell'interazione tra proteine e RNA. E' stato mostrato che alcune proteine Sm contattano il sito Sm sull'RNA e ciò avviene con particolare efficienza per le proteine G e B/B'. La singola sostituzione di 5-bromouridina all'interno della sequenza AAUUUUUGA dell'RNA U4 ha permesso di stabilire che basi distinte di uridine sul sito Sm sono contattate dalle proteine B/B' e G, la prima U è legata da G e la terza da B/B' (Urlaub et al., 2001). La proteina Sm-G potrebbe in seguito essere individuata vicino all'H elica di U1, il punto di partenza del sito Sm. Questa posizione della proteina Sm-G definisce la rotazione dell'anello delle proteine Sm (Stark et al., 2001).

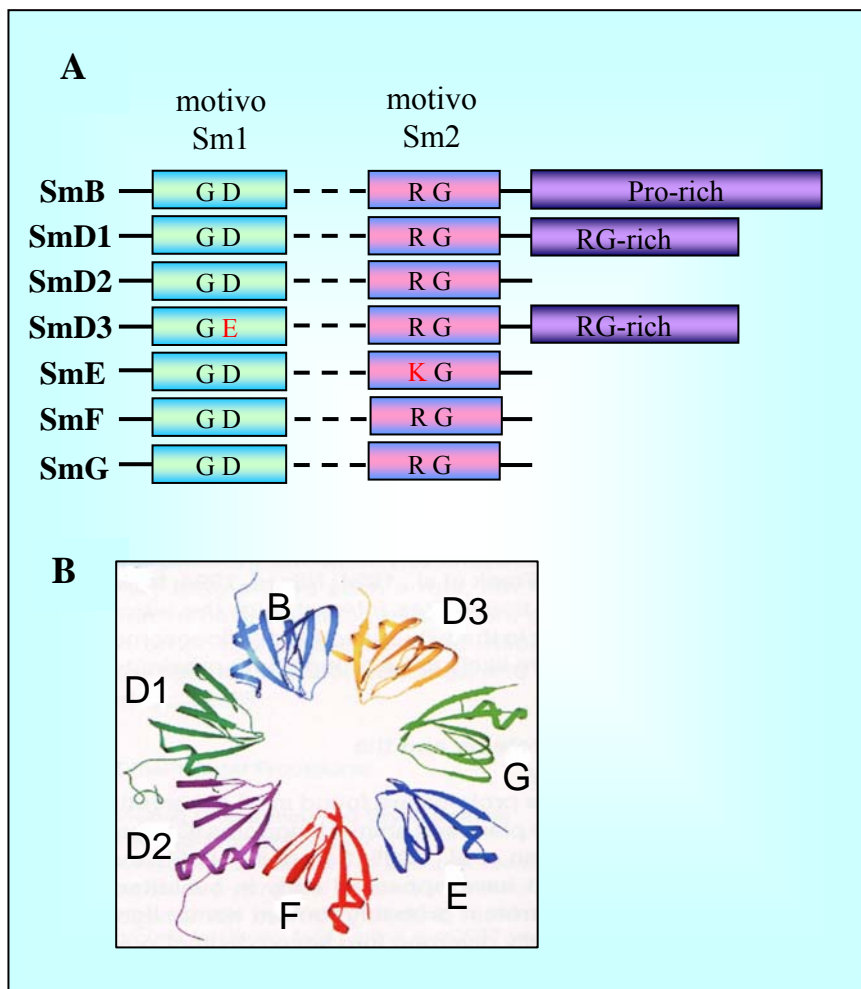


Figura 1.1 Struttura delle proteine Sm. A: rappresentazione schematica dei motivi Sm1 e Sm2. B: modello dell'assemblaggio delle proteine Sm.

La biogenesi delle snRNPs è un processo complesso che avviene in parte nel nucleo e in parte nel citoplasma (Figura 1.2). Dal momento che l'RNA viene trascritto nel nucleo e le proteine tradotte nel citoplasma, i processi di trasporto devono assicurare che tutti i componenti delle RNPs raggiungano il compartimento subcellulare dove avviene l'assemblaggio, ossia il citoplasma. In tale compartimento inizia l'assemblaggio e può essere soggetto a regolazione e/o assistenza. Ad eccezione di U6, tutti gli snRNAs spliceosomali vengono trascritti dalla RNA polimerasi II come precursori contenenti nucleotidi aggiuntivi al 3' e un Cap monometilato (m^7G) al 5'. Il Cap viene riconosciuto da un fattore di legame, Cap-binding complex (CBC), costituito da un eterodimero composto da due subunità, CBC20 e CBC80 (Izaurre et al., 1995), necessarie per il legame al Cap m^7G . La proteina adattatrice PHAX (*phosphorylated adaptor for RNA export*) lega sia CBC che gli snRNAs mediando l'interazione con il recettore nucleare di esporto CRM1/Exportina1 (Xpo1). Oltre alla fosforilazione di PHAX è richiesto il reclutamento di RanGTP su CRM1 per formare il complesso maturo per l'esporto degli snRNAs. Appena gli snRNAs sono nel citoplasma, l'idrolisi del GTP e la defosforilazione di PHAX portano al disassemblaggio del complesso. A questo punto gli snRNA si associano con il

complesso di SMN (Survival Motor Neurons) composto dalla proteina SMN e altre sei proteine chiamate Gemins2-7 (Gubitz et al., 2004). In complesso di SMN dirige il corretto assemblaggio delle 7 proteine Sm sul sito Sm delle snRNAs. Inoltre, il complesso di SMN contenente le proteine Sm media lo specifico assemblaggio del complesso Sm di U1, U2, U4 e U5 snRNAs (Pellizzoni et al., 2002).

Dopo che il complesso Sm è assemblato, con l'assistenza del complesso di SMN, il 5' m⁷G Cap è ipermetilato a trimetil guanosina (m₃G) e al 3' termine degli snRNAs vengono rimossi alcuni nucleotidi. Questo step dipende dalla giusta associazione delle proteine Sm con gli snRNAs. Infine, le U snRNPs mature sono importate nel nucleo attraverso vie di importo nucleare specifiche per le snRNPs.

L'importo nucleare delle molecole richiede segnali specifici sulle molecole da importare e recettori specifici che riconoscono il segnale e portano le molecole attraverso il complesso del poro nucleare (NPC). Sono stati identificati diversi segnali e recettori di trasporto che mediano differenti vie di trasporto nucleare (Fried e Kutay 2003). Il primo identificato e meglio caratterizzato è un segnale di importo costituito da 1 o 2 corte regioni di aminoacidi basici chiamate segnale di localizzazione nucleare classico

(cNLSs). Il recettore per la via di importo cNLS è costituito da due proteine, α e β importina. Il cNLS è riconosciuto dall' α importina la quale agisce da proteina adattatore tra la proteina contenente il cNLS e la β importina.

Le U snRNPs possono entrare nel nucleo attraverso due vie di importo nucleare distinte. Nella prima, meglio caratterizzata, le U snRNPs usano il Cap m_3G come segnale di importo nucleare. La seconda via di importo è costituita dal dominio Sm assemblato sul sito Sm delle U snRNPs. Le due vie collaborano sempre, ma a seconda di quale via presenta il segnale più forte l'importo nucleare può seguire una via o l'altra, dipendente inoltre dal tipo e dalla specie di U snRNPs. Per esempio, mentre l'importo nucleare di U1 e U2 snRNPs negli oociti di *Xenopus* richiede un intatto Cap m_3G , per U4 e U5 non è richiesto (Marshallsay e Lührmann, 1994).

A differenza della via di importo nucleare attraverso il complesso Sm, l'importo dipendente dal Cap m_3G è stato caratterizzato in dettaglio. L'adattatore SPN1 lega in modo specifico il segnale Cap m_3G e la β importina media l'importo nucleare delle U snRNPs. SPN1 contiene 2 domini: il C-terminale, che interagisce con il Cap m_3G , e l'N-terminale (il dominio di legame alla β importina o IBB) che lega la β importina. Successivamente la β

importina media l'interazione con NPC e trasloca il complesso di importo delle U snRNPs attraverso l'NPC.

In ogni caso, entrambe le vie di importo nucleare richiedono la β importina. La proteina snurportina 1 (SPN1) è stata identificata come adattatore per la via di importo nucleare dipendente dal Cap m_3G , mentre l'adattatore per l'importo attraverso il complesso Sm non è stato ancora identificato. Tuttavia, studi condotti da Narayanan et al. nel 2004 hanno rilevato che la mancanza della β importina abolisce l'importo di SMN, indicando che la β importina è il recettore analogo di importo per SMN ed entrambe le vie di importo avvengono insieme.

Il "classico" complesso NLS, importin α -importin β -RanGTP, viene dissolto dall'azione della RanGAP (GTPase activating protein) Rcc1, la quale converte RanGTP in RanGDP. Il fattore di cambio GDP/GTP (RanGEF, Ran guanyl exchange factor) si trova nel citoplasma. In questo modo si esaurisce il RanGTP si esaurisce nel nucleo e si viene a creare un gradiente RanGTP/RanGDP che controlla il traffico delle molecole che vengono importate (Izaurralde et al., 1997). Ad ogni modo, per la via di importo mediato dal Cap m_3G sembra essere differente. E' stato recentemente dimostrato da Huber et al. (2002) e confermato da Rollenhagen et al. (2003) che la via di importo dipendente dal

Cap m₃G richiede la β importina ma non Ran o energia (Figura 1.3).

Le proteine Sm sono state trovate in tutti gli eucarioti associate con U1, U2, U4 e U5 snRNAs; l'altro snRNA spliceosomale, U6, non è direttamente legato dalle proteine Sm. A differenza delle altre U snRNAs, U6 è prodotto dall'RNA polimerasi III ed è trattenuto nel nucleo. Tuttavia studi condotti su *Saccharomyces cerevisiae* hanno identificato due proteine contenenti domini Sm che si associano con U6 snRNAs (Séraphin, 1995). Analisi di sequenza del genoma di lievito hanno rilevato l'esistenza di 8 proteine Sm-like.

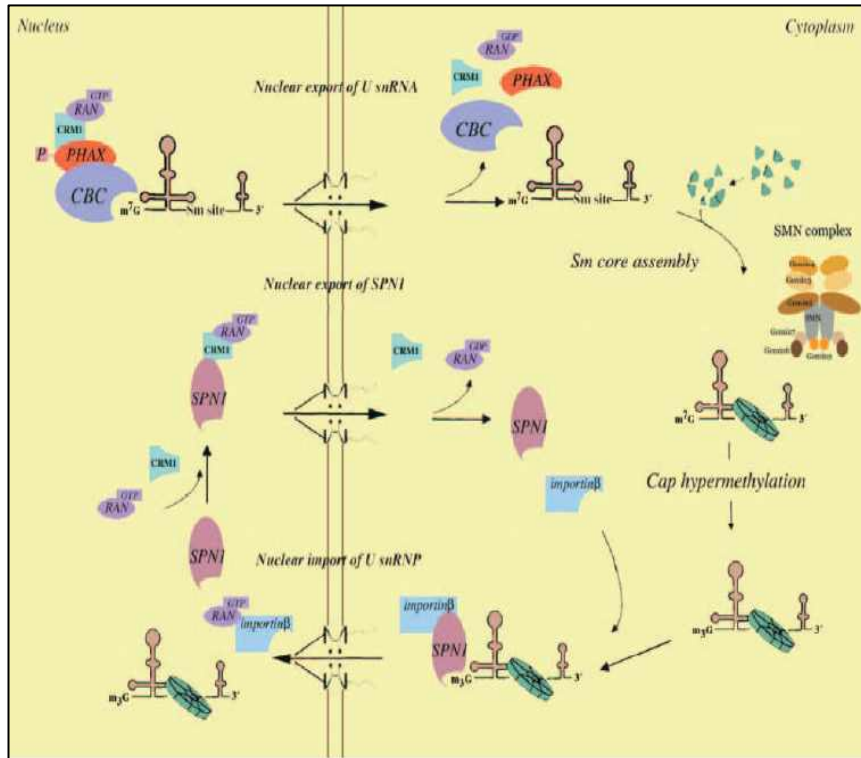


Figura 1.2. Ruolo del trasporto nucleare nella biogenesi delle snRNPs. La formazione dell'U snRNP matura richiede l'esporto nucleare della U snRNP, l'assemblaggio del *core* delle proteine Sm nel citoplasma, il processamento dell'RNA nel citoplasma, e l'importo nucleare della U snRNP matura. L'esporto nucleare della U snRNP è mediato dal recettore di esporto nucleare CRM1 con l'assistenza del complesso di Cap-binding CBC e l'adattatore PHAX. L'importo nucleare della U snRNP matura è mediato dalla β importina con l'aiuto dell'adattatore SPN1, il quale è anche esportato dal nucleo da CRM1. L'U snRNP può anche entrare nel nucleo usando come segnale il *core* Sm. Figura tratta da Rollenhagen e Pantè 2006.

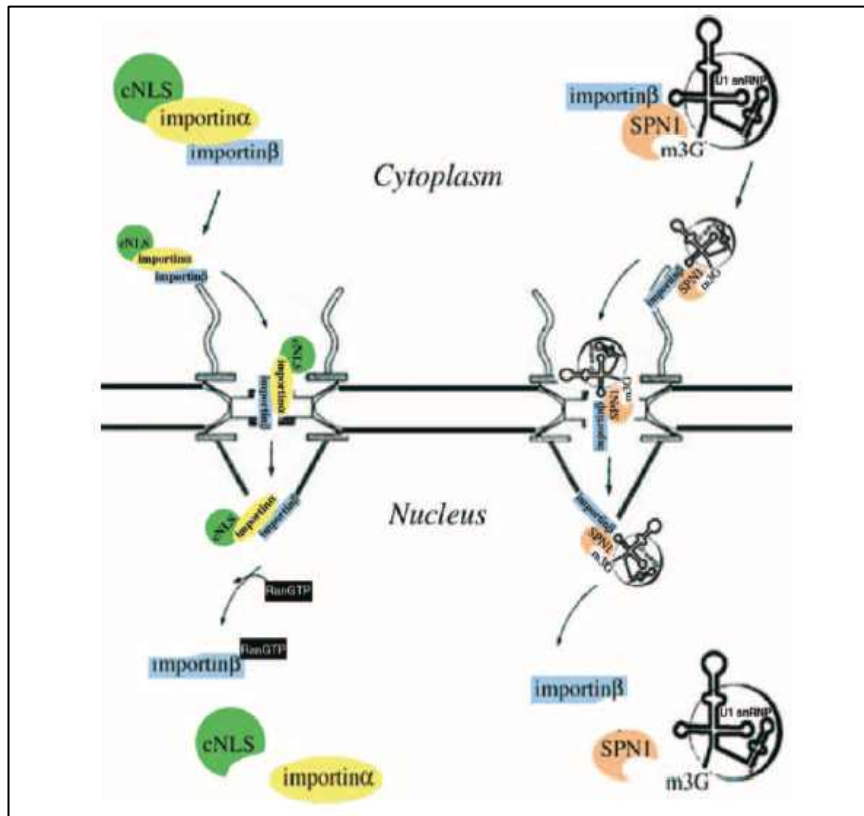


Figura 1.3. Confronto tra le vie di importo nucleare Cap m3G e cNLS. Entrambe le vie sono mediate dal recettore di trasporto, β importina, che interagisce con il complesso del poro nucleare (NPC). L'adattatore che riconosce il segnale di importo e richiede Ran ed energia per dissociare il complesso importato distingue le due vie. Figura tratta da Rollenhagen e Pantè 2006).

1.2 Le proteine Sm-like

Le proteine like-Sm (LSm) contengono, come le proteine Sm, due motivi Sm (Sm1 e Sm2) altamente conservati.

Le prime proteine Sm-like ad essere state identificate in complessi coinvolti in diversi processi cellulari sono le LSm da 1 a 8 (Figura 1.4). Le proteine LSm da 2 a 8 si associano con U6 snRNA e sono necessarie per la sua stabilità. Inoltre, le LSm2-8 interagiscono per formare un complesso stabile senza RNA che è simile al complesso Sm snRNPs. Il complesso LSm2-8 si lega ad un motivo UUUUUUp che forma il 3' termine di U6 snRNA. Questo rimane associato a U6 fino a quando non si associa con U4 nel di-snRNP U4/U6 come anche nel tri-snRNP U4/U6·U5 (Salgano-Garrio et al., 1999).

Anche se LSm1 non si associa a U6 interagisce con altre proteine LSm. Inoltre, LSm1 interagisce con proteine citoplasmatiche coinvolte nella degradazione dell'mRNA, indicando l'esistenza di un complesso citoplasmatico alternativo coinvolto nel turnover degli mRNA. Effettivamente, ci sono almeno due complessi: LSm2-8, il quale è nucleare e si associa con U6 snRNA, e LSm1-7 che ha localizzazione citoplasmatica (in strutture chiamate P-body) ed è coinvolto nella degradazione dei messaggeri.

Le proteine LSm formano un complesso eptamerico ad anello come le proteine Sm. Anche se ancora non si conosce la precisa organizzazione, studi genetici in lievito e analisi di trasferimento energetico per risonanza (FRET) in cellule umane, supportano l'ipotesi che le proteine LSm formino complessi ad anello composti da sette proteine (Ingelfinger et al., 2002).

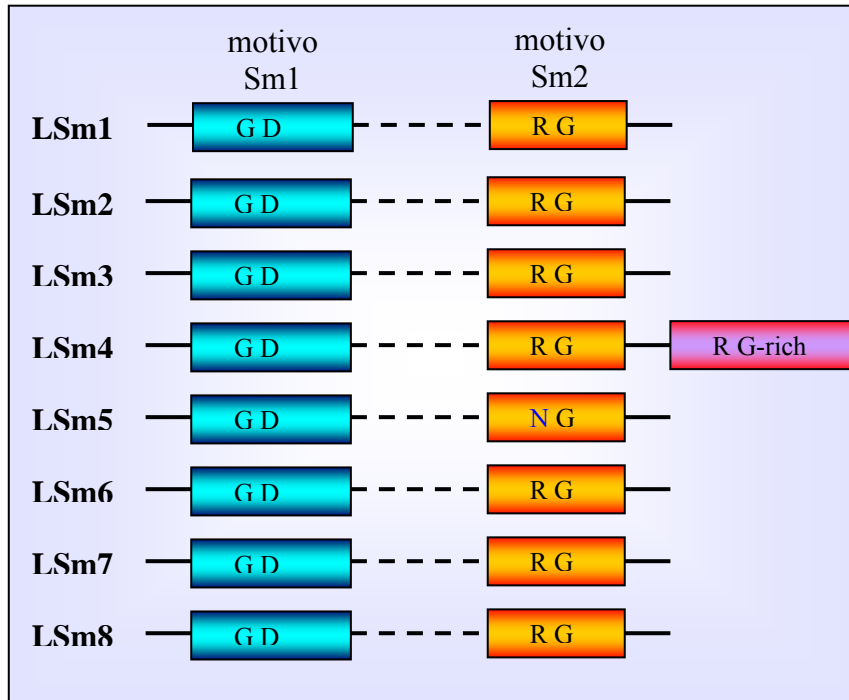


Figura 1.4. Le otto proteine LSm. Rappresentazione schematica dei motivi conservati Sm1 e Sm2.

Le proteine LSm, specialmente le LSm2-5 e LSm8, sono coinvolte nel processamento dei pre-tRNAs, pre-snoRNAs e dei pre-rRNAs. In particolare, le proteine LSm funzionano da chaperoni che facilitano l'associazione dei fattori coinvolti nel processamento dei preRNA con i loro substrati. Inoltre, le proteine LSm potrebbero avere un ruolo nel mantenimento dell'ordine degli eventi di processamento dei pre-rRNAs, facilitare le interazioni proteina-RNA e i cambiamenti strutturali richiesti durante l'assemblaggio delle subunità ribosomali.

In tutti gli studi condotti in lievito, sull'influenza delle proteine LSm sulla stabilità degli RNAs nucleari (ad eccezione di U6) gli effetti delle proteine LSm6 e LSm7 sono minimi o assenti. E' possibile che LSm6 e 7 possono essere sostituite da altre proteine LSm o da proteine Sm in complessi che rimangono almeno parzialmente attivi. Quindi non è chiaro se il complesso LSm2-8 funziona normalmente in questi processi o se esistono complessi alternativi in cui LSm6 e LSm7 sono sostituiti da altre proteine che conferiscono specificità alle vie di processamento (Figura 1.5).

In lievito, l'interazione delle proteine LSm con due proteine citoplasmatiche coinvolte nella degradazione degli mRNA (Dcp1p/Dcp2p e Xrn1p) o nel turnover dei messaggeri (Xrn1p e

Pat1/Mrt1p) suggerisce un ruolo per le proteine LSM nella degradazione degli mRNAs (Figura 1.5). Studi sulla stabilità dei messaggeri hanno mostrato che l'assenza di LSM da 1 a 7, ma non quella di LSM8, incrementa la stabilità degli mRNAs. Questo conduce alla dimostrazione della presenza di separati complessi LSM citoplasmatici che sono richiesti per la rimozione del 5'-Cap dell'mRNA, quindi facilitando la degradazione 5'→3' del messaggero nella via di turnover degli mRNA dipendente dalla deadenilazione.

Ad oggi, sono state identificate più di 16 famiglie di proteine Sm-like contenenti i domini Sm, le quali appaiono filogeneticamente conservate in tutti gli eucarioti (Albrecht e Lengauer, 2004). Una delle proteine appartenenti alla famiglia di LSM14 è RAP55 la quale è localizzata, in colture di cellule umane, nei P-body dove è un costituente essenziale.

Esperimenti di purificazione per affinità hanno permesso di stabilire che LSM12 è un buon candidato per legare le proteine coinvolte nel processamento dell'RNA, PBP1 e PBP4 (Fleischer et al., 2006). Inoltre, è stato osservato che l'N-terminale di LSM11 contribuisce al processamento dell'RNA istonico e che LSM10 è molto importante per la funzione e per la localizzazione subcellulare di U7 snRNPs (Azzouz et al., 2005). E' stato

osservato che le proteine D1/D2 nel complesso di SMN possono essere sostituite dalle proteine Sm-like 10 e 11 andando a formare due distinti complessi. Quando il complesso di SMN contiene LSm10 e 11 media l'assemblaggio di U7 snRNP mentre quando contiene solo le sette proteine Sm canoniche il complesso perde questa funzione (Pillai et al., 2003).

