



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XXI CICLO

**Il danno mitocondriale modula lo splicing alternativo in cellule neuronali:
implicazioni per la neurodegenerazione**

Alessia Maracchioni

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Dott. Tilmann Achsel

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

INDICE

RIASSUNTO

INTRODUZIONE

1. Le malattie neurodegenerative

- 1.1 Atrofia spino muscolare (SMA)
- 1.2 Basi genetiche della SMA
- 1.3 Influenza sul fenotipo SMA del numero di copie di *SMN2*.
- 1.4 Complesso di SMN
- 1.5 La funzione del complesso di SMN
- 1.6 Interazione del complesso di SMN con altre proteine
- 1.7 I corpi nucleari nelle malattie neurodegenerative comuni
- 1.8 Alzheimer
- 1.9 Parkinson
- 1.10 Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

2. Splicing

- 2.1 Catalisi
- 2.2. Assemblaggio dello spliceosoma
- 2.3 Selezione dei siti di splicing
- 2.4 Splicing alternativo
- 2.5 Meccanismo generale dello splicing alternativo

3. La famiglia delle proteine SR e loro ruolo nello splicing

- 3.1 Organizzazione strutturale
- 3.2 Funzioni
- 3.3 Regolazione tramite fosforilazione reversibile
- 3.4 Chinasi e fosfatasi che agiscono sulle proteine SR
- 3.5 Localizzazione sub-cellulare delle proteine SR in risposta al loro stato di fosforilazione
- 3.6 Segnali di regolazione della fosforilazione/de fosforilazione
- 3.7 Ciclo delle proteine SR fra citoplasma e nucleo

4. Altri fattori coinvolti nello splicing

- 4.1 La famiglia delle proteine hnRNP
- 4.2 PTB (Polypyrimidine tract binding protein)
- 4.3 La famiglia delle proteine CELF
- 4.4 Fattori tessuto specifici
- 4.5 Splicing alternativo e malattie neurodegenerative

SCOPO DELLA TESI

MATERIALI E METODI

Materiali

1. Enzimi
2. Soluzioni comunemente utilizzate
3. Composti chimici
4. Linee Cellulari
5. Anticorpi utilizzati

Metodi

1. RT-PCR
2. Misurazioni di ROS e ATP
3. Saggio colorimetrico Bradford
4. Western blotting
5. Estratti proteici citoplasmatici e nucleari
6. Cromatografia su colonna con biglie di DNAss
7. Precipitazione delle proteine SR
8. SDS-PAGE
9. Colorazione delle proteine su gel mediante Sypro Ruby

RISULTATI

1. Il Paraquat cambia lo splicing alternativo dei geni SMN ed Apaf1
2. Il cambiamento dello splicing alternativo riguarda diversi mRNAs
3. Cellule di origine neuronale sono più suscettibili allo stress cellulare causato dal paraquat
4. Via di trasduzione del segnale che regola lo splicing alternativo
 - 4.1 Il danno mitocondriale e la deplezione di ATP modulano lo splicing alternativo
 - 4.2 Il calcio è coinvolto nella via di trasduzione del segnale che modula lo splicing alternativo
5. Cambiamenti dei fattori di splicing
 - 5.1 Il cambiamento dello splicing non richiede sintesi di proteine ex novo
 - 5.2 Le proteine hnRNPs non sono coinvolte
 - 5.3 Le proteine SR sono down regolate

DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

Riassunto

Il danno mitocondriale è associato a molte malattie neurodegenerative, quali: Parkinson, Alzheimer e Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Queste malattie sono associate anche a cambiamenti di isoforme tramite splicing alternativo di alcuni geni. In questo lavoro dimostriamo che il danneggiamento mitocondriale modula lo splicing alternativo in maniera generale. Cellule di neuroblastoma umano sono state incubate con l'agente chimico paraquat (una neurotossina che danneggia i mitocondri e crea stress ossidativo) e analizzate mediante RT-PCR per il pattern di splicing di 13 geni. Tutti gli mRNAs soggetti a splicing alternativo mostrano un'incremento dell'isoforma più piccola in maniera dose e tempo dipendente. Al contrario degli esoni alternativi, gli esoni costitutivi non cambiano dopo induzione con il paraquat.

Dai dati ottenuti usando altre droghe, si evince che la modulazione dello splicing alternativo è correlata con il danno mitocondriale e la conseguente mancanza di ATP.

Linee cellulari non neuronali non mostrano gli stessi cambiamenti nello splicing, indicando una selettiva suscettibilità delle cellule neuronali.

Dato che una significativa percentuale di mRNAs di mammiferi è sottoposta a splicing alternativo, abbiamo ipotizzato che il danneggiamento mitocondriale causi uno squilibrio tra le varie isoforme dando un importante contributo alla neurodegenerazione.