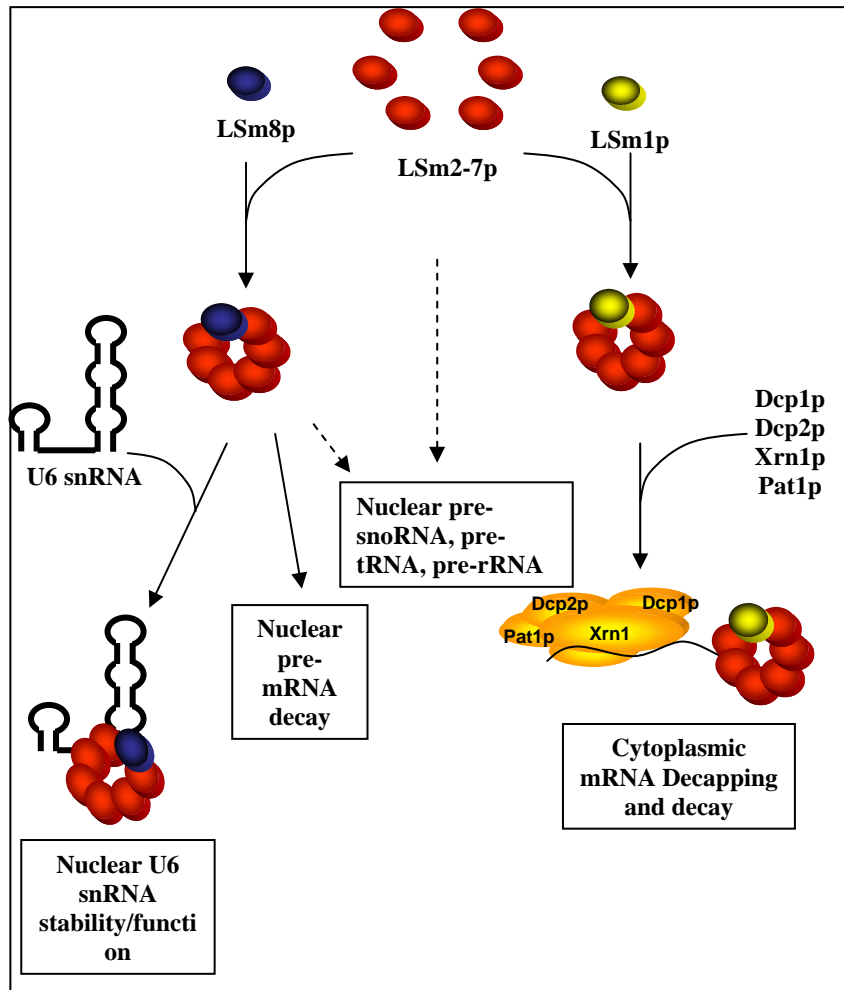


Figura 1.5. Funzione dei due complessi delle proteine LSM. Rappresentazione schematica di come le proteine LSM in *S. cerevisiae* interagiscono tra loro e con altri fattori per partecipare a differenti processi cellulari. La composizione dei complessi LSM coinvolti nel processamento dei pre-snoRNA, pre-tRNA e pre-rRNA sono incerti, come indicato dalle frecce tratteggiate. Figura tratta da Beggs, 2005.

1.3 P-body e degradazione dell'mRNA

I P-body sono stati in principio trovati come *foci* distinti nel citoplasma di cellule HeLa contenenti fattori coinvolti nell'accumulo di mRNA che devono essere degradati. La degradazione degli mRNA negli eucarioti può procedere attraverso due differenti vie. In un caso, il messaggero viene digerito dal 3' al 5' da enzimi esonucleolitici e nell'altro, la perdita della poli-A o il riconoscimento di un codone di stop prematuro porta alla rimozione del Cap al 5' e la conseguente degradazione esonucleolitica dal 5' al 3' (Mayer et al., 2004). Almeno in lievito, questa seconda via sembra essere quella più importante ed è quella che avviene nei P-body. In questa via prendono parte alla degradazione dell'mRNA gli enzimi di rimozione del Cap presenti con due subunità Dcp1p e Dcp2p e l'enzima con attività esonucleolitica, e insieme ai loro omologhi umani, hDcp1a, hDcp2 e hXrn1 sono presenti rispettivamente nei P-body di lievito e di cellule HeLa. Inoltre, nei P-body sono anche presenti fattori ausiliari coinvolti nella via di degradazione degli mRNA in lievito, chiamati Pat1p, Dhh1p, e le proteine LSM da 1p a 7p, e le rispettive proteine omologhe umane hDhh1p/rck, e hLSM da 1 a 7 (Ingelfinger et al., 2002; Lykke-Andersen, 2002; Tharun et al., 2000; Van Dijk et al., 2002). Una serie di studi fatti

in lievito hanno mostrato che la degradazione degli mRNA ha luogo nei P-body (Sheth e Parker, 2003) e ciò è stato confermato anche per le controparti di mammifero (Cougot et al., 2004). Tra i diversi fattori ausiliari, le proteine LSM da 1 a 7 si associano al messaggero che deve essere degradato (Tharun e Parker, 2001), sono inoltre richieste per la corretta rimozione del Cap in lievito (Boeck et al., 1998) e sono cruciali per l'integrità dei P-body in cellule umane HeLa (Andrei et al., 2005).

Oltre alla degradazione degli mRNA, i P-body di lievito sembrano essere anche i siti dove i messaggeri sono traduzionalmente silenziati e quando sono ri-attivati vengono rilasciati dai P-body per essere tradotti (Bregues et al., 2005). Di conseguenza, i P-body possono contenere fattori implicati nel controllo traduzionale, come ad esempio eIF4E, che è la proteina che lega il Cap e serve come sito di contatto per l'inizio della traduzione, e l'eIF4E-T che ha un effetto inibitorio sull'attività di eIF4E (Andrei et al., 2005; Ferraiuolo et al., 2005). I P-body contengono anche fattori cruciali nella via dei micro RNA (miRNA), come ad esempio la proteina Argonauta Ago2 (Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Pillai et al., 2005), o la proteina GW182 (Eystathioy et al., 2003; Rehwinkel et al., 2005). Il fatto che i P-body hanno un ruolo

nel silenziamento post-trascrizionale suggerisce la presenza di proteine Argonaute.

I miRNA si associano con i messaggeri target portando anche alla loro destabilizzazione (Bagga et al., 2005); comunque, in molti casi il risultato è il silenziamento traduzionale che avviene negli step iniziali (Humphreys et al., 2005), o dopo la fase di inizio (Petersen et al., 2006). Riassumendo, i P-body sono punti di controllo traduzionale che contengono i macchinari necessari per l'inibizione della traduzione e la degradazione degli mRNA. Come già accennato i P-body contengono anche la proteina LSM RAP55 (Yang et al., 2006) ma non è ancora chiaro quale sia la sua funzione nel controllo della traduzione e/o nella degradazione degli mRNA. Il silenziamento traduzionale di alcuni messaggeri è molto importante per le funzioni specifiche di alcune cellule altamente specializzate, come ad esempio gli oociti e i neuroni. Negli insetti e negli oociti di anfibio gli mRNA materni sono mantenuti in granuli per essere attivati a precisi momenti durante lo sviluppo precoce. Diversi fattori dei P-body sono considerati essere implicati in questi processi, come Dhh1 (Minshall et al., 2001; Nakamura et al., 2001), RAP55 (Lieb et al., 1998) e eIF4E-T (Nakamura et al., 2004).

In cellule di mammifero, l'esposizione a stress ambientali determina la formazione di strutture citoplasmatiche chiamate "granuli di stress", i quali agiscono da stoccaggio per gli mRNA (Kedersha e Andersen, 2004). I granuli di stress contengono oltre agli mRNA, fattori coinvolti nell'inizio della traduzione, le proteine che legano gli mRNA TIA e TIAR, e la subunità ribosomiale 40S. Esiste una complessa relazione tra P-body e granuli di stress. Ad esempio, lo stress indotto da arsenico induce la formazione dei granuli di stress e i P-body vengono osservati nelle loro vicinanze (Kedersha et al., 2005; Yu et al., 2005). La fisiologica relazione tra i granuli di stress e i P-body suggerisce che queste strutture potrebbero funzionare insieme. Per esempio, un subset di mRNA stoccati nei granuli di stress potrebbero essere trasferiti nei P-body per la degradazione. Il meccanismo mediante il quale i messaggeri vengono trasferiti tra le due strutture rimane ancora poco chiaro.

1.4 Complesso di SMN

La proteina SMN è espressa in tutti gli eucarioti, eccetto *Saccoromices cerevisiae*, e in tutte le cellule degli organismi vertebrati. SMN è una proteina di 294 aminoacidi ed è

particolarmente espressa ad alti livelli in cellule neuronali dove è concentrata in distinte strutture nucleari (Gems), spesso associate ai Cajal bodies.

I Cajal bodies contengono alti livelli di fattori coinvolti nella trascrizione e nel processamento di molti RNA nucleari, inclusi le snRNPs, le ribonucleoproteine nucleolari (snoRNPs) e le tre RNA polimerasi eucariotiche. Esperimenti di co-localizzazione rivelano che le Gems e i Cajal bodies co-localizzano in alcune linee cellulari e in tessuti adulti ma sono separate in tessuti fetali, indicando che sono distinte strutture nucleari che hanno una relazione funzionale dinamica. L'interazione tra le Gems e i Cajal bodies può essere mediata da SMN (Hebert et al., 2001).

SMN forma un complesso stabile con un gruppo di proteine chiamate Gemins. Queste includono Gemin2 (chiamata in passato SIP1), Gemin3/DP103 (un RNA elicasi che appartiene alla famiglia DEAD-box), Gemin4, Gemin5/p175 (una proteina con ripetizioni WD), Gemin6 e Gemin7 (Figura 1.6). Le Gemins co-localizzano con SMN nelle Gems e sono presenti ovunque nel citoplasma, anche se sono presenti a bassi livelli nel nucleoplasma. Gemin4 è la sola proteina del complesso di SMN che localizza anche nel nucleolo (Charroux et al., 2000). Sulla base della loro stabile associazione con SMN, le Gemins possono

essere considerate componenti integranti del complesso di SMN. Gemin2, 3, 5 e 7 interagiscono direttamente con SMN, mentre Gemin4 e Gemin6 richiedono rispettivamente il legame di Gemin3 e Gemin7 per l'associazione con il complesso di SMN. I più pronunciati motivi strutturali dentro le sequenze aminoacidiche delle Geminins sono il motivo DEAD-box in Gemin3 e una ripetizione di 13 WD in Gemin5. E' probabile che l'attività elicastica e la predetta attività ATPasica di Gemin3 sono critiche per il complesso di SMN per funzionare nell'assemblaggio delle snRNPs. La presenza di ripetizioni multiple WD in Gemin5 implica che questa proteina può avere multiple interazioni proteiche e servire inoltre come piattaforma per l'assemblaggio di complessi proteici (Gubitzi et al., 2004).

Oltre i gemins, molti interattori del complesso di SMN sono stati identificati. Sono costituenti di vari complessi RNP e contengono domini di sequenze arricchite in residui di arginina e glicina. Questi domini RG-box mediano il legame al complesso di SMN e possono spiegare come il complesso riconosce differenti substrati. Modificazioni di specifici residui di arginina dentro i domini RG aumentano l'affinità di questi substrati per SMN. Questa modificazione post-traduzionale, è mediata dal metilosoma

il quale contiene la metil transferasi JBP1/PRMT5, pICln e MEP50.

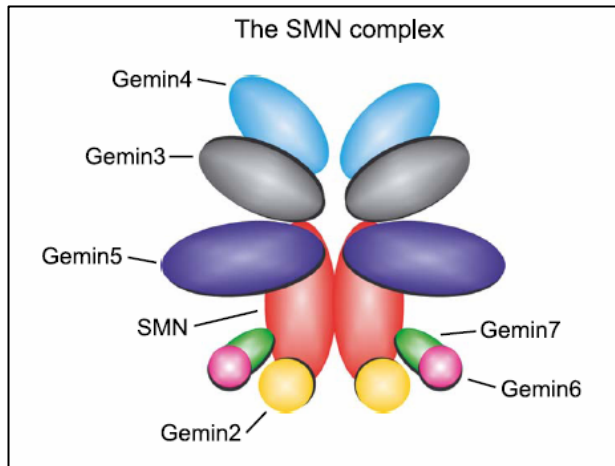


Figura 1.6. Il complesso di SMN. Rappresentazione schematica del complesso di SMN. Gemin2, 3, 5 e 7 legano direttamente SMN, mentre Gemin4 e Gemin6 sono associate attraverso interazioni con Gemin2 e 7, rispettivamente. Per semplicità, il complesso di SMN è illustrato come dimero sebbene è più probabile che abbia una struttura oligomerica.

1.5 Atrofia spino muscolare (SMA)

L'atrofia spino muscolare (SMA) è una malattia autosomica recessiva con una incidenza di 1:6000. E' la più comune causa genetica di mortalità infantile avente come caratteristica la progressiva perdita degli α motoneuroni nelle corna anteriori del midollo spinale, la quale porta ad una progressiva atrofia dei muscoli volontari.

Poiché la gravità della malattia è altamente variabile, il Consorzio Internazionale della SMA ha definito 4 gruppi clinici che dipendono dall'età e dalla abilità motoria:

SMA di tipo I (forma acuta): è la forma più grave con debolezza muscolare generalizzata e ipotonia ("bambini molli") e si sviluppa entro i primi 6 mesi di vita. I bambini non sono in grado di rimanere seduti o di camminare e generalmente muoiono entro i primi due anni di vita.

SMA di tipo II (forma intermedia): i pazienti sono in grado di sedersi ma non sono abili a camminare senza aiuto, presentando di solito i primi sintomi dopo i sei mesi di vita e sopravvivendo oltre i due anni.

SMA di tipo III (SMA giovanile): i pazienti sono in grado di sedersi e camminare, e la durata della vita non è ridotta. Se la malattia si sviluppa prima dei tre anni di vita viene classificata come di tipo IIIa, mentre se si presenta oltre i tre anni è classificata di tipo IIIb. La distinzione dipende dal fatto che solo il 44% degli individui di tipo IIIa sono in grado di camminare fino a 20 anni, il 90% degli individui di tipo IIIb entro la stessa età non mantengono questa capacità.

SMA di tipo IV (forma adulta): i pazienti sono leggermente affetti e sviluppano la malattia oltre i 30 anni; essi hanno una vita normale.

1.5.1 Basi genetiche molecolari della SMA

Nel 1995 il gene *survival motor neuron 1* è stato identificato come il gene responsabile della SMA (Lefebvre et al., 1995). Il gene è presente sul cromosoma 5q11.2-q13.3 in duplice copia, *SMN1* e *SMN2* localizzati dentro un segmento cromosomale duplicato e invertito di circa 500 kb sul 5q13. Le due copie di SMN sono quasi identiche, eccetto per 5 paia di basi (Figura 1.7). Tuttavia, solo la sostituzione di una C con una T in posizione +6 dell'esone 7 è localizzata dentro la regione codificante. Sebbene questa

mutazione sia silente influisce molto sul corretto splicing dell'esone 7. Così, a differenza di *SMN1* che produce esclusivamente una forma di splicing intera (full-length), *SMN2* produce solo il 10% del trascritto intero e il 90% del trascritto alternativo mancante dell'esone 7.

L'esone 7 di *SMN* contiene 54 paia di basi ed è caratterizzato da un sito debole di splicing al 3'. Per essere riconosciuto dal macchinario di splicing sono necessari elementi di splicing ausiliari addizionali. L'inclusione dell'esone 7 nell'RNA messaggero di *SMN* è regolata da un numero di elementi positivi *cis* agenti chiamati *exonic splicing enhancers* (ESEs) o *intronic splicing enhancers* (ISEs), e da elementi negativi *cis* agenti chiamati *exonic splicing silencers* (ESSs) o *intronic splicing silencers* (ISSs). Questi elementi *cis* agenti sono riconosciuti da proteine di splicing *trans* agenti: le proteine serina-arginina (SR) o proteine SR simili e le ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNPs).

Una importante ESE è localizzata al 5' termine dell'esone 7 di *SMN1* ed è riconosciuto dal fattore di splicing SF2/ASF (Figura 1.8). Tuttavia, questa sequenza ESE è distrutta dalla sostituzione della C con la T in *SMN2* così che SF2/ASF non è in grado di riconoscere il sito (Cartegni et al., 2002). È stato suggerito che la

sostituzione della C con la T in *SMN2* crea un ESS per hnRNP A1 (Kashima e Manley, 2003). Di conseguenza, l'esone 7 non è riconosciuto dal macchinario di splicing, generando così un trascritto di splicing alternativo *SMN2Δ7*.

Nella parte centrale dell'esone 7, una forte ESE ricca in purine è riconosciuta dal fattore di splicing SR-simile Htra2-β1 e da ulteriori proteine di splicing (SRp30c, hnRNPs G e RBM), le quali facilitano l'inclusione dell'esone 7. Questa interazione tra ESE, Htra2-β1 e altri fattori di splicing è molto probabilmente responsabile del 10% di trascritto completo di *SMN2*.

I trascritti full-length di *SMN* che derivano da entrambe le copie di *SMN* codificano per una identica proteina di 294 aminoacidi con un codone di stop localizzato nell'esone 7. In contrasto, il trascritto *SMN2Δ7* produce una proteina troncata di *SMN* lunga 282 aminoacidi. Questa forma troncata è instabile e ha una ridotta capacità di oligomerizzazione, essenziale per la corretta funzione di *SMN*.

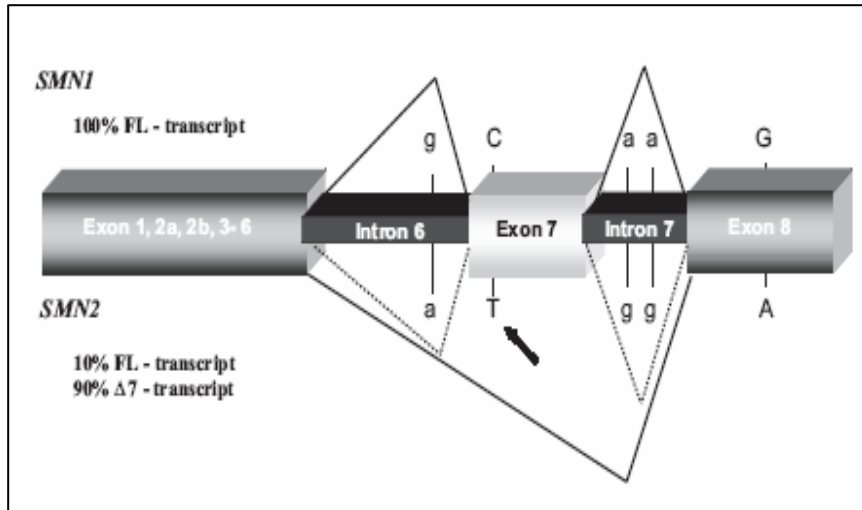


Figura 1.7. Struttura genomica, nucleotidica, e differenze di splicing tra *SMN1* e *SMN2*. Le copie dei geni SMN si possono distinguere per 5 differenti nucleotidi, dove solo la sostituzione della C a T si trova nella regione codificante. Questo nucleotide cambiato nell'esone 7 rappresenta una mutazione trascrizionalmente silente. Le forme full-length degli mRNA di *SMN1* e *SMN2* codificano per identiche proteine di 294 aminoacidi. La sostituzione della C con una T interrompe l'ESE producendo una forma alternativa di splicing di *SMN2* mancante dell'esone 7 e la proteina troncata risultante è instabile. Figura tratta da Wirth et al., 2006.

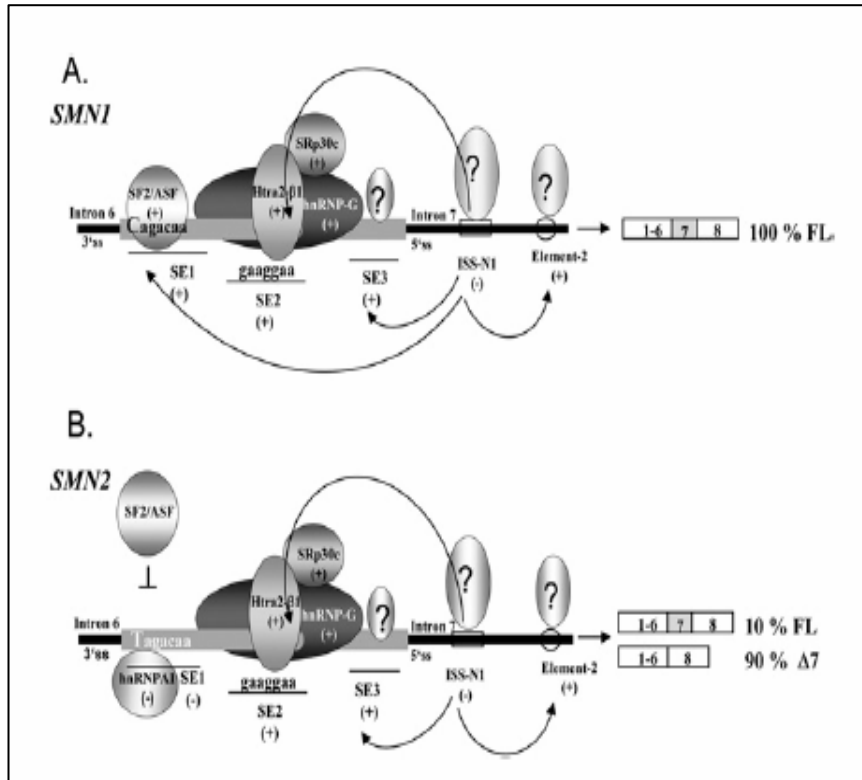


Figura 1.8. Regolazione dello splicing dell'esone 7 di SMN. L'esone 7 di *SMN1* contiene una sequenza eptamerica (SE1) al 5' termine riconosciuta da SF2/ASF. In *SMN2*, la sostituzione della C con la T interrompe la sequenza dentro SE1 impedendo il legame con SF2/ASF, determinando il salto dell'esone 7. Sia *SMN1* che *SMN2* contengono un ESE nella parte centrale dell'esone 7 (SE2), riconosciuto da Htra-β1 e dai suoi interattori hnRNPs G e Srp30c. Questi, facilitano l'inclusione dell'esone 7 in entrambe gli mRNA. Il trascritto intero di *SMN1* è prodotto solo se SE2 è intatto. L'introne 7 contiene una ISS (ISS-N1) che esercita funzione positiva sugli elementi esonici e intronaci. Figura tratta da Wirth et al., 2006.

1.5.2 Influenza del numero di copie di *SMN2* sul fenotipo SMA.

Il maggior fattore che influenza il fenotipo della SMA è il numero di copie di *SMN2*, il quale varia tra 1 e 4, e raramente supera le 8 copie. Poiché ogni copia di *SMN2* produce solo circa il 10% di un trascritto intero, un incremento del numero dei geni di *SMN2* è favorevole per i pazienti SMA e così influenza la gravità della malattia (Figura 1.9).

La maggior parte dei pazienti SMA di tipo I hanno 2 copie di *SMN2*, i pazienti SMA di tipo II hanno 3 copie come i pazienti SMA di tipo IIIa, i pazienti SMA di tipo IIIb hanno 4 copie e i pazienti di tipo IV ne hanno da 4 a 6. Comparando i livelli proteici di pazienti SMA di tipo I, II e III sono state trovate differenze sostanziali. Individui che portano da 5 a 6 copie di *SMN2* sviluppano una debole sintomatologia mentre quelli che presentano 8 copie non vengono affetti da SMA. Simili differenze fenotipiche sono state riscontrate anche in topi SMA transgenici aventi un numero di copie di *SMN2* umano tra 2 e 8 (Monani et al., 2000).

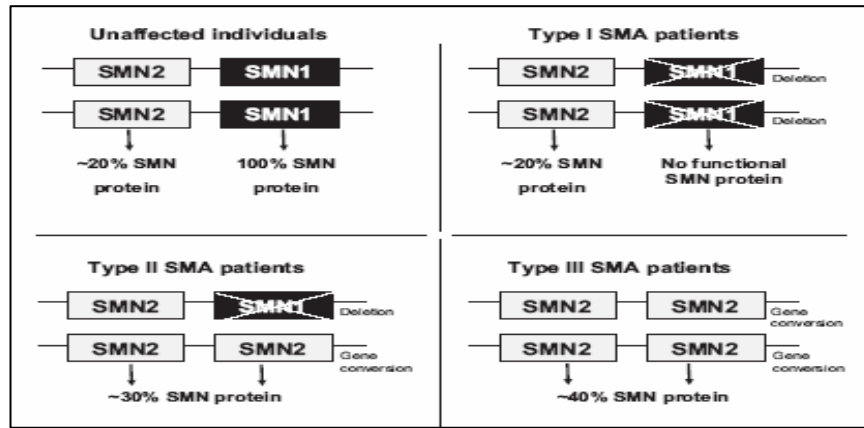


Figura 1.9. Genotipo di *SMN1* e *SMN2* generalmente trovato in individui affetti da SMA di tipo I-III. Notare che l'incremento del numero di copie di *SMN2*, prodotto da una conversione genica, è correlato con un debole fenotipo SMA e una grande quantità di proteina trascritta intera.

1.6 Interazione del complesso di SMN con altre proteine

Il complesso di SMN è associato tramite Gemin4 e/o Gemin3 alla proteina fosfatasi 4 (PPP4) e l'over-espressione di domini catalitici (PPP4c) e regolatori (R2) di PPP4 modifica la localizzazione delle snRNPs formate nuovamente in HeLa. Gemin3 e 4 sono anche componenti di un complesso 15S microRNP che contiene eIF2C2, un membro della famiglia della Argonute, e numerosi microRNAs. Così è possibile che delezioni di SMN o mutazione che portano ad una perdita di funzione nei pazienti SMA può avere anche un effetto sull'attività dei microRNAs andando, per esempio, ad influire sul bilancio tra i complessi SMN-Gemin3 e 4 e sui complessi SMN-microRNPs.

Il complesso di SMN interagisce con diverse proteine alcune delle quali sono potenziali substrati del complesso di SMN. Il C-terminale di SMN contiene un dominio YG-box che media la dimerizzazione di SMN e che aumenta l'interazione con diverse proteine Sm. Le proteine Sm tradotte *in vitro* mostrano una affinità decrescente per SMN: la più forte associazione avviene con le proteine Sm D1, D3 e B/B', mentre D2 e E interagiscono solo debolmente ed F e G non si associano a SMN (Liu et al., 1997; Friesen e Dreyfuss 2000). Una caratteristica comune delle proteine Sm D1, D3 e B/B' è la presenza di una regione C-terminale contenente diversi dipeptidi RG; questi sono più cospicui in D1 e D3, con una serie di raggruppamenti di nove e quattro arginine e glicine alternate, rispettivamente, mentre B/B' contengono diverse triplette GRG fiancheggiate da residui di prolina, aumentando la possibilità che SMN si leghi principalmente a questa regione. Friesen e Dreyfuss nel 2000 mostrano che le estensioni al C-terminale di D1, D3 e B/B' sono necessarie per l'interazione con SMN. Inoltre, questi autori trovano che LSm4, la proteina LSm che più fortemente interagisce con SMN, è legata da SMN nella regione C-terminale ricca in RG. E' stato osservato che i dipeptidi RG di D1 e D3 contengono arginine simmetricamente dimetilate, le quali aumentano la

possibilità che la dimetilazione delle proteine Sm moduli l'associazione con SMN e così la biogenesi delle snRNPs (Brahms et al., 2000). Attraverso la spettrometria di massa e il sequenziamento proteico, è stato osservato che le proteine umane B/B' e LSm4, come D1 e D3, sono simmetricamente dimetilate. Questa dimetilazione simmetrica di D1, D3, B/B' e LSm4 è fondamentale per il loro legame a SMN. La proteina LSm4 è di particolare interesse poiché è parte del complesso citoplasmatico (LSm1-7) responsabile della degradazione degli mRNA e così la dimetilazione simmetrica dell'arginina presente in questa proteina potrebbe avere un ruolo nel turnover dei messaggeri, e probabilmente essere anche coinvolta nella patogenesi della SMA (Brahms et al., 2000).

Inoltre, altri potenziali substrati del complesso sono le proteine snoRNPs fibrillarina e GAR1, come anche le hnRNP U, Q e R, l'RNA elicasi A, coilina e nucleolina (Charroux et al., 2000; Liu et al., 1997). Esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno dimostrato che il complesso di SMN interagisce con la fibrillarina e con GAR1 (Pellizzoni et al., 2001) e per tale interazione è richiesto YG box, vicino al C-terminale, di SMN. La fibrillarina e GAR1 non essendo componenti intrinseci del complesso di SMN, possono essere considerati dei potenziali substrati del complesso

di SMN. A differenza di D1, D3 e LSm4, le quali possiedono un dominio RG-rich necessario e sufficiente per essere legate da SMN, la fibrillarina e GAR1 pur contenendo il dominio RG-rich l'interazione con SMN richiede anche la presenza di domini supplementari. Ad esempio, hnRNPA1 contiene un RG-box ma non viene legata da SMN.

SMN interagisce inoltre con l'hnRNP-R e hnRNP-Q (heterogenous nucleolar ribonucleoprotein). Entrambe le hnRNPs contengono al C-terminale un dominio RG-rich. Queste due hnRNPs co-localizzano con SMN negli assoni di neuroni motori, indicando una possibile funzione neurone-motorio specifica di SMN (Rossoll et al., 2002).

Infine, la lista delle proteine riportate interagire con SMN include diverse proteine che né contengono motivi RG-rich né interagiscono con RNPs, come ad esempio la profilina, la proteina che lega FUSE, ZPRq, p53 e la proteina NS1. La proteina SMN contiene un motivo simmetrico contenente poliprolina con la sequenza Pro₅-X₁₇-Pro₁₀-X₁₇-Pro₅ (dove la X rappresenta altri residui aminoacidici). Questo motivo è altamente conservato tra l'uomo e il topo, indicando che ha una funzione specifica. Ed è stato dimostrato che questa sequenza ricca in proline viene legata dalla profilina (Gieseemann et al., 1999).

1.7 RNA interference

L'RNA può controllare l'espressione genica attraverso diversi meccanismi che possono operare sia nel nucleo che nel citoplasma, interessando sia i processi trascrizionali che post-trascrizionali (Cerutti, 2003). L'RNA interference (RNAi) è uno di questi meccanismi. Questo coinvolge il silenziamento genico sequenza-specifico post-trascrizionale (PTGS), indotto da RNA a doppio filamento (dsRNA), il quale partecipa a molti meccanismi di silenziamento post-trascrizionale. Nell'RNA interference il dsRNA è processato a piccoli segmenti di RNA interfering (siRNA) di lunghezza di 21-23 nucleotidi e il legame di questi in complessi contenenti anche proteine porta al riconoscimento dell'mRNA bersaglio con la conseguente degradazione.

L'RNAi negli eucarioti, incluso nell'uomo, può rappresentare un meccanismo conservato di difesa cellulare per controllare l'espressione di geni esogeni. Recenti analisi genetiche forniscono evidenze che l'RNA interference può anche funzionare da regolatore dell'espressione di geni endogeni (Demburg e Karpen, 2002).

La maggior parte degli studi sui meccanismi molecolari alla base dell'RNAi sono stati condotti usando *Drosophila* e *C. elegans* e i

dettagli molecolari sono stati chiariti usando approcci biochimici genetici combinati. Naturalmente l'RNA interference procede attraverso step altamente conservati (Figura 1.10). In accordo con questo modello, in principio, il lungo dsRNA viene riconosciuto da un endonucleasi specifico chiamato Dicer. Questo enzima è un membro della famiglia di nucleari delle RNasi III e tagliano un lungo dsRNA in siRNA di 21-23 nucleotidi. Dicer è stato caratterizzato in estratti preparati da cellule di insetto, embrioni e cellule in coltura di mammifero (Billy et al., 2001). In cellule di mammifero Dicer localizza nel citoplasma, indicando che l'RNAi è un processo principalmente citoplasmatico. Dicer ha un dominio N-terminale RNA elicastico, un dominio PAZ, due domini RNasi III e un motivo C-terminale di legame ai dsRNA. Un dominio PAZ è presente anche nella proteina Argonata Ago2 e l'interazione tra Dicer e Ago2 può facilitare l'incorporazione dei siRNAs dentro un complesso proteico il quale è chiamato RISC (RNA-induced silencing complex; Hammond et al., 2001). RISC contiene le proteine necessarie per distendere il doppio filamento degli siRNAs e tagliare l'mRNA target nel sito dove sono trovati gli RNAs antisense. In lisati di *Drosophila*, RISC è stato trovato assemblato su sintetici siRNA duplex ed è altamente

efficiente nella degradazione degli mRNAs omologhi (Elbashir et al., 2001).

Anche se il meccanismo di fondo dell'RNA interference non è stato ancora completamente delucidato, nei laboratori l'RNAi è diventata un metodo di ingegneria genetica, usato in molti campi come ad esempio nelle neuroscienze di base.

L'RNAi è stata ampiamente usata per studiare la funzione dei geni in processi neurobiologici di base come i segnali intracellulari, lo sviluppo embrionale, la formazione delle giunzioni cellulari, il ciclo cellulare, l'apoptosi, la plasticità sinaptica, e la crescita assonale.

Diverse malattie genetiche neurodegenerative sono state studiate in *Drosophila* utilizzando l'RNA interference. Nella SMA per meglio studiare perché i motoneuroni sono il bersaglio principale in questa malattia è importante investigare sul ruolo della proteina SMN nella morte cellulare. Ad esempio, è stato osservato che in cellule S2 di *Drosophila* l'abbassamento dei livelli di SMN tramite RNAi induce la morte per apoptosi caspasi-dipendente (Kamath et al., 2001).

La scoperta dell'RNAi è stata la più emozionante scoperta nella biologia nella passata decade. L'RNA interference viene usata come mezzo sperimentale per la ricerca di base nelle neuroscienze

e può anche rappresentare un nuovo approccio per le malattie neurodegenerative, alcune delle quali sono progressive e ad oggi incurabili.

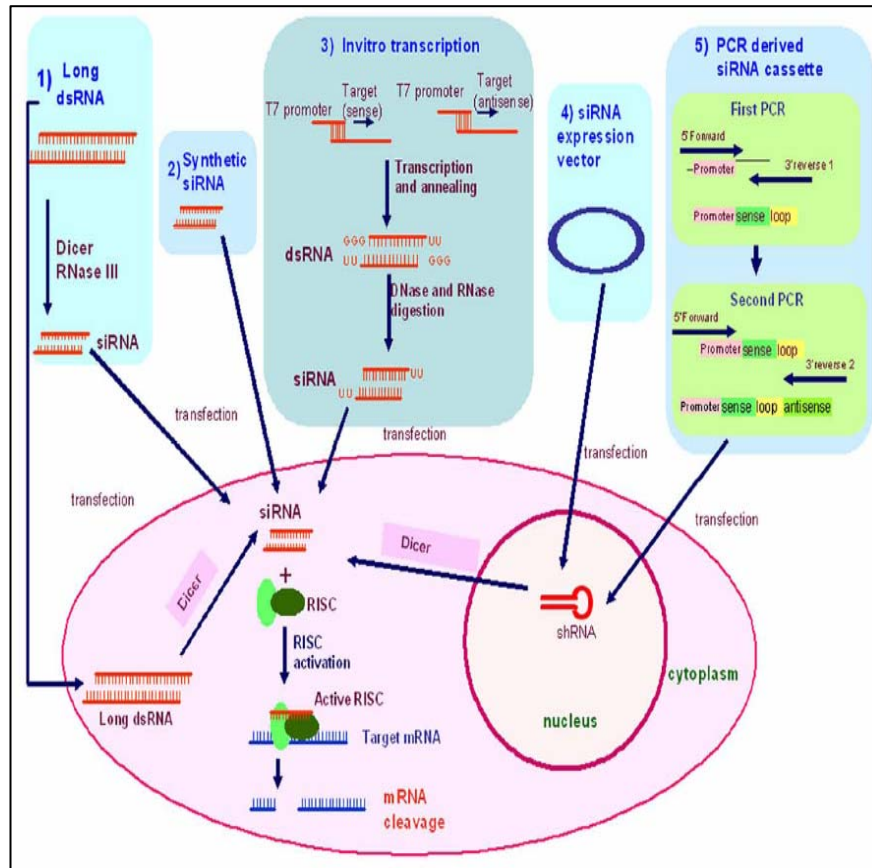


Figura 1.10. Silenziamento genico determinato dall'RNA interference.

Negli organismi come il *C. elegans* il lungo dsRNA entra nella via dell'RNAi e viene processato dal complesso di Dicer a siRNA di 21-23 nucleotidi di lunghezza (1). Il filamento antisense dell'siRNA duplex è un mediatore essenziale dell'RNAi, ed è di seguito associato al complesso RISC, il quale guida il riconoscimento e il taglio dell'mRNA target, determinando la sua degradazione e il silenziamento genico specifico. Nelle cellule di mammifero, nella terapia genica usando l'RNAi possono essere impiegati direttamente siRNAs sintetici (2), o corte forchine generate da plasmidi o da sistemi di espressione virale usando promotori (3 e 4). Gli siRNA possono essere trascritti *in vitro* usando la polimerasi T7. Gli siRNAs vengono amplificati tramite PCR e possono essere inseriti direttamente nelle cellule senza essere clonati in vettori (5).

2. SCOPO DELLA RICERCA

In questo lavoro ci siamo proposti di investigare il ruolo di SMN nella degenerazione selettiva dei motoneuroni e sul ruolo funzionale delle proteine Sm e Sm-like nei neuroni.

Per capire in che modo SMN determina la morte selettiva dei motoneuroni, è stato creato un modello cellulare di SMA utilizzando la tecnica dell'RNA interference. Tale tecnica permette di inibire la traduzione di un messaggero specifico fino al silenziamento totale. Tuttavia, nel caso di SMN la sua completa assenza risulterebbe incompatibile con la vita cellulare in quanto SMN è un gene essenziale per la sopravvivenza di tutte le cellule. La costruzione di cloni stabili, invece, ha consentito di ottenere delle linee cellulari con livelli patologici di SMN.

E' noto che il complesso di cui fa parte SMN è importante per l'importo nucleare delle snRNPs e che è fondamentale per l'assemblaggio delle proteine Sm nel *core* delle RNPs. Quindi, sui cloni stabili knock-down per SMN è stato osservato se l'abbassamento nei livelli di SMN disturba l'assemblaggio e il re-importo nucleare delle snRNPs. Inoltre, è stato visto anche come SMN influenza l'assemblaggio del complesso LSm1-7. Poiché in modelli animali di SMA è stata riscontrata una organizzazione

aberrante del citoscheletro, sui cloni stabili abbiamo investigato anche sulla distribuzione dei neurofilamenti e se SMN interferisce con la loro distribuzione.

Per studiare il possibile ruolo neuronale del complesso LSm1-7, è stata in primo luogo analizzata la distribuzione cellulare di LSm1 e LSm4 prima in colture primarie di midollo spinale, cellule del Purkinje e ippocampo di ratto, e successivamente in vivo. Essendo noto dalla letteratura che il complesso di interesse in cellule HeLa è coinvolto nella degradazione degli RNA messaggeri abbiamo analizzato se anche in cellule altamente specializzate come i neuroni svolge la stessa funzione. Infine, essendo noto che in lievito LSm1 lega gli mRNA per la loro degradazione è stato determinato se anche nei neuroni LSm1 è adibito alla stessa funzione o se svolge altre attività. Per tale scopo, sono stati effettuati esperimenti di immunoprecipitazione per vedere in primo luogo se LSm1 lega solo specifici messaggeri e successivamente è stato analizzato lo stato degli mRNA.

Le due linee di ricerca hanno permesso in questo modo di stabilire delle nuove funzioni neuronali di LSm1 e tale proteina potrebbe richiedere la presenza di SMN per la sua attività.

3. MATERIALI E METODI

MATERIALI

Enzimi

Gli enzimi di restrizione utilizzati e i loro specifici tamponi utilizzati nelle procedure sperimentali sono prodotti dalla ditta New England BioLabs. Gli enzimi sono utilizzati in accordo alle istruzioni fornite dalla ditta.

Ceppi batterici

DH10B: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ -*rpsL* (Str^R) *nupG*.

XL1: *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F⁺ *proAB lacIqZ.M15 Tn10* (*tetR*).

Terreni di coltura utilizzati

Terreno liquido LB "broth":

NaCl	5 g/L
Triptone	10 g/L
Estratto di lievito	5 g/L
1M Tris-HCl pH 7.5	10 ml/L

Terreno solido LB "agar":

LB "broth" + 15 g/L di agar

Soluzioni comunemente utilizzate

TAE Tris 40 mM

Acido acetico 20 mM

EDTA 1 mM

PBS NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l

Na₂HPO₄ 1,44 g/l

KH₂PO₄ 0,24 g/l

SDS elettroforesi Glicina 14,4 g/l

Buffer Tris 3 g/l

SDS 1 g/l

Buffer di trasferimento Tris 3 g/l

Glicina 14,4 g/l

SDS 0,5 g/l

Metanolo 20%

Western blotting	Tris 0,2 M NaCl 0,3 M Tween20 1% pH 8.0
4X gel proteine	Tris-Cl pH 8.8 1,5 M SDS 0,4%
4X stacking gel	Tris-Cl pH 6.8 0,5 M SDS 0,4%
RIPA Buffer	Tris-Cl pH 7.5 50 mM NaCl 150 mM NP-40 1% DOC 0,5% SDS 0,1%
IMAC Buffer	Hepes pH 7.4 20 mM K-acetato 140 mM Mg-acetato 1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 0,1 mM

Linee cellulari utilizzate

Sono state utilizzate linee cellulari di neuroblastoma umano (SH-SY5Y), cresciute nel terreno D-MEM F12 (Gibco), reso completo con l'aggiunta di 10% FBS (fetal bovine serum) e 1X Pen/Strep.

Anticorpi utilizzati

Gli anticorpi utilizzati per questi studi sono: anti-SMN (policlonale di coniglio 1:50 per immunofluorescenza; 1:500 per western; prodotto presso il Laboratorio del Dr. Stefano Cannata, Università di Tor Vergata, Roma, Italia); anti SOD1 (monoclonale di topo 1:2000; Stressgen); anti-Y12 (monoclonale di topo 1:50; Lerner et al 1981); anti-HA (monoclonale di ratto 1:100; Santa Cruz Biotechnology); anti-LSm1 e anti-LSm4 (policlonali di coniglio; Ingelfinger *et al.*, 2002); anti-NFH o SMI32 (monoclonale di topo 1:100; Sternberger); anti-MAP2 (monoclonale di topo 1:300; Sigma); anti-calbindina (monoclonale di topo 1:1500; Swant); anti-GFAP (monoclonale di topo 1:400; Sigma); anti-sinaptofisina (monoclonale di topo 1:100; Chemicon); anti-Staufen (policlonale di coniglio 1:2000 per western, 1:200 per immunofluorescenza; fornito da Dr. Juan Ortin); anti-CaMKII subunità alfa (monoclonale di topo 1:100; Promega).

METODI

Strategia di clonaggio

Al fine di ottenere dei plasmidi che contenessero una sequenza di SMN diretta contro il proprio messaggero, utilizzabile per ottenere dei cloni SMN knock-down stabili, sono stati sintetizzati due oligo complementari a SMN alle cui estremità sono inseriti i siti di restrizione EcoRI e XhoI (Invitrogen).

Aggiunta fosfato agli oligo:

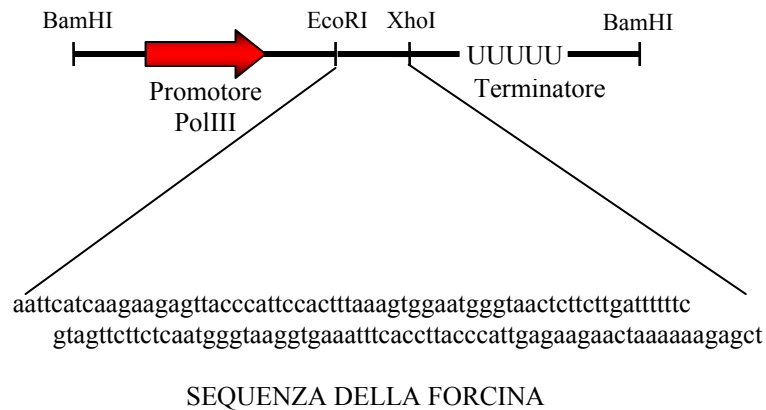
2 μ l SMN-up 10 pmol/ μ l
2 μ l SMN-down 10 pmol/ μ l
2 μ l 10X buffer PNK
2 μ l ATP (1 mM finale)
1 μ l PNK (10 u/ μ l)
11 μ l H₂O 1 ora a 37°C

Annealing oligo:

6 μ l oligo up-down SMN
1 μ l NaCl (50 mM)
0,6 μ l Tris-Cl (10 mM)
52,4 μ l H₂O
A 95°C fino a temperatura ambiente (R.T.)

Il doppio filamento di SMN è stato clonato prima nel plasmide pBluescript SK (-/+), utilizzando i siti EcoRI e XhoI, e successivamente nel plasmide di espressione pcDNA3.1. A quest'ultimo è stata precedentemente rimossa la cassetta del promotore pCMV utilizzando i siti di restrizione BamHI e BglII e poi inserita la cassetta contenente il promotore PolIII seguito da un sito EcoRI, un sito Xho e da un terminatore U₅. Per poter inserire questa cassetta è stato necessario rimuovere dal plasmide originale i siti di restrizione EcoRI e XhoI presenti nel MCS (multiple cloning site), utilizzando gli enzimi di restrizione BamHI e XbaI.

SCHEMA DELLA CASSETTA INSERITA IN pcDNA3.1:



Il plasmide così costruito è stato trasformato nella linea cellulare di *E. coli* DH10B e dai cloni ottenenti è stato estratto il DNA plasmidico, mediante lisi alcalina, e sottoposto a digestione enzimatica di controllo con l'enzima di restrizione DdeI.

Il clonaggio del plasmide di espressione HA-SMN è stato eseguito dal Dott. Tilmann Achsel.

Il clonaggio di Dcp1a e hLSm1 nel vettore di espressione pEGFP-C1 (Clontech) è stato eseguito dal Sig. Antonio Totano presso il nostro laboratorio. La sequenza di tutti i plasmidi ottenuti è stata controllata mediante il servizio di sequenziamento automatico presso la ditta SeqLab di Göttingen, Germania.

Manipolazione del DNA

Preparazioni di DNA plasmidico sono state ottenute da colture in terreno liquido LB attraverso QIAGEN mini e midi-prep *Purification Kit*. I prodotti di digestione dei plasmidi e degli inserti, dopo essere stati controllati su gel d'agarosio, sono stati estratti da gel mediante il *Kit* per l'estrazione (*Gel extraction Kit*, QIAGEN). Le reazioni di ligazione sono state condotte in 5 µl di reazione con differenti proporzioni tra l'inserto ed il vettore, a temperatura di 37°C per 1h. Le trasformazioni sono state eseguite utilizzando cellule batteriche rese chimicamente competenti con

cloruro di calcio e le cellule sono state cresciute su piastre contenenti terreno LB-agar con ampicillina 100µg/ml. Le mini preparazioni di DNA plasmidico da colonie resistenti sono state ottenute con un protocollo di lisi alcalina. Le colonie positive sono state controllate mediante digestione con enzimi di restrizione.

Trasfezioni di linee cellulari umane SH-SY5Y

Il giorno prima della trasfezione, le cellule sono staccate dalla piastra con Tripsina e ripiastrate ad una densità tale che il giorno della trasfezione hanno una confluenza di circa l'80%. Per la trasfezione è utilizzato il LIPOFECTAMINE PLUS Reagent (Amersham) e tutti i passaggi sono effettuati in accordo alle istruzioni fornite dalla ditta.

Selezione dei cloni trasfettati con le forcine di SMN

Dopo 2 giorni dalla trasfezione viene cominciata la selezione delle cellule che hanno incorporato i plasmidi con 300 µg/ml di Geneticina. Il trattamento con questo antibiotico viene ripetuto ogni due giorni fino ad avere delle singole colonie cellulari, le quali vengono in seguito espanse.

Differenziamento di linee cellulari umane SH-SY5Y

Per differenziare le cellule sono stati condotti 2 trattamenti con cAMP 5 mM a distanza di 2 giorni, aggiungendo nel terreno F-MEM F-12 oltre che la Geneticina anche l'N2 supplemento (Gibco) e Pen/Strep.

Estrazione di proteine da cellule animali

Le cellule vengono staccate dalle piastre con Tripsina-EDTA, incubate a 37°C per 2-3 minuti e risospese in D-MEM F-12 completo. Le cellule vengono centrifugate a 2.000 rpm per 5 minuti. Il pellet viene lavato con PBS 1X, risospeso in 50 µl di PBS 0,2% Triton X-100 e centrifugato a 13.000 rpm per 5 minuti. Viene prelevato il super e quantizzato tramite saggio Bradford (Biorad).

Saggio colorimetrico Bradford

Il colorante Comassie Blue, in soluzione acida, si lega alle proteine sviluppando una colorazione blu; l'intensità della colorazione, determinata a 595 nm; è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica. Per determinare la concentrazione delle proteine viene costruita una retta di taratura facendo reagire il reattivo Bradford (Comassie Blue in soluzione acida) con

quantità crescenti di una soluzione di BSA a concentrazione nota. Dalla costruzione della retta (in ascissa i μg e in ordinata l'assorbanza) è possibile ottenere i μg di proteine totali.

Western blotting

Tutti gli estratti proteici utilizzati e le proteine ottenute da immunoprecipitazione sono separate tramite SDS-PAGE (Sodium Dodecil Solfato-Poliacrilammide Gel) e trasferite su membrana di nitrocellulosa. La membrana è incubata in 5% latte in 1X western buffer, per bloccare riconoscimenti aspecifici, e successivamente con gli anticorpi primari che riconoscono le proteine di interesse (anti-SMN 1:500; anti-SOD1 1:2000; anti-LSm1 1:1000; anti-Staufen 1:2000 in latte al 5%). Dopo 4 lavaggi con 1X western buffer la membrana è incubata con gli anticorpi secondari (anti-rabbit o anti-mouse 1:10000 in latte al 5%), i quali sono coniugati all'enzima perossidasi di rafano. Dopo altri 4 lavaggi le proteine sulla membrana vengono rilevate usando una reazione di chemiluminescenza (ECL-Plus, analizzato allo STORM840 per fluorescenza; Amersham).

Purificazione dell'anticorpo policlonale anti-LSm1

Legame del peptide su colonna: 2 ml di sospensione di SolfoLink Coupling Gel (Pierce Biotechnology) sono messi in una colonna ed equilibrati con 4 volumi di Coupling buffer (50 mM Tris; 5 mM EDTA-Na pH 8.5). Caricato sulla colonna il peptide (2 mg di peptide C-terminale LSm1 sciolto in Coupling buffer) e messa nella ruota per 15 minuti a R.T. Incubato la colonna per 30 minuti a R.T. senza agitazione e successivamente lavata con 3 volumi di Coupling buffer, applicato sulla colonna 1 ml di cisteina 50 mM e lasciato O.N. in agitazione. Vengono fatti 5 lavaggi della colonna con PBS-Tween20 0,1% e conservata in PBS-Tween20 0,1% con sodio azide.

Purificazione anticorpo su colonna: 2 o 3 ml di siero di conigli contenente anticorpi anti-LSm1 sono diluiti in 4 volumi di 1X western buffer e centrifugati a 3000 rpm per 30 minuti. Nel frattempo equilibrato la colonna con 5 volumi di western buffer. Caricato sulla colonna il super del siero centrifugato e fatti 2 lavaggi con 1X western buffer. Nell'eluizione vengono fatte 10 frazioni da 500 µl con Glicina-HCl 0,1 M pH 2.7 aggiungendo in ogni frazione 40 µl di Tris-Cl 1M pH 8.0 per neutralizzare. 5 µl di ogni frazione sono usate per il saggio ELISA per rilevare il picco dove è presente l'anticorpo purificato.

Estratti di cervello di ratto e immunoprecipitazione

Un cervello intero (post-natale P7 di ratto) è stato omogenato in 3 ml/cervello in IMAC buffer (Kanai et al., 2004) in presenza di inibitore delle proteasi (Sigma-Aldrich). I lisati sono centrifugati a 15.000g per 15 minuti a 4°C. I supernatanti sono uniti e la concentrazione di proteine totali è stata stimata tramite il saggio Bradford. Per le immunoprecipitazioni, 20µl di anticorpo anti-LSm1 sono immobilizzati su biglie di proteina A Sefarosio (Amersham) in presenza di 0,3% di BSA. Le biglie sono lavate per tre volte con IP buffer (150mM NaCl; 10mM Tris-Cl pH 7.5; 0,1% Triton X-100) e incubate con i lisati di cervello (750µg di proteine totali diluite in 1 ml di IP buffer) a 4°C per 1 ora nella ruota. Le biglie sono lavate per tre volte con 1 ml di IP buffer. Le proteine sono eluite con SDS loading buffer, corse tramite elettroforesi su gel SDS-PAGE e analizzate tramite Western blotting.

Per gli esperimenti di crosslinking, i lisati (corrispondenti a 750 µg di proteine totali) sono irradiati con una lampada germicida per 30 secondi, 1 minuto e 2 minuti. Dopo irradiazione gli estratti sono diluiti con RIPA buffer e immunoprecipitati come descritto in precedenza utilizzando RIPA buffer per i lavaggi.

Per ridurre il fondo di RNA negli esperimenti di IP/RT-PCR, i lisati di cervello sono pre-chiarificati per 1 ora con 20µl di biglie di proteina A sefarosio (pre-bloccate con 0,3% BSA e 100µg/ml di tRNA di E.coli), mentre gli anticorpi sono bloccati sulle biglie di proteina A sefarosio in presenza di 0,3% BSA e 100µg/ml di tRNA di E.coli; per i lavaggi delle immunoprecipitazioni è stato utilizzato IP buffer descritto in precedenza. Gli RNA legati sono eluiti in Elution buffer (0,2 M NaOAc pH 5.2; 0,2% SDS; 1 mM EDTA), purificati tramite estrazione con fenolo-cloroformio e precipitati in etanolo. I cDNA sono sintetizzati utilizzando p(dN₆) e M-MuLV trascrittasi inversa (New England Biolabs) in un volume di reazione di 20 µl. 2µl di reazione sono utilizzati per la reazione di PCR usando la Taq Polimerasi (New England Biolabs) e oligi specifici per l'amplificazione di β-actina, α-CaMKII, MAP1B e LSm8.

Preparazione della sonda a cDNA per β-actina

La sonda a cDNA utilizzata per l'ibridazione *in situ* è stata ottenuta tramite una reazione di PCR usando gli oligo:

Actina up: 5'-acacggcattgtcgccaact-3'

Actina down: 5'-catcacaatgccagtgtac-3'

Il cDNA ottenuto è clonato nel vettore in pGEM-T-easy (Promega) e linearizzato con SalI o NcoI e trascritto *in vitro* con la polimerasi SP6 o T7 (MAXI-Screipi kit; Ambion), utilizzando il dUTP-CY5 per la marcatura. Le sonde senso o antisenso sono purificate su colonne Microspin G-50 (Amersham) e utilizzate per l'ibridazione *in situ*.

Oligo utilizzati

Actina up: 5'-acacggcattgtcgccaact-3'

Actina down: 5'-catcacaatgccagtgtac-3'

α -CaMKII up: 5'-tgaaggaatcctctgagagc-3'

α -CaMKII down: 5'-tgttccgggaccacaggtt-3'

LSm8 up: 5'-gacgtctgccttgagaact-3'

LSm8 down: 5'-caagtcgagtcagaatctg-3'

MAP1B up: 5'-gctgtctggatgcctt-3'

MAP1B down: 5'-ggcaggtccttctcagtg-3'

SMN up:

5'aattcatcaagaagagtaccattccactttaaagtggaatgggtaactcttcttgatttttc
3'

SMN down:

5'tcgagaaaaatcaagaagagtaccattccactttaaagtggaatgggtaactcttctga
tg3'

SMN2 up:

5'aattcacattgtccccaactttccactttcgagtggaaagtggggacaaatgtttttc3'

SMN2 down:

5'tcgagaaaaaacattgtccccaactttccactcgaaagtggaaagtggggacaaatgtg
3'

SMN3 up:

5'aattcatattattagctacttcacagatttcgttctgtgaagtagctaataatatttttc3'

SMN3 down:

5'tcgagaaaaaatattattagctacttcacagatcgaaatctgtgaagtagctaataatg3'

SMN4 up:

5'aattcaattaacatacttcccaaagcatttcgatgctttgggaagtatgtaattttttc3'

SMN4 down:

5'tcgagaaaaaattaacatacttcccaaagcatcgaaatgctttgggaagtatgtaattg3'

Trattamento degli animali

Tutti gli esperimenti fatti su tessuto animale sono stati condotti utilizzando ratti Wistar (Harlan o Carles River, Italia), tenuti in gabbie standard con cicli di luce/buio di 12 ore e sottoposti a una dieta standard che ha previsto acqua e cibo *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono condotti in accordo alla legge italiana sull'uso e la cura degli animali da laboratorio (DL 116\92).

Colture di neuroni primari, trasfezioni e trattamenti

Neuroni di midollo spinale di ratto: i midolli spinali sono ottenuti da feti di ratto a 13 giorni. Dopo la rimozione dei gangli spinali, da 10 a 14 midolli sono dissociati e trasferiti in un tubo da centrifuga contenente 5 ml di Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) e centrifugati a 150g per 2 minuti. Il tessuto è risospeso e incubato per 15 minuti a 37°C in presenza di 0,02% di Tripsina e successivamente trattati con DNAsi (80µg/ml) e inibitore della tripsina (0,52mg/ml). I tessuti digeriti sono dissociati meccanicamente e centrifugati a 150g per 10 minuti. Le cellule dissociate sono pilastrate ad una densità di 12×10^4 cellule/cm². Le cellule sono cresciute in MEM (Gibco) supplementato con 10% di FBS o Neurobasal Media (Gibco), supplementato con B27 alla concentrazione indicate dalle ditte.

Per gli esperimenti di trasfezione sono state elettroporate 5×10^6 cellule usando il Basic Nucleofector Protocol per cellule neuronali primarie di mammifero (Amaxa). Le cellule sono pilastrate su vetrini polilesinati e incubate a 37°C in presenza di 5% di CO₂.

Colture di cellule del Purkinje: le cellule sono ottenute da cervelletto di ratto a P7 come descritto precedentemente (De Stasio et al., 1994; Gallo et al., 1982). Nel caso di stimolazioni con KCl, le cellule del Purkinje sono cresciute per 13 giorni,

trattate con 20mM di KCl per 15 minuti e immediatamente fissate con paraformaldeide.

Esperimenti di immunofluorescenza

Per le analisi di immunofluorescenza le cellule sono fissate con 4% di paraformaldeide (PFA). Dopo essere state permeabilizzate con 0,2% Triton X-100 e trattate con 10% di FBS in PBS, le cellule sono state incubate per 1 ora R.T. con gli anticorpi primari diluiti in 10% di FBS in PBS. Le cellule sono lavate per tre volte con PBS e incubate per 1 ora a R.T. con gli anticorpi secondari, di topo IgG coniugato a CY2 e di ratto IgG coniugato a CY3 (Amersham). Dopo tre lavaggi con PBS i vetrini sono montati con Mowiol (Calbiochem). Le immagini sono acquisite al microscopio confocale Zeiss LSM510 e analizzate utilizzando il software Zeiss.

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ*, i neuroni primari sono fissati per 20 minuti a R.T. con 4% di PFA, 2 mM MgCl₂ e 5 mM di EGTA in PBS. Le cellule sono permeabilizzate con PBS contenente 0,1% Triton X-100. Successivamente, le cellule sono pre-ibridate con 50% di formammide, 2X SSC, 10 mM di NaH₂PO₄ (soluzione di pre-ibridazione) e poi ibridate over night (O.N.) a 37°C con 30% formammide, 10 mM di NaH₂PO₄, 10%

destrano solfato, 2X SSC, 0,2% BSA, 500 µg/ml di tRNA di lievito, 500 µg/ml di DNA denaturato di sperma di salmone e la sonda marcata con CY5. Le cellule sono lavate per 2 volte con la soluzione di pre-ibridazione a 37°C, poi lavate per 2 volte in 2X SSC, 0,1% Triton X-100 ed infine per 2 volte con 1X SSC, 0,1% Triton X-100. Dopo l'ultimo lavaggio le cellule sono state marcate per immunofluorescenza e analizzate tramite microscopia confocale.

Preparazione dei tessuti e immunofluorescenza

Tre ratti maschi adulti del peso di 200-250 grammi sono perfusi sotto anestesia (Nembutal, 60mg/kg, i.p.) con 150 ml di salina a R.T. seguiti da 200 ml di 4% PFA fredda in 0,1 M pH 7.4 buffer fosfato (PB). I cervelli sono disseccati, fissati per 2 ore a R.T. e crioprotetti in 30% saccarosio in PB a 4°C. Successivamente sono congelati con ghiaccio secco e tagliati in sezioni trasversali di 40 µm al microtomo. Tutte le soluzioni degli anticorpi sono preparate in PB con 0,3% Triton X-100 e incubati O.N. a temperatura ambiente. Dopo incubazione con gli anticorpi primari, le sezioni sono lavate per tre volte in PB e incubate per 2 ore con gli anticorpi secondari coniugati a CY2 o CY3 (1:100 ognuno; Jackson Immunoresearch Laboratories). Le sezioni sono lavate

tre volte in PB, montate su vetrino con GEL/MOUNT (Biomeda). I limiti anatomici e la nomenclatura sono in accordo con Paxinos (Paxinos e Watson, 1994). Le immagini sono acquisite al microscopio confocale Zeiss LSM510.

4. RISULTATI

4.1 Modello cellulare di SMA

Per investigare sul ruolo di SMN nella selettiva neurodegenerazione dei motoneuroni che caratterizza l'atrofia spino muscolare è stato costruito un modello cellulare per questa patologia, in linee cellulari umane di neuroblastoma, utilizzando la tecnica dell'RNA interference descritta nell'introduzione.

Per il silenziamento genico possono venire usati direttamente i siRNA, ma con questo approccio sperimentale si otterrebbe una inibizione della traduzione solo transiente. Inoltre, l'uso diretto di siRNA implica una grande variabilità dei risultati che può dipendere da numerosi fattori quali ad esempio l'efficienza di trasfezione e la ripetitività del silenziamento. Quindi, per i nostri studi è stato utilizzato un plasmide che esprime stabilmente i siRNA diretti contro SMN in modo da determinarne il silenziamento traduzionale. Questo sistema permette di ottenere dei cloni cellulari che esprimono in modo stabile i siRNA in quanto il plasmide si integra nel genoma cellulare e viene normalmente espresso. L'espressione della forcina può provocare il completo silenziamento traduzionale e quindi ottenere dei cloni stabili knock-out ma nel caso di SMN il completo silenziamento

non è compatibile con la vita cellulare, in quanto SMN è un gene essenziale per la sopravvivenza di tutte le cellule. Però, questo sistema permette anche di ottenere cloni che presentano dei livelli patologici di SMN, riscontrati nella SMA, da poter essere usati come modello cellulare.

4.1.1 Cloni stabili

Per creare dei cloni stabili che presentassero dei livelli di SMN il più vicino possibili a quelli patologici è stato costruito un plasmide (v.di Materiale e Metodi) in cui il gene artificiale esprime una forcina (short hairpin: shRNA) ad RNA che verrà digerita dal complesso Dicer per formare i siRNA. Il plasmide presenta un promotore Polimerasi III (che è adatto a trascrivere piccoli RNA) ed un terminatore Pol III costituito da una sequenza di U alla fine del gene artificiale. Così, una volta che l'shRNA è trascritta, viene processata da Dicer in un corto e doppio filamento di RNA e successivamente incorporata dal complesso RISC che determinerà il riconoscimento diretto dell'mRNA di SMN e quindi il silenziamento e la degradazione del messaggero (Figura 4.1).

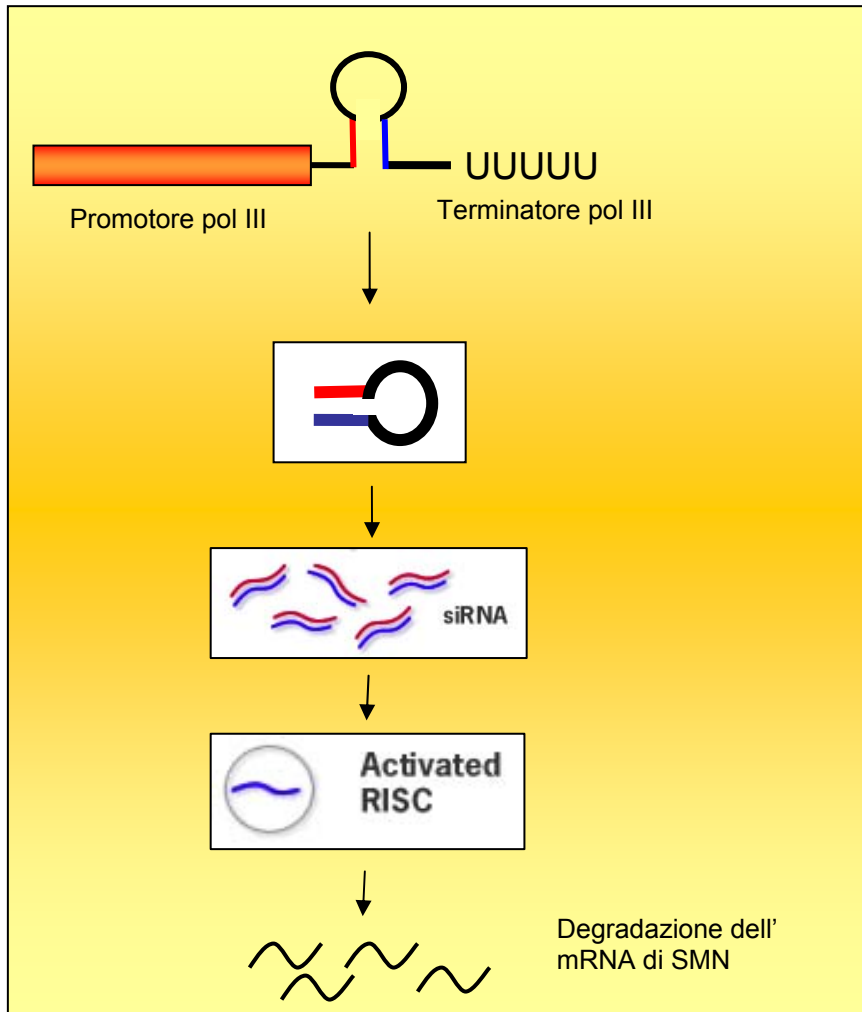


Figura 4.1. Rappresentazione schematica del meccanismo di silenziamento genico di SMN. Il plasmide artificiale esprime, sotto il controllo del promotore Polimerasi III, una short hairpin RNA (shRNA) processata dal complesso Dicer in small interfering RNA (siRNA). Questi ultimi sono incorporati come singoli filamenti nel complesso RISC che guida il riconoscimento dell'mRNA target e la sua degradazione.

Per creare dei cloni stabili sono state scelte linee cellulari umane di neuroblastoma SH-S5Y5 in quanto cellule di origine neuronale che in seguito a specifica induzione si differenziano in neuroni. Tale cellule sono state trasfettate con il plasmide che esprime il gene artificiale di SMN con il sistema lipidico che vede l'utilizzo della Lipofectamina (v.di Materiali e Metodi). Per il silenziamento sono state utilizzate quattro forcine differenti, tutte dirette contro SMN. Dopo due giorni è stata iniziata la selezione con Geneticina dei cloni che hanno integrato nel loro genoma il plasmide e a distanza di due settimane sono state ottenute delle singole colonie di cellule che sono state in seguito espanse. Da ogni clone così ottenuto sono state estratte le proteine totali ed è stato analizzato il livello proteico di SMN tramite la tecnica del Western blot (fig.2 risultati). Sono stati analizzati 52 cloni ma solo quattro cloni presentavano una riduzione dei livelli di SMN. Per normalizzare la quantità proteica di SMN è stata utilizzata come controllo la proteina superossidodismutasi 1 (SOD1) e come si può vedere dalla Figura 4.2 sono stati ottenuti quattro cloni che presentano una riduzione dei livelli di SMN del 70% (corsia 2), del 30% (corsia 3), del 73% (corsia 4) e dell'87% (corsia 5). Il fatto che il silenziamento non sia totale permette di ottenere dei cloni (con il 70% di SMN in meno) che presentano dei livelli di SMN

riscontrati nella patologia della SMA. E' stato osservato che dopo diversi cicli di replicazione cellulare i cloni tendono a perdere il silenziamento, probabilmente perché la forcina viene in qualche modo persa durante la duplicazione. Infatti, dall'analisi condotta tramite Western blot sui cloni silenziati che si sono divisi per diversi cicli, è stato osservato un aumento dei livelli di SMN. Come si può vedere in Figura 4.2B il clone che presentava una diminuzione di SMN del 70% continua ad essere silenziato nella stessa percentuale (corsia 4 Figura 4.2B) mentre, il clone che presentava un abbassamento di SMN dell'87% è risultato avere una diminuzione del 20%. Gli altri due cloni (corsie 2 e 3 Figura 4.2B) hanno perso completamente il silenziamento mostrando un aumento dei livelli di SMN del 100%. Data questa osservazione tutti gli esperimenti effettuati sui cloni silenziati sono stati eseguiti prima che le cellule perdessero la forcina. Questa tecnica di RNA interference ha comunque permesso di ottenere dei cloni che presentano livelli patologici di SMN da usare come modelli di SMA e quindi analizzare le loro caratteristiche.

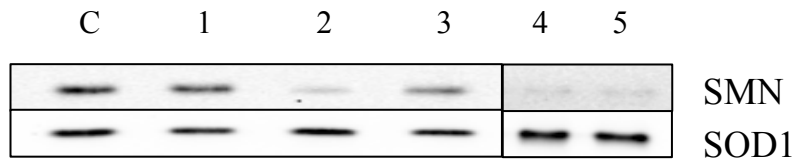


Figura 4.2A. Knock-down di SMN in cellule di neuroblastoma trasfettate con siRNA contro SMN. Le cellule sono trasfettate usando un costrutto che esprime gli siRNA. Le proteine totali sono state estratte dalle cellule monoclonali ottenute e analizzate tramite Western blot. C: controllo cellule SH wt, 1: clone di SH non silenziato per SMN. Il clone numero 2 mostra una riduzione di SMN del 70% e il clone numero 3 una riduzione del 30%. 4: clone silenziato del 73%; 5: clone silenziata dell'87%. SOD1 è stata usata per normalizzare i livelli di SMN.

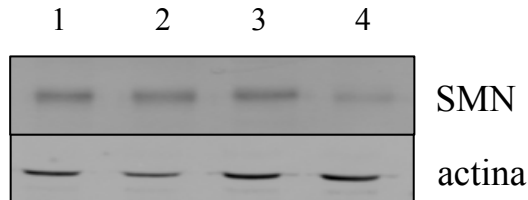


Figura 4.2B. Analisi per Western blot dei livelli di SMN in cellule di neuroblastoma SMN knock-down. Le proteine totali sono state estratte dalle cellule monoclonali ottenute e analizzate tramite Western blot. I livelli di proteine sono normalizzati per l'actina. 1: clone di SH inizialmente silenziato dell'87%; 2: clone inizialmente silenziato del 73%; 3: clone inizialmente silenziato del 30%; 4: clone inizialmente silenziato del 70%. Il clone numero 4 è l'unico che continua a mantenere la stessa percentuale di silenziamento a differenza dei cloni 2 e 3 che non sono più silenziati e del clone 1 che presenta una diminuzione di SMN del 20%.

Per verificare che i cloni ottenuti presentano dei reali abbassamenti di SMN è stata condotta una marcatura con l'anticorpo monoclonale anti-SMN su cellule SH wild type (wt) e sui due cloni knock-down per SMN. Come è possibile vedere in Figura 4.3 l'espressione di SMN diminuisce gradualmente (pannelli 2 e 3) all'aumentare della percentuale di silenziamento dei due cloni rispetto al controllo (pannello1).

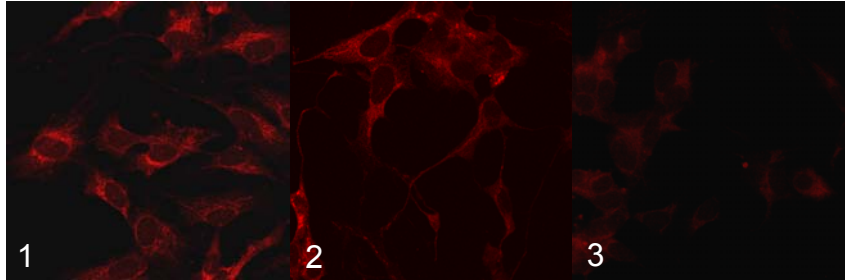


Figura 4.3. Immunostaining per SMN in cellule SH silenziate per SMN. Le cellule sono marcate con un anticorpo monoclonale contro SMN. 1: cellule SH di controllo; 2: cellule con una riduzione di SMN del 30%; 3: cellule SH con una riduzione di SMN del 70%. E' possibile vedere che la marcatura per SMN diminuisce al diminuire della sua trascrizione.

4.1.2 Distribuzione delle proteine Sm e Sm-like in cellule SMN knock-down

E' noto che il complesso proteico di cui fa parte SMN ha un ruolo importante per il re-importo nel nucleo delle snRNPs (v.di Introduzione) e che SMN è fondamentale per l'assemblaggio delle proteine Sm nel *core* delle RNPs ed è possibile che abbia un ruolo

simile per le proteine Sm-like (Friesen e Dreyfuss, 2000; Brahms et al., 2001). Per studiare la diversa distribuzione delle proteine Sm e Sm-like nei cloni SMN knock-down è stata condotta una marcatura con l'anticorpo monoclonale anti-SmY12, che riconosce selettivamente le proteine Sm quando sono incorporate in complessi snRNP (Brahms et al., 1997; Brahms et al., 2000), e con l'anticorpo policlonale anti-LSm1, che riconosce la proteina Sm-like 1. Come si può vedere in Figura 4.4 il complesso Sm snRNP presenta una normale distribuzione nucleare (in quanto Y12 presenta una marcatura esclusivamente nucleare) nei due cloni (pannelli B e C) rispetto al controllo rappresentato da cellule SH wt (pannello A). Anche LSm1, in questi due cloni SMN knock-down (pannelli E e F), presenta una normale distribuzione puntata nel citoplasma (strutture note come P-body) rispetto al controllo (pannello D), in quanto facente parte del complesso citoplasmatico LSm1-7. Quindi, la diminuzione di SMN non abbassa l'efficienza dell'assemblaggio e il re-importo nucleare delle particelle snRNPs, in accordo con il fatto che gli abbassamenti patologici di SMN non incidono sulla sopravvivenza di qualsiasi tipo cellulare. Inoltre, non è stato osservato nessun cambiamento del numero o dell'intensità dei P-body che richiedono il complesso Sm-like (Andrei et al., 2005).

Dunque, anche l'assemblaggio del complesso LSm1-7 non sembra essere disturbato.

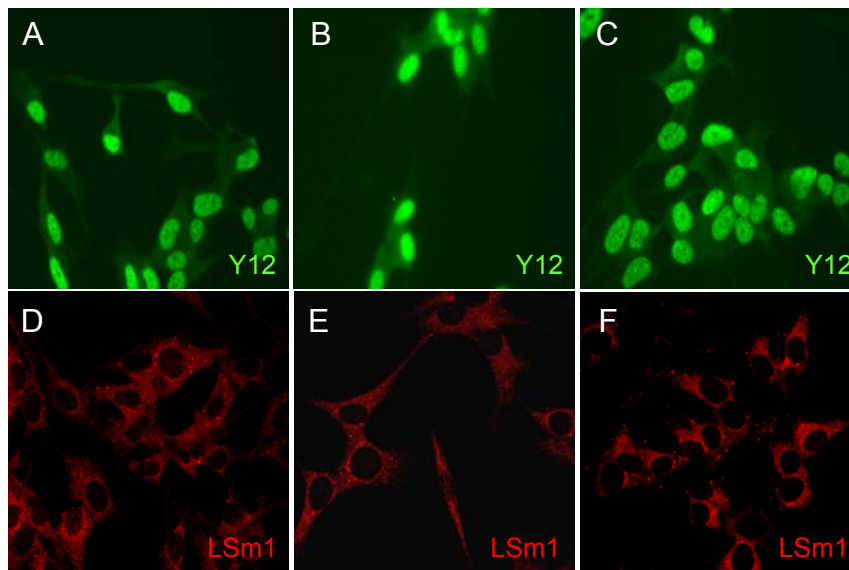


Figura 4.4. Distribuzione dei complessi Sm e Sm-like snRNP in cellule SH silenziate per SMN. Le cellule sono marcate con un anticorpo monoclonale Y12 (A-C) e con un anticorpo policlonale contro LSm1 (D-F). A e D: cellule SH di controllo; B ed E: cellule con una riduzione di SMN del 30%; C e F: cellule SH con una riduzione di SMN del 30%. E' possibile notare che la diminuzione di SMN non abbia effetto sulle proteine Sm e Sm-like.

Poiché la riduzione dei livelli proteici di SMN influisce in modo selettivo sui motoneuroni si è voluto studiare se questa diminuzione possa influenzare la distribuzione delle proteine Sm-like nei cloni silenziate, in particolar modo quando le cellule sono

differenziate. In primo luogo è stata analizzata la distribuzione di LSm1 sui cloni knock-down per SMN e come è possibile vedere in Figura 4.5 non si riscontra alcuna variazione nella localizzazione cellulare della proteina LSm1. Infatti, LSm1 mostra un normale segnale puntato sia nel corpo che lungo i prolungamenti cellulari (confronto tra i pannelli 2 e 3 con il controllo pannello 1), indicando che anche in cellule differenziate la diminuzione di SMN non influenza l'assemblaggio delle snRNP.

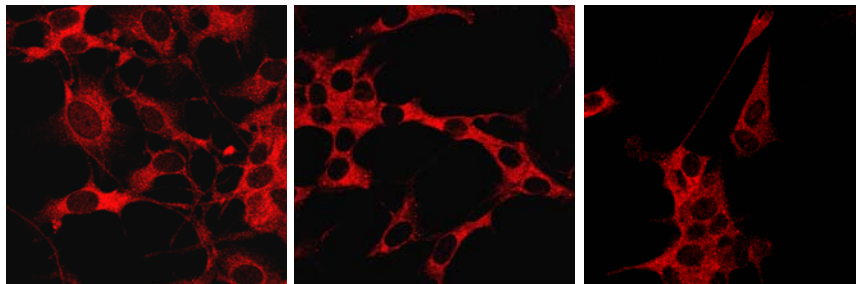


Figura 4.5. Distribuzione di LSm1 in cellule SMN knock-down differenziate. Le cellule sono marcate con un anticorpo policlonale diretto contro LSm1. 1: cellule SH di controllo; 2: cellule con una riduzione di SMN del 73%; 3: cellule SH con una riduzione di SMN dell'87%. E' possibile notare che la diminuzione di SMN non abbia effetto sulla distribuzione della proteina Sm-like 1.

4.1.3 Distribuzione di NF-H in cellule SMN knock-down

In modelli animali della SMA, in cui sono presenti livelli patologici di SMN, è stata riscontrata una organizzazione

aberrante del citoscheletro in cui si ritrova un massiccio accumulo di neurofilamenti (Cifuentes-Diaz et al., 2002). Per verificare se questa anormale distribuzione si ritrova anche in cellule SH SMN knock-down le cellule sono state differenziate in neurone tramite trattamento con cAMP. In seguito a differenziamento i cloni silenziati non mostrano avere alcun difetto nella crescita dei neuriti ma è stata osservata una anormale distribuzione dei neurofilamenti. Le cellule silenziate e differenziate sono state marcate con l'anticorpo monoclonale anti-NFH (catena pesante dei neurofilamenti). In Figura 4.6 sono riportate le immagini ottenute tramite microscopia confocale. Come è possibile vedere i cloni che hanno dei bassi livelli di SMN (pannelli B e C) presentano degli aggregati di neurofilamenti nel corpo cellulare, vicino al nucleo, rispetto a cellule SH wt (pannello A) che hanno una normale distribuzione di NHF nel citoplasma e lungo i prolungamenti assonali. Infatti, nei controlli (pannello 1) si ha un forte segnale di NFH anche lungo i prolungamenti cellulari a differenza dei cloni SMN knock-down (pannelli 2 e 3) in cui la quantità di NFH è minore. Questi dati indicano che la diminuzione di SMN influenza in qualche modo solo la distribuzione dei neurofilamenti. Questo fenomeno risulta altamente rilevante in quanto la presenza di aggregati di

neurofilamenti sono una caratteristica delle malattie che colpiscono i motoneuroni.

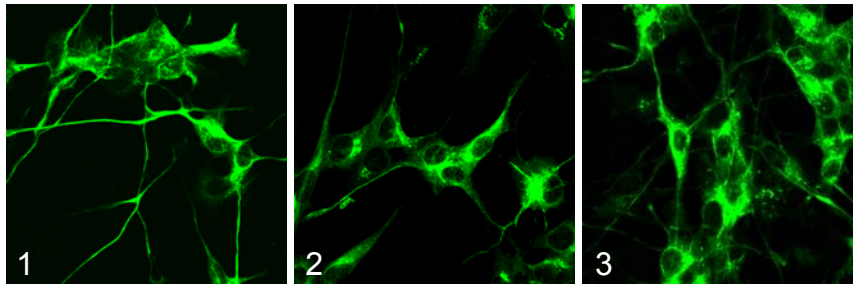


Figura 4.6. Immunostaining per NFH in cellule SH differenziate e silenziate per SMN. Le cellule sono trattate con un anticorpo monoclonale diretto contro NFH. 1: cellule SH di controllo; 2: cellule con una riduzione di SMN del 30%; 3: cellule SH con una riduzione di SMN del 70%. In entrambi, i cloni 2 e 3 mostrano un accumulo di NFH nel corpo cellulare mentre il controllo (1) mostra una normale distribuzione di NFH.

4.1.4 Sovra-espressione di SMN in linee di neuroblastoma wt

Per verificare che l'effetto osservato nella distribuzione dei neurofilamenti nei cloni SMN knock-down fosse specifico e per analizzare un possibile legame tra SMN e NFH, sono stati condotti degli esperimenti di sovra-espressione della proteina SMN in cellule SH wt differenziate e non. E' stato utilizzato un plasmide (v.di Materiali e Metodi per la costruzione del plasmide) in cui prima della sequenza di SMN è presente un HA-tag, prodotto da un corto peptide contenente un epitopo derivato dalla proteina virale emoagglutinina (HA). Le cellule sono state

trasfettate con il plasmide HA-SMN (pannelli A-C e G-I in figura 6) e con un plasmide di controllo che esprime solo l'HA-tag (pannelli D-F e L-N). Dopo la trasfezione le cellule sono state fissate e marcate con l'anticorpo anti-HA e con l'anticorpo anti-SMN. In Figura 4.7 sono mostrate le immagini acquisite al microscopio confocale. Nei pannelli A-F sono raffigurate le cellule SH wt non differenziate e nei pannelli G-N le cellule differenziate in seguito a trattamenti con cAMP. I pannelli A, D, G e L mostrano la marcatura per NFH (rosso), i pannelli B, E, H e M mostrano la marcatura per HA (verde), mentre i pannelli C, F, I e N sono immagini sovrapposte delle due marcature. Come è possibile vedere in Figura 4.7 le cellule che sovra-esprimono HA-SMN presentano degli aggregati citoplasmatici (pannelli A-C e G-I) che co-localizzano con NFH, non presenti nelle cellule di controllo (pannelli D-F e L-N), dove l'HA è assente. Infatti, l'emoagglutinina viene degradata e/o non viene fissata dal trattamento con paraformaldeide e viene eliminata durante i lavaggi fatti nei vari passaggi della tecnica di immunofluorescenza (V.di Materiali e Metodi). La presenza di aggregati in corpi di inclusione suggerisce una interazione tra SMN e NFH, in accordo con l'ipotesi che la diminuzione di SMN può alterare la distribuzione di NFH.

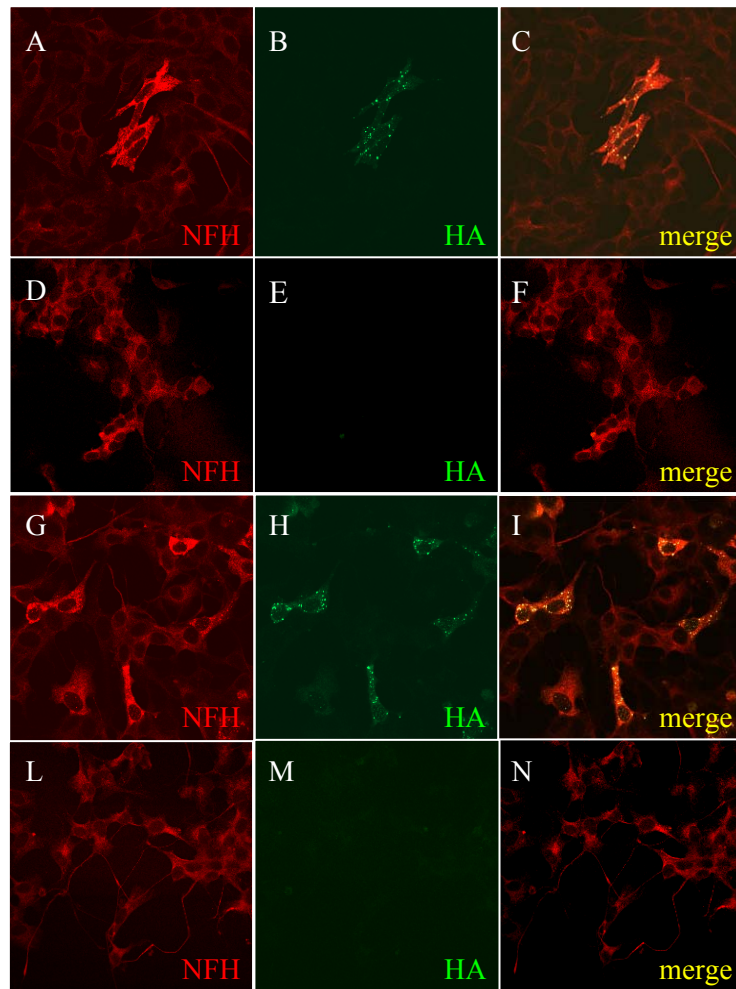


Figura 4.7. Sovra-espressione di SMN in cellule di neuroblastoma indifferenziate e differenziate. Le cellule sono state trasfettate con un costrutto che sovra-esprime SMN con un tag di emoagglutinina (HA) e successivamente marcate sia con l'anticorpo monoclonale anti-NFH che con l'anticorpo anti-ratto anti- HA. Anticorpo anti-NFH in rosso and anti-HA in verde. A-F cellule SH indifferenziate. G-N cellule SH differenziate. In A-C e G-I le cellule sono state trasfettare con SMN esogeno. In D-F e L-N le cellule sono state trasfettate solo con il plasmide HA e rappresentano il controllo. Le cellule in A-C e G-I presentano degli aggregati citoplasmatici che non si ritrovano nei controlli.

4.2 Ruolo neuronale del complesso LSm1-7

4.2.1 Localizzazione cellulare di LSm1 e LSm4 in vitro ed in vivo

Per studiare una possibile funzione neuronale del complesso LSm1-7 è stata, in primo luogo, analizzata la localizzazione cellulare delle proteine umane Sm-like in neuroni primari. E' stato utilizzato un anticorpo diretto contro LSm1 (Ingelfinger et al., 2002), in quanto questa proteina si associa in modo specifico con i P-body (Cougot et al., 2004; Ingelfinger et al., 2002) al contrario delle altre sei proteine LSm2-7, presenti anche nell'ubiquitario U6 snRNP (Achsel et al., 1999; Mayes et al., 1999; Salgano-Garrido et al., 1999). I neuroni sono preparati da midollo spinale e da cervelletto di ratto e marcate con l'anticorpo anti-LSm1. Per identificare i neuroni e allo stesso tempo rilevare i neuriti, i neuroni sono stati anche marcati con l'anticorpo monoclonale contro MAP2. Come mostrato in Figura 4.8 i neuroni che derivano dal midollo spinale mostrano (pannelli A-C) un segnale puntato (freccia rossa nel pannello A) nel corpo cellulare indicando che i P-body sono espressi anche nei neuroni. Inoltre, LSm1 mostra una distribuzione granulare nei neuriti (punta di freccia nel pannello A) dove è co-espressa con il marcatore dei microtubuli MAP2 (segnale giallo nel pannello C) mostrando

inoltre una distribuzione granulare (il dettaglio viene mostrato nell'ingrandimento nel pannello D). Le cellule del cervelletto sono cresciute e arricchite per le cellule del Purkinje e successivamente marcate con anti-LSm1 e anti MAP2. Rispetto ai neuroni di midollo spinale le cellule del Purkinje mostrano un elevato livello di LSm1 (pannello E), ma come per i neuroni di midollo, LSm1 è presente nei neuriti dove co-localizza con MAP2 (pannello F) e mostra una distribuzione granulare visibile nell'ingrandimento del pannello H. Quando i neuroni di midollo spinale sono cresciuti in presenza di siero fetale bovino tendono a formare degli aggregati in cui i neuriti formano un unico fascio di fibre. I pannelli da I a M mostrano l'aggregazione dei neuriti positivi per MAP2. Dentro i fasci l'espressione di LSm1 è concentrata in granuli lungo i neuriti (pannello M) suggerendo una associazione con i microtubuli.

Per determinare se anche altri componenti del complesso di LSm sono presenti nei neuriti è stata analizzata la distribuzione cellulare di LSm4, tramite marcatura con l'anticorpo policlonale anti-LSm4 e con l'anticorpo monoclonale anti-MAP2. Essendo LSm4 parte anche dell'U6 snRNP si osserva un forte segnale nel nucleo dei neuroni (Figura 4.9).

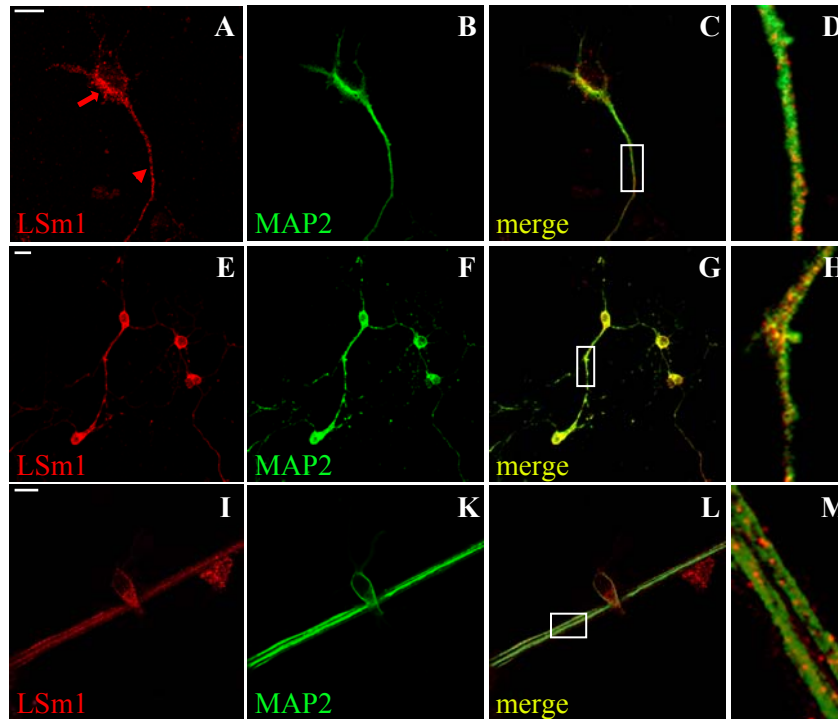


Figura 4.8. LSM1 localizza nei neuriti di neuroni primari. I neuroni di midollo spinale sono cresciuti in presenza di supplemento B27 (pannelli A-C), o in presenza di siero (pannelli I-M) per 7 *div*. Le cellule del Purkinje del cervelletto sono cresciute come descritto in Materiali e Metodi per 10 *div*. Le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale per MAP2 (verde) e con un anticorpo policlonale per LSM1 (rosso). Sono mostrate le immagini ottenute al microscopio confocale. La freccia rossa indica il segnale di LSM1 nel corpo cellulare mentre la punta di freccia indica l'espressione di LSM1 nei neuriti. I pannelli bianchi indicano aree di ingrandimento mostrate nei pannelli D, H e M. Nella figura è possibile vedere un segnale puntato di LSM1 sia nel corpo cellulare che lungo i dendriti. La barra di misura indica una lunghezza di 10 μm .

Inoltre, LSm4 è visibile anche lungo i neuriti dove forma strutture granulari, simili a LSm1, sia nei neuroni del midollo spinale (pannello A) che nelle cellule del Purkinje (pannello E). In conclusione, le proteine LSm formano i P-bodies nel corpo cellulare dei neuroni primari e formano strutture simili ai P-body nei neuriti delle cellule.

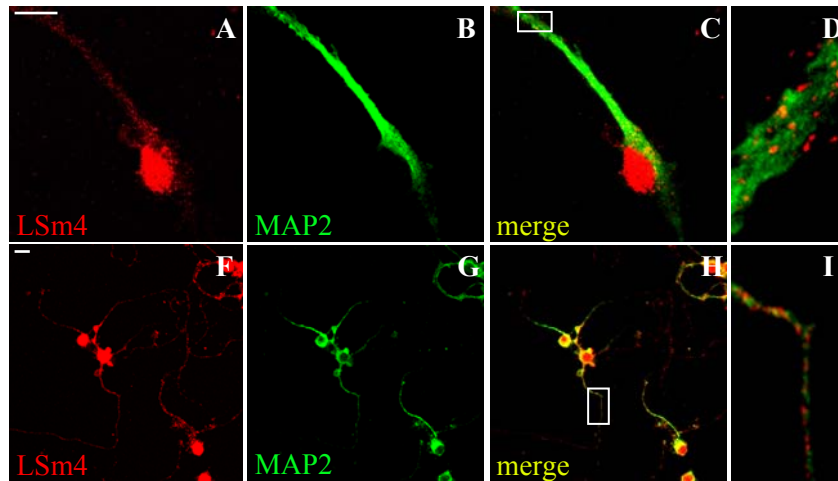


Figura 4.9. LSm4 localizza nel nucleo e nei neuriti di neuroni primari. I neuroni di midollo spinale e le cellule del Purkinje del cervelletto sono state crescite per 7 e 10 *div* rispettivamente. Le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale per MAP2 (verde) e con un anticorpo policlonale per LSm4 (rosso). Sono mostrate le immagini ottenute al microscopio confocale. I pannelli bianchi indicano aree di ingrandimento mostrate nei pannelli D e H. LSm4 mostra un forte segnale nel nucleo dei neuroni e un segnale puntato nei neuriti di entrambi i tipi di cellule neuronali. La barra di misura indica una lunghezza di 10 μ m.

4.2.2 Funzione dei P-body nei neuroni

Per studiare se la distribuzione delle proteine LSm, osservata in colture neuronali, è la stessa anche in vivo sono stati condotti esperimenti di immunostochimica su cervelli di ratto. Questi esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il laboratorio del Prof. Marco Molinari, presso la Fondazione Santa Lucia di Roma. Sezioni di corteccia cerebrale e di cervelletto sono mostrate in Figura 4.10. Tutte le cellule LSm1 positive sono caratterizzate da una distribuzione granulare, presente anche a distanza dal corpo cellulare (pannelli A,D e G). La doppia marcatura con LSm1 e i neurofilamenti mostra una significativa co-localizzazione (pannelli C e F). Nella corteccia cerebrale, come anche nel cervelletto, sia i grandi neuroni che le cellule piramidali e le cellule del Purkinje, così come anche i piccoli neuroni (probabilmente interneuroni), risultano essere positivi per LSm1. La doppia marcatura delle cellule del Purkinje con la Calbindina, un marcatore dendritico, mostra che LSm1 è chiaramente presente nei dendriti (pannelli G-I). Al contrario, la doppia marcatura con Sinaptofisina, un marcatore delle strutture pre-sinaptiche, non mostra nessuna sovrapposizione (pannelli K-M). Inoltre, è stato osservato che LSm1 è assente in tutte le fibre assionali nel cervello indicando che questa proteina è presente nei dendriti come anche

nel corpo cellulare ed è assente in strutture pre-sinaptiche e assonali.

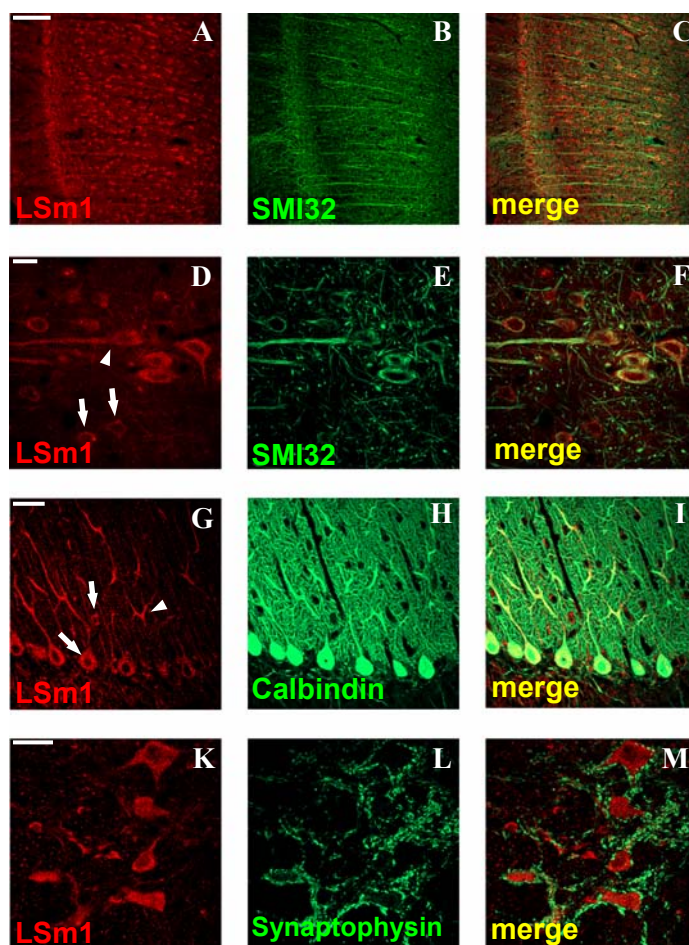


Figura 4.10 - Didascalia nella pagina seguente

Figura 4.10. LSm1 localizza in vivo nei dendriti e nel corpo cellulare. Le fettine di cervello di ratto sono state marcate con gli anticorpi anti-LSm1 (pannelli A, D, G e K), SMI32 (pannelli B ed E) e anti-Calbindina (H) e anti-Sinaptofisina (L). Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale. Sono mostrate sezioni di corteccia granulare retrospinale (A e D), corteccia cerebellare (G) e i nuclei profondi del cervelletto (K). Le punte di freccia nel pannello D indicano strutture puntate positive per LSm1 nei neuroni piramidali (D), mentre la freccia indica una simile struttura puntata. Nel pannello G, le frecce indicano strutture granulari di LSm1 nelle cellule del Purkinje e negli interneuroni (G), mentre le punte di freccia indica una simile struttura nell'albero dendritico delle cellule del Purkinje. Nel pannello M le frecce indicano le strutture pre-sinaptiche dove LSm1 è assente. Le barre di misura indicano nel pannello A una lunghezza di 100 μm e nei pannelli D, G e K di 20 μm .

Altri studi di immunistochemica hanno rilevato la stessa struttura puntata di LSm4 nei dendriti dei neuroni (dato non riportato). In particolare, per dimostrare che anche in tessuti neuronali LSm1 e LSm4 si associano, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione in cui vengono utilizzati anticorpi policlonali anti-LSm1 e anti-LSm4. La tecnica dell'immunoprecipitazione permette di immobilizzare su biglie di sefariosio, alle quali è legata la proteina A, anticorpi policlonali o monoclonali che legano in modo specifico le proteine ligandi presenti in un estratto proteico. In questo modo, è possibile immunoprecipitare una specifica proteina ed i complessi eventualmente ad essa associati. In Figura 4.11A viene mostrato il risultato delle immunoprecipitazioni. Come si può notare l'anticorpo anti-LSm4 oltre a precipitare LSm4 (corsia 2 figura

4.11B), co-precipita anche la proteina LSm1 (corsia 2 Figura 4.11A) con la stessa efficienza dell'anticorpo anti-LSm1 (corsia 1 figura 4.11A), indicando che le due proteine co-precipitano e si associano anche in tessuti neuronali.

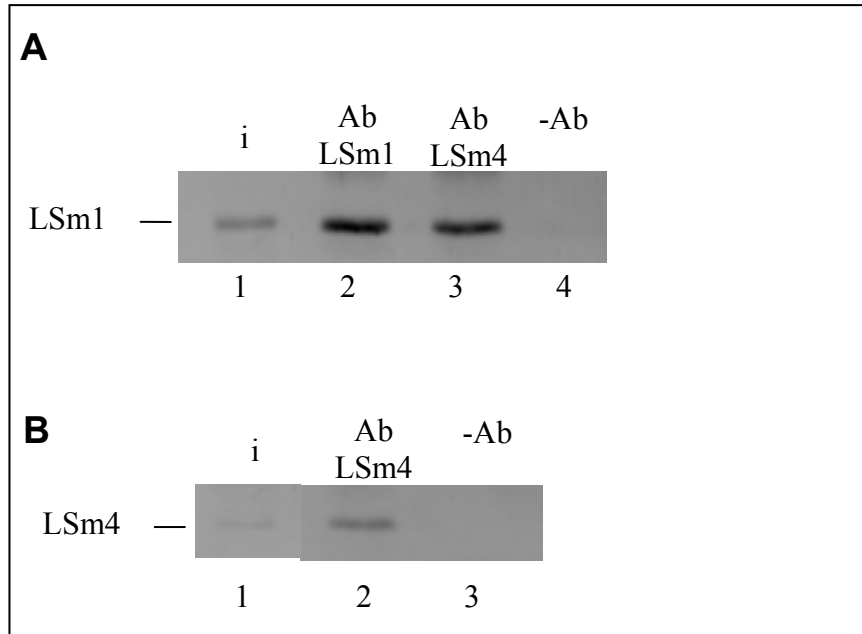


Figura 4.11. LSm1 co-immunoprecipita con LSm4. Gli esperimenti di immunoprecipitazione sono condotti, su estratti proteici di cervello totale di ratto, con anticorpi policlonali anti-LSm1 e LSm4. La co-immunoprecipitazione è stata analizzata tramite Western blot usando l'anticorpo policlonale anti-LSm1 e anti-LSm4. In A Western blot per LSm1; 1: input, 1/10 dell'estratto usato per l'immunoprecipitazione; 2: immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale anti-LSm1; 3: immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale anti-LSm4; 4: controllo negativo senza anticorpi. In B Western blot per LSm4; 1: input, 1/10 dell'estratto usato per l'immunoprecipitazione; 2: immunoprecipitazione utilizzando l'anticorpo anti-LSm4; 3: controllo negativo senza anticorpo. E' possibile vedere nella corsia 3 del pannello A che LSm1 co-immunoprecipita con LSm4.

4.2.3 Ruolo di LSM1 nella degradazione dei messaggeri e nel metabolismo delle mRNPs

La distribuzione di LSM1 trovata nei neuroni è molto simile ai P-body osservata in cellule umane HeLa (v.di Introduzione). Per determinare se i P-body trovati nei neuroni sono, anche in queste cellule, coinvolti nella degradazione dei mRNA è stata studiata la distribuzione dell'enzima di degradazione dei mRNA Dcp1a. Tale enzima è coinvolto nella prima fase di degradazione dei messaggeri ed è co-espresso con LSM1 nei P-body di HeLa (Ingelfinger et al., 2002; Lykke-Andersen, 2002). Nei neuroni di midollo spinale è stata espressa una proteina di fusione GFP-Dcp1a (verde nella Figura 4.12 pannello B) e successivamente le cellule sono state marcate con LSM1 (rosso nella Figura 4.12 pannello A), per vedere la sua distribuzione, e con MAP2 (blu nel pannello D) per visualizzare i processi neuronali. Nel corpo cellulare, le strutture granulari formate da LSM1 e GFP-Dcp1a co-localizzano perfettamente e compaiono come segnali puntiformi gialli nelle immagini sovrapposte (freccie gialle nel pannello C), indicando che i siti di arricchimento delle due proteine coincidono, come osservato in linee cellulari non differenziate. Fuori dal corpo cellulare, al contrario, le due proteine sembrano segregare: troviamo granuli di Dcp1a che contengono una piccola

o nessuna quantità di LSm1 (frecche verdi nel pannello C) e dei granuli di LSm1 che non contengono Dcp1a (frecche rosse nel pannello C). Questi dati suggeriscono che i neuroni contengono due tipi di P-body. Quelli che contengono Dcp1a, coinvolti nella degradazione dei messaggeri e quelli che contengono solo LSm1, nei quali questa proteina potrebbe avere un ruolo distinto.

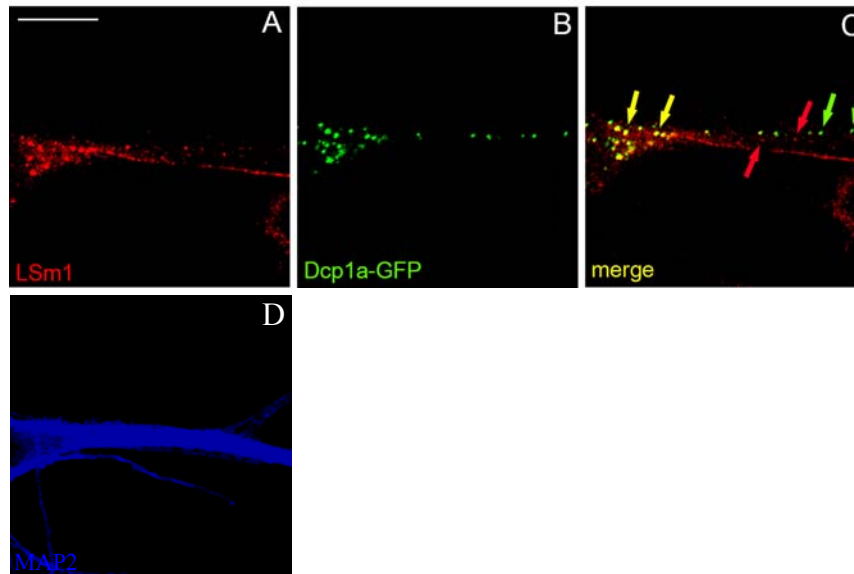


Figura 4.12. LSm1 co-localizza solo parzialmente con il fattore di decapping Dcp1a. I neuroni primari di midollo spinale sono stati trasfettati con una proteina di fusione GFP-Dcp1a (verde), cresciute per 4 *div* e marcate per LSm1 (rosso) e MAP2 (blu). Sono mostrate le immagini ottenute al microscopio confocale. LSm1 e Dcp1a co-localizzano in foci citoplasmatici (frecche gialle) ma non nei dendriti (frecche rosse e verdi rispettivamente). Barra di misura: 10 μ m.

Una possibilità potrebbe essere che LSm1 sia coinvolta nel metabolismo delle snRNPs oltre che nella degradazione dei messaggeri (Tharun e Parker, 2001). E' noto che in lievito LSm1 lega gli mRNA per la loro degradazione, ma probabilmente in assenza di degradazione questa interazione potrebbe essere stabile e rilevabile. Per verificare questa ipotesi, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale anti-LSm1. Gli RNA che sono co-precipitati con LSm1 sono stati isolati e tramite RT-PCR è stata rilevata la presenza di mRNA specifici. Sono stati studiati tre messaggeri che sono conosciuti localizzare nei neuriti cellulari, che codificano per le proteine β -actina, MAP1B e α -CaMKII. E' stato preso in considerazione, come controllo negativo, un ulteriore mRNA che codifica per un fattore di splicing dei pre-mRNA noto come LSm8 il quale non dovrebbe essere localizzato fuori dal corpo cellulare. Come mostrato in Figura 4.13, sia l'mRNA della β -actina che di MAP1B co-precipitano con LSm1 (corsie 2 e 5), dato non riscontrato nelle immunoprecipitazioni effettuate in assenza di anticorpo (corsie 3 e 6). La precipitazione dell'mRNA di α -CaMKII risulta avere un'efficienza molto più bassa (corsie 8 e 9) rispetto ai messaggeri di β -actina e MAP1B. Infine, l'mRNA di LSm8 non è presente in nessuna delle precipitazioni fatte con LSm1 (la corsie 11 e 12).

Questi dati dimostrano che LSm1 stabilmente e selettivamente si associa con le snRNPs, in particolare con alcuni mRNA che sono localizzati nei dendriti.

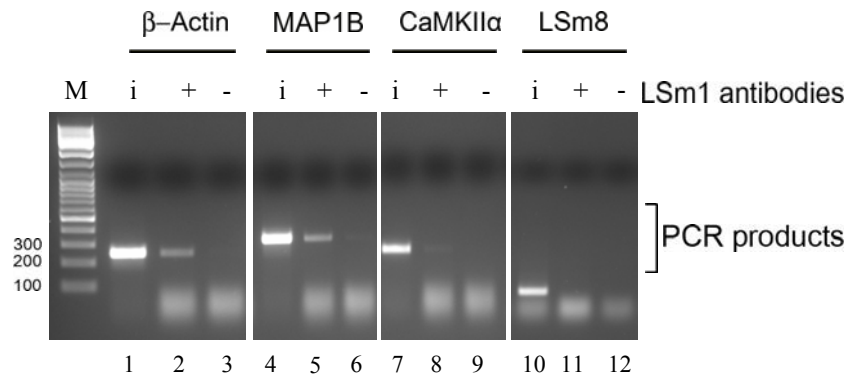


Figura 4.13. LSm1 lega i mRNA di β -actina, MAP1B e α -CaMKII. Gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati condotti con estratti proteici di cervello totale di ratto utilizzando l'anticorpo policlonale anti-LSm1 (corsie 2, 5, 8 e 11) e non (3, 6, 9 e 12). Gli RNA co-precipitati sono stati isolati e analizzati utilizzando oligo specifici per i messaggeri di β -actina, MAP1B, α -CaMKII e LSm8. Vengono mostrati i prodotti di PCR. Le corsie 1, 4, 7 e 10 rappresentano gli input utilizzando 1/10 degli estratti usati per le immunoprecipitazioni. Gli mRNA di β -actina, MAP1B e α -CaMKII sono co-immunoprecipitati con LSm1 a differenza di LSm8.

Abbiamo voluto studiare se LSm1 si lega agli mRNA in modo diretto. A tal fine, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione associati a crosslinking (protocollo adattato da Ule et al., 2003), in condizioni altamente stringenti utilizzando

il buffer RIPA, in cui le interazioni proteina-proteina e proteina-RNA vengono rotte. In queste condizioni né il messaggero di β -actina né di MAP1B sono co-precipitati con LSm1 (Figura 4.14 corsie 2 e 7). Dopo irradiazione con UV, gli mRNA che sono in contatto molecolare vengono legati covalentemente e in questo modo co-precipitati con LSm1. La precipitazione è più efficiente al decrescere del tempo di trattamento con UV (corsie 3,4,5 e 8,9,10) probabilmente perché gli RNA vengono danneggiati e ciò potrebbe inibire l'amplificazione. Poiché in queste condizioni stringenti gli mRNA co-precipitano con LSm1, solo se sono chimicamente legati, questi esperimenti dimostrano che LSm1 è in diretto contatto con gli mRNA.

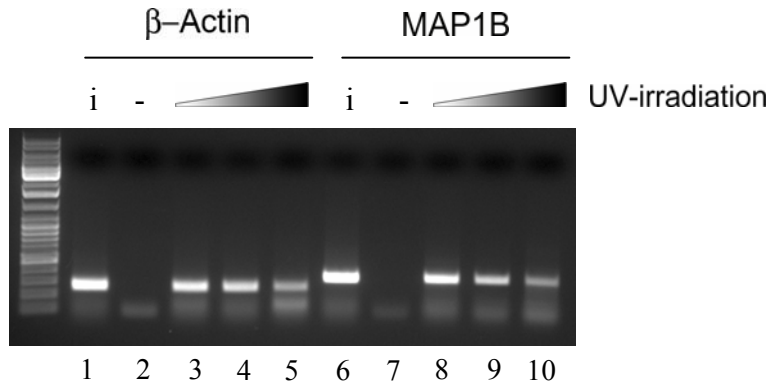


Figura 4.14. LSm1 lega direttamente i mRNA di β -actina e MAP1B. Gli estratti di cervello totale di ratto sono irradiati con UV per 0, 30, 60 e 120 secondi (corsie 2-5 e 7-10 rispettivamente) e le immunoprecipitazioni con LSm1 sono state condotte in condizioni semi-denaturanti. Gli mRNA co-precipitati sono analizzati tramite RT-PCR utilizzando oligi specifici per β -actina (corsie 1-5) e MAP1B (corsie 6-10). Nelle corsie 1 e 6 sono visualizzate le RT-PCR input utilizzando 1/20 degli estratti usati per ogni precipitazione. E' possibile vedere che LSm1 in seguito a trattamenti con UV lega in modo diretto i messaggeri di β -actina e MAP1B.

Per determinare la localizzazione cellulare del complesso LSm1-mRNPs sono stati condotti esperimenti di ibridazione *in situ* su neuroni di midollo spinale e cellule del Purkinje utilizzando una sonda per il messaggero della β -actina marcata con il fluoroforo CY5. In entrambi i tipi cellulari la sonda marca sia le cellule intere che i neuriti (verde nella Figura 4.15 pannelli A ed E) confermando i dati precedenti in cui il messaggero della β -actina è trasportato alla periferia delle cellule neuronali (Bassel et al., 1998; Olink-Coux e Hollenbeck, 1996). La specificità della marcatura è confermata dalla ibridazione fatta con un trascritto senso: nelle stesse condizioni di utilizzo del microscopio convocale si osserva solo un bassissimo segnale aspecifico (pannelli d e H). La marcatura con LSm1 (rosso nei pannelli A e F) mostra una chiara sovrapposizione del messaggero della β -actina nel corpo cellulare e lungo i neuriti dei neuroni (pannelli C e G). In particolare i siti di arricchimento di LSm1 nei neuroni di midollo spinale mostrano avere anche un arricchimento dell'mRNA della β -actina e appaiono gialli nelle immagini sovrapposte (pannello C). In conclusione, LSm1 stabilmente e selettivamente lega gli mRNA per localizzarli, almeno in parte, nei dendriti.

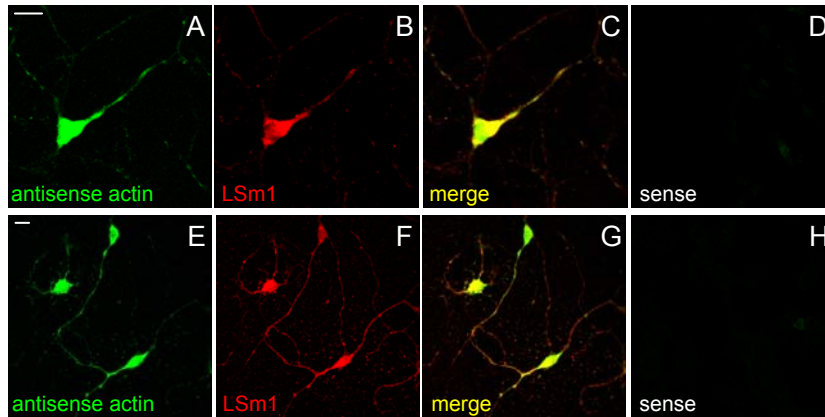


Figura 4.15. LSm1 co-localizza con l'mRNA di β -actina. I neuroni di midollo spinale (A-D) e le cellule del Purkinje (E-H) sono isolate, cresciute per 10 *div* e marcate con LSm1 e con una sonda antisense per il messaggero della β -actina marcata con il fluoroforo CY5 (pannelli A ed E). I pannelli D ed H rappresentano i controlli effettuati utilizzando una sonda senso. Sono mostrate le proiezioni di 11 scansioni di 4 μ m ognuna acquisite al microscopio confocale. Le ibridazioni *in situ* mostrano una chiara sovrapposizione di LSm1 con il messaggero dell'actina nel corpo cellulare e nei processi neuronali. Barra di misura 10 μ m.

4.2.4 Analisi dello stato dei messaggeri

E' noto che la degradazione di messaggeri avviene nei P-body ed uno step iniziale della degradazione prevede il taglio della poli-A dell'mRNA (Sheth e Parker, 2003). Per escludere che i messaggeri associati a LSm1 non sono solo nella via di degradazione ma sono legati anche al trasporto lungo i dendriti, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione associati a RT-PCR per determinare lo stato dei messaggeri. In particolare, dopo l'immunoprecipitazione è stata condotta una reazione di

trascrittasi inversa in cui per la sintesi dei cDNA vengono utilizzati oligo p(dT₂₀). Questo oligo si lega alla poli-A eventualmente presente al 3' del messaggeri permettendo la sintesi del cDNA ed in seguito l'amplificazione utilizzando a questo punto oligo specifici per gli mRNA di interesse. Come mostrato in Figura 4.16 nessuno dei messaggeri che inizialmente co-precipitavano con LSml viene amplificato (corsie 2, 5 e 8). Il fatto che gli mRNA non vengono rilevati non significa che gli mRNA sono nella via di degradazione. Infatti, è noto che uno dei metodi di silenziamento traduzionale momentaneo prevede l'accorciamento della poli-A e questo potrebbe spiegare perché i messaggeri analizzati non vengono amplificati.

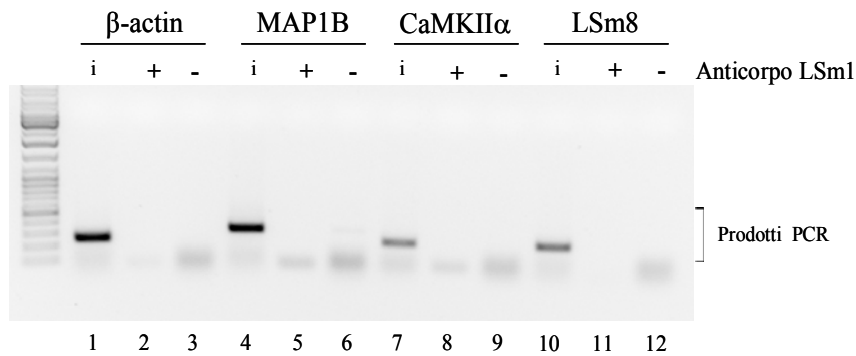


Figura 4.16. Gli mRNA di β -actina, MAP1B e α -CaMKII co-precipitati con LSm1 non hanno la poli-A. Per gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati utilizzati estratti proteici di cervello totale di ratto. Dopo immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale anti-LSm1 (corsie 2, 5, 8 e 11) e non (3, 6, 9 e 12) gli RNA co-precipitati sono stati isolati e analizzati utilizzando oligo specifici per i messaggeri di β -actina, MAP1B, α -CaMKII e LSm8. Nella reazione di retrotrascrizione sono stati usati come oligo dei dT₂₀ che si appaiano a lunghe sequenze di A. Vengono mostrati i prodotti di PCR. Le corsie 1, 4, 7 e 10 rappresentano gli input utilizzando 1/10 degli estratti usati per le immunoprecipitazioni. Nessuno dei messaggeri immunoprecipita con LSm1 indicando che gli RNA sono privi o hanno una piccola coda di poli-A.

4.2.5 Ruolo di LSm1 nella localizzazione dendritica e/o nella traduzione

I precedenti risultati suggeriscono che le snRNPs legate da LSm1 potrebbero essere trasportate lungo i dendriti e prendere parte alla locale sintesi proteica. Per verificare questo possibile legame con il trasporto delle mRNPs è stata analizzata l'associazione di LSm1 con un noto fattore di trasporto dei mRNA chiamato Staufen1

(Köhrmann et al., 1999; Tang et al., 2001). In primo luogo, LSm1 è stata immunoprecipitata da estratti proteici di cervello di ratto e successivamente analizzata la co-precipitazione della proteina Staufen attraverso analisi di Western blot. Come mostrato nel pannello in basso della Figura 4.17 la proteina LSm1 è appena visibile nell'input, ma è altamente arricchita nell'immunoprecipitato. Nella parte in alto della figura viene mostrato il blot per la proteina Staufen: nell'input si osserva un intenso segnale di bande multiple intorno al peso molecolare atteso di 60 kDa, in accordo con la presenza di diverse isoforme, mentre nella precipitazione di controllo si osserva solo un piccolo segnale di Staufen (corsia 3). Al contrario, nelle precipitazioni con anticorpi anti-LSm1 sono chiaramente visibili delle bande di Staufen (corsia 2), indicando una specifica co-precipitazione. L'efficienza della precipitazione suggerisce una debole associazione tra le due proteine o che l'associazione avvenga solo con un set della popolazione di Staufen.

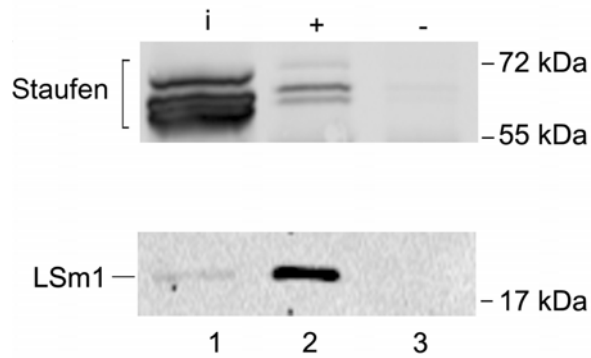


Figura 4.17. LSml si associa con la proteina Staufen. L'immunoprecipitazione (corsia 2) ed il controllo (corsia 3) sono analizzate tramite Western blot utilizzando gli anticorpi anti-LSml (pannello sotto) e anti-Staufen (pannello sopra). Il corsia 1 rappresenta 1/10 degli estratti utilizzati per ogni immunoprecipitazione. A destra sono riportati i pesi molecolari del marcatore e a sinistra le posizioni delle proteine Staufen e LSml. E' possibile vedere un arricchimento di LSml nella immunoprecipitazione (corsia 2) rispetto all'input (corsia 1) e nel pannello sopra le multiple isoforme di Staufen che co-immunoprecipitano in modo specifico con LSml, indicando che le due proteine si associano.

Per confermare l'associazione è stata esaminata la co-localizzazione di LSml e Staufen lungo i neuriti. Per questi studi i neuroni di midollo spinale di ratto sono stati trasfettati transientemente con il plasmide di fusione GFP-LSml e marcati dopo 4 giorni con l'anticorpo anti-Staufen. La Figura 4.18 mostra i neuroni trasfettati i quali presentano il segnale della GFP nel corpo cellulare e lungo i prolungamenti neuronali con una distribuzione irregolare (pannello A). La proteina Staufen mostra

una simile distribuzione con dei putativi granuli di trasporto visibile nel neurite (frece rosse nel pannello E). La sovrapposizione delle due immagini (pannello C) dimostra una parziale sovrapposizione tra GFP-LSm1 e Staufen nei processi neuronali (ingrandimento del pannello C nel pannello E): molti granuli contengono Staufen o LSm1 e appaiono rossi o verdi rispettivamente, ma alcuni granuli contengono entrambe le proteine e appaiono come punti gialli (frece gialle nel pannello E). In conclusione, solo una parte dei granuli contenenti Staufen si associa e co-localizza con LSm1.

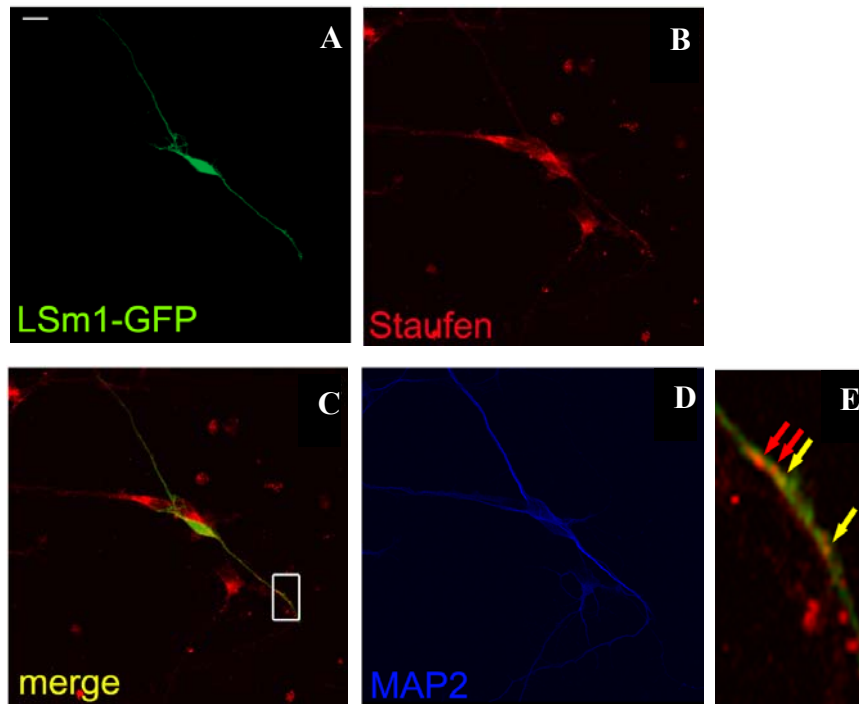


Figura 4.18. LSm1 co-localizza parzialmente con la proteina Staufen. I neuroni di midollo spinale sono trasfettati con un plasmide codificante la proteina di fusione GFP-LSm1. Dopo 4 giorni le cellule sono fissate e marcate con gli anticorpi Staufen (rosso) e Staufen (blu). La fluorescenza della GFP è mostrata in verde. Nel pannello C è mostrata la sovrapposizione delle immagini dei pannelli A e B; il pannello E mostra un ingrandimento del neurite indicato dal riquadro bianco nel pannello C. E' possibile vedere (pannello E) che molti granuli contengono solo LSm1 (frece rosse), indicando che LSm1 e Staufen co-localizzano solo parzialmente in granuli di trasporto (frece gialle). Barra di misura: 10 μ m.

E' noto che l'eccitazione di sinapsi stimolate provoca a questo livello una locale sintesi proteica, la quale è accompagnata da un

rapido trasporto delle mRNPs nelle spine dendritiche (Steward e Schuman, 2003). Per avvalorare l'ipotesi che LSm1 è coinvolta nella locale sintesi proteica, è stato studiato il trasporto di questa proteina nelle spine. A tal fine, le cellule del Purkinje sono state coltivate per 13 giorni (le colture di neuroni di midollo non sviluppano spine) e trattate per 15 minuti con KCl per polarizzare le i neuroni, stimolando in questo modo le sinapsi. Le cellule sono fissate e marcate con l'anticorpo per LSm1 e CaMKII α , la quale è presente nella densità post-sinaptica e risulta un marcatore delle sinapsi (Kennedy, 2000). Nelle cellule non stimolate LSm1 è confinata nel *core* del dendrite (Figura 4.19 pannello A), e CaMKII α la quale è presente nelle spine dei dendriti (Figura 4.19 pannello B e negli ingrandimenti pannelli D e E). Dopo 5 minuti di trattamento con KCl, LSm1 non rimane confinato nel *core* dei dendriti (pannello F), infatti si ritrova anche nelle spine vicino le sinapsi (freccie nei pannelli I e K). Inoltre, viene osservato un forte segnale granulare di LSm1 alla base delle spine dendritiche (punte di freccia), il quale non è presente nei controlli rappresentati dalle cellule non stimolate. In conclusione, LSm1 è parte delle mRNPs che sono tradizionalmente attivate dopo stimolazione sinaptica.

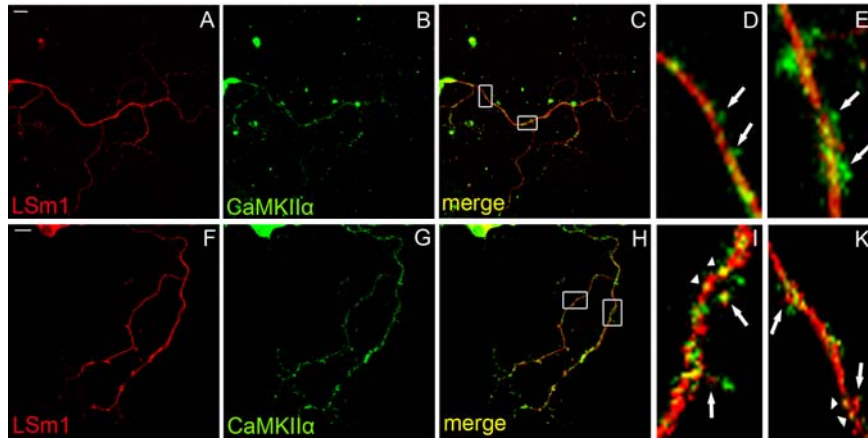


Figura 4.19. Stimolazioni con KCl portano ad una ri-localizzazione di LSm1 in prossimità delle spine dendritiche:

Le cellule del cervelletto sono mantenute in coltura per 13 *div*, fissate direttamente (pannelli A-E) o dopo 15 minuti di stimolazione con KCl 20 mM (pannelli F-K). Le cellule sono marcate con l'anticorpo monoclonale anti-CaMKII α (verde) e l'anticorpo policlonale anti LSm1 (rosso). Sono mostrate le singole immagini ottenute al microscopio confocale. I pannelli D, E, I e K sono degli ingrandimenti dei riquadri bianchi presenti nei pannelli C e H. Le frecce indicano le spine dendritiche mentre le punte di freccia indicano i granuli di LSm1 alla base delle spine.

Scala di misura 10 μ m. E' possibile notare che dopo 15 minuti di stimolazione LSm1 si localizza nelle spine dendritiche.

5. DISCUSSIONE

5.1 Effetto della modulazione di SMN sulla localizzazione delle proteine Sm, Sm-like e neurofilamenti

SMN è una proteina che svolge un ruolo chiave nell'assemblaggio e nella rigenerazione delle snRNPs, in quanto è fondamentale per assemblare le sette proteine Sm sulle snRNA. E' probabile che SMN svolga un ruolo simile anche per le proteine Sm-like (Friesen e Dreyfuss, 2000; Brahms et al., 2001). SMN è una proteina essenziale per tutti i tipi cellulari ma la sua riduzione provoca una morte selettiva dei motoneuroni. Studi condotti su cellule HeLa hanno evidenziato che una riduzione dei livelli di SMN porta ad un assemblaggio alterato delle snRNPs. Inoltre, in Zebrafish la mancanza di SMN provoca difetti nella crescita degli assoni motori, fenotipo ristabilito in seguito ad iniezioni con snRNPs (Winkler et al., 2005).

Per investigare sul possibile ruolo neuronale di SMN sono stati creati dei modelli cellulari, utilizzando la tecnica dell'RNA interference, che presentano livelli patologici di SMN. A differenza degli studi condotti da Winkler su cellule HeLa, i cloni di neuroblastoma SMN knock-down non mostrano nessuna alterazione nella localizzazione delle snRNPs. Infatti, utilizzando

l'anticorpo Y12 le proteine Sm presentano una normale localizzazione nucleare (Figura 4.4). Essendo Y12 in grado di riconoscere le proteine Sm solo quando sono incorporate nei complessi snRNPs, indica che i cloni SMN knock-down non presentano alterazioni nell'assemblaggio delle snRNPs. E' probabile che in questo tipo cellulare l'abbassamento di SMN ottenuto non sia sufficiente a disturbare l'assemblaggio delle snRNPs o anche che l'assemblaggio sia solo. Anche la localizzazione di LSm1 non viene disturbata dalla riduzione di SMN (Figura 4.4), confermando gli studi condotti da Andrei et al. che dimostrano che non c'è nessun cambiamento del numero o dell'intensità dei P-body dipendente dal complesso Sm-like. Inoltre, abbiamo osservato che i cloni SMN knock-down differenziati presentano una normale distribuzione puntata di LSm1 nel corpo cellulare e lungo i prolungamenti (Figura 4.5), indicando che anche l'assemblaggio del complesso LSm1-7 non viene alterato dalla diminuzione di SMN.

Questi dati sono in accordo con il fatto che gli abbassamenti patologici di SMN non incidono sulla sopravvivenza di qualsiasi tipo cellulare. Infatti, sono nella SMA sono solo i neuroni motori ad essere colpiti. E' probabile che nelle linee cellulari utilizzate la funzione di SMN non coincida con il normale funzionamento

neuronale. E' probabile che in cellule altamente specializzate come i neuroni SMN svolga un ruolo che non può essere osservato su cellule immortalizzate.

I motoneuroni derivanti da modelli animali di SMA presentano anomalie sull'organizzazione del citoscheletro e si ritrovano accumuli di neurofilamenti nel corpo cellulare (Cifuentes-Diaz et al., 2002). Inoltre, è stato osservato che una moderata espressione di neurofilamenti in cellule 3T3 non altera la morfologia delle cellule, mentre quando i neurofilamenti sono sovra-espressi la struttura e le funzioni cellulari vengono alterate (Szebenyi et al., 2002). Inoltre, cellule che sovra-esprimono NFH mostrano la presenza di più nuclei indicando una disfunzione nella divisione cellulare dovuto all'accumulo di neurofilamenti in aggregati impedisce la divisione. La sovra-espressione di molecole ricombinanti di SMN in cellule COS, neuroni primari e fibroblasti derivanti da pazienti affetti da SMA, determina la formazione di aggregati citoplasmatici (Dodds et al. 2001).

Gli esperimenti di distribuzione dei neurofilamenti sui cloni knock-down per SMN hanno rilevato, oltre un rallentamento nella crescita cellulare, anche un anormale addensamento di NFH nel corpo cellulare vicino al nucleo. Questi dati indicano che la sotto espressione di SMN influenza la distribuzione di NFH in accordo

con il fatto che molte malattie a carico dei motoneuroni hanno come caratteristica l'accumulo di neurofilamenti nel corpo cellulare e nei processi prossimali. E' evidente che sia la sovra-espressione di SMN che la sovra-espressione dei neurofilamenti portano entrambe allo stesso effetto, ossia l'accumulo di NFH nel corpo cellulare. In particolare, gli esperimenti di sovra-espressione di HA-SMN in linee cellulari SH-SY5Y wt hanno evidenziato la presenza di aggregati citoplasmatici di NFH in corpi di inclusione co-associati con SMN (Figura 4.7). Questi dati inducono a pensare ad una probabile interazione proteica tra SMN e NFH non osservata mai fino ad oggi.

L'assenza di alterazioni nella distribuzione delle proteine Sm e LSm1, nell'assemblaggio e il re-importo nucleare delle snRNP e nell'assemblaggio del complesso di LSm1-7 sta ad indicare che i cloni SMN knock-down non possono essere considerati validi modelli per studiare la funzione neuronale di SMN. Un'altra ipotesi è che in queste linee cellulari l'abbassamento di SMN non è tale da alterare l'assemblaggio delle snRNPs. Il fatto che i cloni SMN knock-down presentano delle caratteristiche tipiche delle malattie neuropatologiche indica che questi modelli cellulari di SMA possono essere considerati dei buoni esempi per studiare la

morfologia cellulare generale ed in particolar modo l'organizzazione del citoscheletro.

5.2 Studio del ruolo neuronale del complesso LSm1-7

La proteina Sm-like LSm1, in lievito, è coinvolta nella degradazione degli mRNAs. In linee cellulari di mammifero, questa è richiesta per l'integrità dei P-body, nei quali ha luogo la degradazione dei messaggeri. In questi studi viene mostrato che nel corpo cellulare di neuroni primari LSm1 è arricchita in strutture granulari contenenti il fattore di degradazione degli mRNA Dcp1a, corrispondenti ai P-body. Simili strutture granulari di LSm1 sono anche trovate in neuroni di cervello di ratto *in vivo*, e si può assumere che tali strutture contengano Dcp1a, indicando che i P-body si formano non solo in linee cellulari immortalizzate. Nei processi neuronali, è stata riscontrata un'alta concentrazione della proteina LSm1 ad una considerevole distanza dal corpo cellulare. Questa osservazione è stata fatta sia in neuroni primari *in vitro* (Figura 4.8) che in varie regioni del cervello di ratto *in vivo* (Figura 4.10). Parte di questa proteina LSm1 dendritica è anche presente in strutture granulari particolarmente evidenti nelle cellule del Purkinje *in vivo* (Figura 4.10). Il fatto che LSm1 e i rispettivi granuli non sono presenti nello stesso modo in tutti i

neuroni può riflettere sulla specificità funzionale dei vari tipi di neuroni. Sono state trovate forti evidenze che LSM1 nei dendriti non prende parte alla degradazione dei messaggeri ma è coinvolta nella localizzazione e nella locale sintesi degli mRNA. Il fattore Dcp1a, il quale esegue il primo step irreversibile di degradazione dei messaggeri, co-localizza con i granuli di LSM1 solo nel corpo cellulare; lontano dal corpo cellulare i granuli contenenti LSM1 sono distinti da quelli che contengono Dcp1a, indicando una separazione funzionale (Figura 4.12). Non si può comunque escludere che i corpi contenenti LSM1 contengano una diversa isoforma del fattore di rimozione del Cap e che non siano coinvolti anche nella degradazione dei messaggeri. Infatti, Dcp1a ha un omologo, chiamato Dcp1b, conservato in tutte le cellule di mammifero e quando è espresso si localizza nei P-body (Cougot et al., 2004). Comunque, il fattore Dcp1b non è neurone-specifico e non è stata osservata la presenza di altre isoforme di Dcp1a. Probabilmente i granuli che si trovano nei prolungamenti sono privi di attività di rimozione del Cap. La nozione che LSM1 compie anche altre funzione oltre che la degradazione degli mRNAs è stata confermata da esperimenti di co-immunoprecipitazione, in cui LSM1 stabilmente si associa a diversi mRNAs, come ad esempio il messaggero della β -actina.

L'associazione stabile con gli mRNAs è contraria ad un processo dinamico come quello della degradazione dei messaggeri. Almeno una parte delle stabili LSM1 snRNP sono localizzate in regioni distali dei neuroni, dove LSM1 non co-localizza con Dcp1a ed esiste una forte associazione tra LSM1 l'mRNA della β -actina, lungo i dendriti. Infine, la depolarizzazione delle sinapsi, determinata da trattamenti con KCl, causa una forte ri-localizzazione di LSM1 verso le spine. Questo corrisponde al normale comportamento delle mRNPs che sono tradizionalmente attivate dopo stimolazione sinaptica (Antar et al., 2004; Krichevsky e Kosik, 2001; Steward e Worley, 2001), e ciò suggerisce che LSM1 è presente su queste mRNPs. Così, LSM1 componente dei P-body è coinvolto non solo nella degradazione dei messaggeri ma anche nella localizzazione delle snRNP nei neuriti e/o la loro locale traduzione.

E' noto che gli mRNA sono trasportati in regioni distali lontane dal corpo cellulare. Nei dendriti, dove la locale traduzione dei messaggeri porta nelle sinapsi ad una rapida e specifica nuova sintesi proteica, la quale è necessaria per l'adattamento a lungo termine delle sinapsi e quindi per l'apprendimento e la memoria (Steward e Schuman, 2003). Anche la crescita assonale coinvolge la nuova sintesi proteica, la quale è richiesta per la mobilità del

cono di crescita e per la direzionalità assonale (Piper e Holt, 2004). Per la maturazione degli assoni nei mammiferi, invece è stato dimostrato che gli mRNA sono localizzati o la sintesi delle proteine avviene in questi domini. In accordo con la nozione che LSM1 è coinvolta nella locale sintesi proteica, è stata osservata la presenza di LSM1 nei dendriti, ma non nei domini pre-sinaptici assonali (Figura 4.10) e nelle regioni del cervello che contengono esclusivamente fibre assonali (corpo calloso; dato non mostrato). La localizzazione dendritica è stata trovata in tutte le regioni del cervello (Figura 4.10) come anche in tutti e tre i tipi di neuroni esaminati: neuroni primari di midollo spinale, cellule del Purkinje e neuroni ippocampali (Eleuteri B., Bagni C. e Achsel T., osservazioni non pubblicate). Così, questo sembra essere un fenomeno generale. Comunque, l'espressione dendritica di LSM1 varia: questo è particolarmente pronunciato nelle cellule del Purkinje dove la struttura granulare di LSM1 è ancor più evidente *in vivo* (Figura 4.10). Sembra che questi abbiano più bisogno di LSM1-snRNP localizzato rispetto ad altri. LSM1 mostra una preferenza nell'associazione delle snRNP: mentre gli mRNA costitutivi non sono legati, tre messaggeri localizzati sembrano legarsi con vario grado di associazione (Figura 4.13). Abbiamo supposto che questa selettività può essere legata alla capacità in se

di LSm1 di legare gli mRNA. Le proteine della famiglia Sm/Sm-like formano eptameri che hanno affinità per oligo(U) RNA. Questo dipende da un comune dominio Sm che hanno tutte le proteine appartenenti a questa famiglia (Achsel et al., 2001). Probabilmente LSm1 come eptamero si lega direttamente agli mRNA (Figura 4.14). Abbiamo notato che sia nel 3'-UTR della β -actina che di MAP1B sono presenti sequenze di oligo(U), contenenti anche più di dieci uridine di seguito. Nel 3'-UTR di MAP2 è stato trovato un elemento che determina la localizzazione dendritica di questo messaggero (Blichenberg et al., 1999). Infatti, il 3'-UTR di MAP2 contiene quattro sequenze di oligo(U) lunghe ognuna 5 o 6 nucleotidi. In questo modo, LSm1 potrebbe contribuire alla selezione dei messaggeri che hanno una localizzazione dendritica.

Ovviamente, sono necessari altri fattori trans-agenti per poter discriminare i complessi LSm1-mRNA che sono legati alla degradazione dei messaggeri da quelli che sono trasportati nei dendriti. Probabilmente, la presenza di altre proteine coinvolte nel trasporto degli mRNA, come Staufen o FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein), potrebbero salvare i messaggeri dalla degradazione e portare gli mRNA verso il trasporto. In effetti, Staufen è presente su LSm1 snRNP e le due proteine co-

localizzano (Figura 4.18); questa associazione, comunque, risulta solo parziale, indicando che solo un piccolo set di LSm1 RNP contiene Staufen. In modo simile, LSm1 e FMRP co-localizzano solo parzialmente (Eleutori B., Bagni C. e Achsel T.; osservazioni non pubblicate). In questo modo, i fattori discriminanti rimangono elusivi. Una possibilità potrebbe essere che le variazioni nella composizione dell'eptamero LSm potrebbero distinguere tra la degradazione e la via di trasporto, similarità già trovata nelle sei proteine LSm da 2 a 8: quando il complesso contiene la proteina LSm8, lega l'snRNA U6 e diventa nucleare; se il complesso contiene LSm1 diventa citoplasmatico ed è coinvolto nella degradazione degli mRNA. Abbiamo dimostrato che LSm1 e LSm4 sono presenti nei neuriti di colture di neuroni (Figura 4.9) e nei dendriti in vivo (Figura 4.10). Si potrebbe immaginare che una delle rimanenti proteine legate alla degradazione dei messaggeri, LSm2, 3, 5 o 7, potrebbe essere sostituito da altre proteine Sm o LSm portando l'eptamero ad avere una differente identità. Ad esempio, RAP55 è un membro dalla famiglia Sm (Albrecht e Lengauer, 2004) ed è presente nei P-body (Yang et al., 2006) ma non è stato ancora assegnato all'eptamero Sm/LSm.

In conclusione, i neuroni di mammifero contengono i P-body in due differenti tipi di strutture granulari: quelle che contengono

l'enzima di rimozione del Cap Dcp1a e quindi coinvolti nella degradazione degli RNA messaggeri, e quelli che contengono LSM1 e che sono quindi implicati nella localizzazione dendritica e/o traduzione. Solo nel corpo cellulare dei neuroni le due strutture si sovrappongono e diventano indistinguibili. In lievito e in linee cellulari di mammiferi indifferenziate sono presenti solo un tipo di P-body e tutti i fattori conosciuti co-localizzano. Così, sembra esserci una specializzazione dei P-body, per il metabolismo e il controllo degli mRNA, in cellule differenziate altamente specializzate quali i neuroni.

6. CONCLUSIONE

Le analisi condotte sui cloni SMN knock-down, ottenuti tramite RNA interference, hanno rilevato che la diminuzione di SMN non coinvolge l'assemblaggio e il re-importo nucleare delle snRNP. Inoltre, anche l'assemblaggio del complesso LSm1-7 non viene disturbato dalla riduzione dei livelli di SMN. Anche se questi cloni SMN knock-down presentano caratteristiche tipiche delle malattie che colpiscono i neuroni motori, come ad esempio la presenza di aggregati di NFH nel corpo cellulare, potrebbero non avere dei livelli di SMN tali da disturbare la normale biogenesi delle snRNP. In più, gli esperimenti sono stati effettuati su linee cellulari e non su neuroni primari dove potrebbe esistere una via differente di regolazione. Infatti, gli studi condotti su neuroni di midollo spinale, cellule del Purkinje e neuroni ippocampali hanno rilevato un meccanismo di localizzazione dendritica mai osservata in linee cellulari. Ad esempio, per la prima volta è stato osservato che una proteina Sm-like, quale LSm1, si localizza lungo i dendriti in strutture puntate non considerate essere coinvolte nella degradazione degli mRNA come i P-body. Un altro dato rilevante è la capacità di LSm1 di legare in modo specifico messaggeri che devono essere localizzati lungo i dendriti, come β -actina, MAP1B

e α -CaMKII. Anche se non è mai stata osservata una interazione tra LSm1 e SMN non si può escludere che la localizzazione dei messaggeri tramite LSm1 richieda anche la presenza di SMN. Ad oggi, è noto che SMN interagisce con le proteine Sm per l'assemblaggio delle snRNP e che l'eptamero formato dalle proteine Sm contiene solo ed esclusivamente proteine Sm. Fino ad oggi è stato riportato che anche gli eptameri formati dalle proteine Sm-like contengono solo proteine Sm-like ma è anche vero che a seconda della composizione dell'eptamero i complessi hanno funzioni e localizzazioni differenti. Le proteine LSm2-8 interagiscono con U6 snRNA e l'assemblaggio avviene nel nucleo dove U6 snRNA interagisce con U4 snRNA nella reazione di splicing. Invece, il complesso formato dalle proteine LSm1-7 ha localizzazione citoplasmatica e svolge un ruolo completamente differente quale il suo coinvolgimento nella degradazione degli mRNA. Il fatto che le proteine Sm-like possano formare complessi differenti con altrettante funzioni differenti non esclude la possibilità della presenza di complessi contenenti non solo esclusivamente proteine Sm-like ma anche altre proteine non appartenenti a questa famiglia come è anche possibile che i complessi non siano formati necessariamente da sette proteine. Come osservato per la prima volta in neuroni primari, LSm1 co-

localizza nel corpo cellulare con l'enzima di decappaggio Dcp1a, nei P-body, andando così a prendere parte al processo di degradazione dei messaggeri. E' anche vero che LSm1 è stato trovato in strutture simili ai P-body non contenenti però Dcp1a, dove in questo caso LSm1 potrebbe svolgere altre funzioni. Ad esempio il fatto che è in grado di legare solo specifici messaggeri dà un nuovo ruolo a LSm1, il quale potrebbe essere parte di nuovi complessi implicati nella localizzazione dendritica e/o anche nella traduzione. Ad esempio i complessi potrebbero contenere anche Staufen, proteina coinvolta nel trasporto degli mRNA, visto che si è trovata una parziale co-localizzazione delle due proteine. Il fatto che in linee cellulari SMN knock-down non è stata osservata nessuna variazione sull'assemblaggio del complesso LSm1-7 potrebbe essere spiegato dal ruolo neuronale specifico di LSm1. Ossia, nei neuroni dove potrebbe esistere un meccanismo di regolazione differente, dove LSm1 fa parte di nuovi complessi, e potrebbe in questo caso essere in qualche modo richiesta la presenza di SMN. Una prospettiva interessante potrebbe essere quella di silenziare LSm1 ed andare a vedere se i neuroni presentano caratteristiche tipiche della SMA ed anche quale effetto ha sulla localizzazione o funzione di SMN. In questo modo, se la diminuzione di LSm1 altera la distribuzione di SMN e

le due proteine interagiscono in cellule specializzate come i neuroni potrebbe indurre a pensare che la diminuzione di SMN potrebbe interferire con i meccanismi di localizzazione e/o traduzione che coinvolgono LSm1, andando a influire in modo negativo sulla crescita cellulare.

7.BIBLIOGRAFIA

Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M. e Lührmann, R. (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.* **18**, 5789-802.

Achsel, T., Stark, H. e Lührmann, R. (2001). The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3685-3689.

Albrecht, M. e Lengauer, T. (2004). Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett.* **569**, 18-26.

Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R. and Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* **11**, 717-727.

Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C. e Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J. Neurosci.* **24**, 2648-2655.

Azouz, T.N., Gruber, A. e Schumperli, D. (2005). U7 snRNP-specific Lsm11 protein: dual binding contacts with the 100 kDa zinc finger processing factor (ZFP100) and a ZFP100-independent function in histone RNA 3' end processing. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2106-2117.

Bassell, G. J., Zhang, H., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., Lifshitz, L.M., Herman, I. M. e Kosik, K. S. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* **18**, 251-265.

Beggs, J.D. (2005). LSm proteins and RNA processing. *Trends Genet.* **19**, 295-8.

Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U. e Filipowicz W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** 14428– 14433.

Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C. C., Richter, D. e Kindler, S. (1999). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J.Neurosci.* **19**, 8818-8829.

Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C. E. and Sachs, A. B. (1998). Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. *Mol.Cell Biol.* **18**, 5062-5072.

Brahms, H., Raker, V.A., van Venrooij, W.J. e Luhrmann R. (1997). A major, novel systemic lupus erythematosus auto antibody class recognizad the E, F, and G Sm snRNP proteins as an E-F-G complex but not in their denaturated states. *Arthritis and Rheum* **40**,672-82.

Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyseri, F., Meheus, L. e Luhrmann R. (2000). The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-

cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **275**, 17122-17129.

Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. e Luhrmann R. (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* **7**, 1531-1542.

Bregues, M., Teixeira, D. and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-489.

Cartegni, L., Astings M.L., Calarco, J.A., de Stanchino, E. e Krainer A.R. (2006). Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet.* **78**, 63-77.

Cerutti, H. (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.* **19**, 39– 46.

Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M. e Dreyfuss G. (2000). Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.* **148**, 1177-1186.

Cifuentes-Diaz, C., Nicole, S., Velasco, M.E., Borra-Cebrian, C., Panozzo, C., Frugier, T., Millet, G., Roblot, N., Joshi, V. e Melki J. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Gen.* **11**, 1439-1447.

Cougot, N., Babajko, S. e Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* **165**, 31-40.

De Stasio, G., Mercanti, D., Ciotti, M. T., Dunham, D., Droubay, T. C., Tonner, B. P., Perfetti, P. e Margaritondo, G. (1994). Aluminium in rat cerebellar primary cultures: glial cells and GABAergic neurones. *Neuroreport* **5**, 1973-1976.

Dernburg, A.F. e Karpen, G.H. (2002). A chromosome RNAi, *Cell* **111**, 159-162.

Dodds, E., Dunckley, M.G., Roberts, R.G., Muntoni, F. e Shaw, C.E. (2001). Overexpressed human survival motor neurone isoforms, SMN Δ exon7 and SMN+exon7, both form intranuclear gems but differ in cytoplasmic distribution. *FEBS Lett.* **495**, 31-8.

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. e Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *EMBO J.* **20**, 6877-6888.

Eystathiou, T., Jakymiw, A., Chan, E. K., Seraphin, B., Cougot, N. and Fritzler, M. J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* **9**, 1171-1173.

Ferraiuolo, M. A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E. L., Schoenberg, D. R. and Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol.* **170**, 913-924.

Fleischer, T.C., Weaver C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L. e Link, A.J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* **15**, 1294-1307.

Fried, H, e Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1659-1688.

Friesen, W.J. e Dreyfuss G. (2000). Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) sroteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J. Biol. Chem.* **275**, 26370-26375.

Gallo, V., Ciotti, M. T., Coletti, A., Aloisi, F. e Levi, G. (1982). Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7919-7923.

Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. e Juckusch, H. (1999). A Role for Polyproline Motifs in the Spinal Muscular Atrophy Protein SMN. *J. Biol. Chem.* **274**, 37908-37914.

Gubitz A.K., Feng, W. e Dreyfuss G. (2004). The SMN complex. *Exp. Cell Res.* **296**, 51-56.

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. e Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146–1150.

Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B. e Matera, A.G. (2001). Colin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.* **15**, 2720-2729.

Huber, J., Dickmanns, A., e Luhrmann, R. (2002). The importin-beta binding domain of snuportin 1 is responsible for the Ran and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J. Cell Biol.* **156**, 467-479.

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16961-16966.

Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Lührmann, R. e Achsel, T. (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*. **8**, 1489-1501.

Izaurralde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C. e Mattaj, I.W. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**, 709-712.

Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. e Golrich D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16**, 6535-6547.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G. e Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Genome Biol.* **2**, 231– 237.

Kambach, C., Walke, S., Young, R.A., Avis, J.M., De la Fortelle, E., Raker, V.A., Luhrmann, R., Li, J. e Nagai, K. (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their

implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**, 375-387.

Kanai, Y., Dohmae, N. e Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513-525.

Kashima, T. e Manley, J.L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in the spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **34**, 460-463.

Kedersha, N. e Anderson, P. (2002). Stress granules: Sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 963–969.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., e Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884.

Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* **290**, 750-754.

Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G. e Kiebler, M. A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2945-2953.

Krichevsky, A. M. e Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683-696.

Lefebvre, S., Burgle, L., Reboullet, S., Clemrmon, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **13**, 155-165.

Lerner, E.A., Lerner, M.R., Janeway, C.A., Steitz, J.R. e Steitz J.A. (1981). Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: Probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2737-2741.

Liu, Q., Fisher, U., Wang, F. e Dreyfuss G. (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90**, 1013-1021.

Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R. and Hannon, G. J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1261-1266.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719-723.

Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8114-8121.

Marshallsay, C. e Luhrmann, L. (1994). In vitro nuclear import of snRNPs: cytosolic factors mediate m3G-cap dependence of U1 and U2 snRNP transport. *EMBO J.* **116**, 222-231.

Mayes, A. E., Verdone, L., Legrain, P. e Beggs, J. D. (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J.* **18**, 4321-4331.

Meyer, S., Temme, C. and Wahle, E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 197-216.

Minshall, N., Thom, G. and Standart, N. (2001). A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* **7**, 1728-1742.

Nakamura, A., Amikura, R., Hanyu, K. and Kobayashi, S. (2001). Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development* **128**, 3233-3242.

Nakamura, A., Sato, K. and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev. Cell* **6**, 69-78.

Narayanan, U., Achsel, T., Luhrmann, R. e Matera, G. (2004). Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell* **16**, 223-234.

Monani, U.R., Sendtner, M., Covert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossol, W., Prior, T.W., Morris, G.E. e Burghes, A.H. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* **12**, 333-339.

Olink-Coux, M. e Hollenbeck, P. J. (1996). Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J. Neurosci.* **16**, 1346-1358.

Paxinos, G. e Watson, C. (1994). The rat brain in stereotaxis coordinates. Sydney: Academic Press.

Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux., B. e Dreyfuss, G. (2001). The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol.* **11**, 1079-1088.

Pellizzoni, S., Yong, J. e Dreyfuss, G. (2002). Essential role for the SMN complex in the specificity snRNPs assembly. *Nature* **298**, 1775-1779.

Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. and Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* **21**, 533-542.

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-1576.

Pillai, R.S., Grimmmler, M., Meister, G., Will, C.L., Lührmann, R., Fischer, U. e Schümperli, D. (2003). Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes & Dev.* **17**, 2321-2333.

Piper, M. e Holt, C. (2004). RNA translation in axons. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **20**, 505-523.

Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **11**, 1640-1647.

Rollenhagen, C, e Pantè, N. (2006). Nuclear import of spliceosomal snRNPs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**, 367-76.

Rollenhagen, C., Muhlhauser, P., Kutay, U. e Pantè, N. (2003). Importin beta-depending nuclear import pathways: role of the adapter proteins in the docking and releasing steps. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2104-2115.

Rossoll, W., Kroning, A.K., Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Jablonka, S. e Sendtner, M. (2002). Specific interaction of SMN, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for SMN in RNA processing in motor axons? *Hum. Mol. Genet.* **11**, 93-105.

Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S. e Séraphin, B. (1999). Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* **18**, 3451-3462.

Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R. e Kastner, B. (2001). Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409**, 539-542.

Séraphin, B. (1995). Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.* **14**, 2089-2098.

Sheth, U. e Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.

Steward, O. e Schuman, E. M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40**, 347-359.

Steward, O. e Worley, P. F. (2001). A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7062-8.

Szebenyi, G., Smith, G.M., Li, P. e Brady, S.T. (2002). Overexpression of neurofilament H disrupts normal cell structure and function. *J. Neurosci. Res.* **68**, 185-198.

Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. e Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of stau6en in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463-475.

Tharun, S., He, W., Mayes, A. E., Lennertz, P., Beggs, J. D. and Parker, R. (2000). Yeast Smlike proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**, 515-518.

Tharun, S. e Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol.Cell* **8**,1075-1083.

Ule, J., Jensen, K. B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. e Darnell, R. B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-5.

Urlaub, H., Raker, V.A., Kostka, S. e Luhrmann, R. (2001). Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *EMBO J.* **20**, 187-196.

Van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* **21**, 6915-6924.

Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Lagerbauer, B. e Fischer, U. (2005). Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes & Dev.* **19**, 2320-2330.

Wirth, B., Brichta, L. e Hahnen, E. (2006). Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin. Pediatr. Neurol.* **13**, 121-131.

Yang, W. H., Yu, J. H., Gulick, T., Bloch, K. D. and Bloch, D. B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* **12**, 547-554.

Yu, J.H., Yang, W.H., Gulick, T., Bloch, K.D., e Bloch, D.B. (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**, 1795–1802.