Con lo scopo di identificare eventuali targets farmacologici, abbiamo cercato di capire quale sia la via di trasduzione del segnale che trasmette lo stress mitocondriale al macchinario dello splicing. Due classi di proteine determinano la selezione dei siti di splicing: la famiglia delle proteine SR e la famiglia delle proteine hnRNP; entrambe regolate dalla fosforilazione, che è importante per la loro attività. Le proteine hnRNP ed SR sono state purificate da cellule di neuroblastoma umano di controllo e trattate con paraquat e studiate mediante un approccio sub-proteomico. Mentre le proteine hnRNPs non mostrano cambiamenti, le proteine SR sembrano essere down regolate e defosforilate in seguito a trattamento con il paraquat.

Infine, utilizzando diversi inibitori che coinvolgono diversi pathway presenti nella cellula, abbiamo dimostrato che il calcio ha un ruolo nella via di trasduzione del segnale che stiamo osservando. I dati ottenuti non sono ancora conclusivi, ma sicuramente hanno dimostrato una correlazione fra la neurodegenerazione e lo splicing alternativo e hanno

posto le basi per capire il modo in cui lo splicing alternativo è modulato nei neuroni in risposta a stimoli esterni.

INTRODUZIONE

1. Le malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono disordini progressivi del sistema nervoso centrale caratterizzate da disfunzioni cognitive, motorie e/o comportamentali. Questa eterogeneità clinica è in gran parte attribuibile alla varietà patologica e al caratteristico pattern topografico del sistema nervoso centrale coinvolto, mostrato dall'entità di ciascuna particolare malattia, essendo determinata dalla selettiva perdita di funzionalità di popolazioni di cellule cerebrali. L'abnormale aggregazione proteica rappresenta l'unico punto in comune di queste malattie (C.A. Ross and M.A. Poirier, 2004). In molti casi questi aggregati proteici, depositi cellulari visibili al microscopio chiamati "corpi di inclusione" (inclusion body), sono localizzati nel compartimento citoplasmatico. In accordo a questo, lo studio di queste malattie è stato sempre focalizzato su aspetti di biochimica aberrante di proteine, che avviene in questa parte della cellula. La scoperta che l'aggregazione proteica entro il compartimento nucleare, rappresenta un importante caratteristica patologica nella malattia di Huntington (S.W. Davies *et al.*, 1997; M.W. Becher *et al.*, 1998), indica che il compartimento nucleare gioca un ruolo nella patogenesi di malattie neurodegenerative. Aberranti strutture e/o funzioni nucleari stanno emergendo come importanti mediatori patogenetici in un crescente numero di malattie neurodegenerative (J.M. Woulfe, 2007). Ad esempio, un aberrante trasporto nucleo-citoplasmatico di fattori di trascrizione risulta nel loro anormale accumulo citoplasmatico, il che è riconosciuto in diverse malattie neurodegenerative (C.T. Chu, 2007). Inoltre, in alcune malattie con coinvolgimento primario del nucleo, come l' "*RNA-mediated disease myotonic dystrophy*", i cambiamenti istomorfologici del sistema nervoso ricordano quelli descritte per alcune più comuni malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (N. Sergeant *et al.*, 2001). Questa capacità delle disfunzioni nucleari di indurre cambiamenti simili a quelli che si osservano nell'Alzheimer, fa pensare ad un coinvolgimento nucleare alla patofisiologia dell'Alzheimer e di altre malattie neurodegenerative ad incidenza sporadica. Il concetto di compartimentalizzazione strutturale e funzionale nel nucleo è ben conosciuto. Ad individuali compartimenti nucleari sono ascritte funzioni specifiche. Questi corpi nucleari includono i "Cajal body" (o "coiled body") e "gemini of coiled body" o "gems", entrambi coinvolti nel metabolismo delle piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs) e nel metabolismo e

sintesi dello spliceosoma (A.I. Lamond and J.E. Sleeman, 2003), “PML body” coinvolti in una varietà di funzioni intranucleari (K.L. Borden, 2003) e “splicing speckles” che rappresentano siti di accumulo di proteine coinvolte nello splicing del pre-mRNA (A.I. Lamond and D.L. Spector). Un importante corollario di questa compartimentalizzazione nucleare è che malattie associate con disfunzioni nucleari potrebbero manifestarsi morfologicamente come alterazioni nei corpi cellulari le cui funzioni sono distrutte dal processo della malattia.

In alcune malattie neurodegenerative, c'è evidenza che la riorganizzazione dei compartimenti nucleari potrebbero riflettere un primario evento intranucleare patogenetico. Comunque altre alterazioni nucleari, potrebbero rappresentare conseguenze generalizzate dei processi neurodegenerativi, tuttavia, potrebbero essere considerate importanti implicazioni patogenetiche e terapeutiche. Per esempio una varietà di condizioni di stress ambientali, sono state dimostrate risultare in alterazioni dei corpi nucleari. Esempi possono includere: mancanza di amminoacidi, alta temperatura, cambiamenti osmotici, esposizione ai metalli pesanti e senescenza cellulare (A. Zimber *et al.*, 2004). C'è una crescente evidenza per un coinvolgimento di foci nucleari contenenti elementi del meccanismo di danneggiamento/riparazione del DNA in diverse malattie neurodegenerative (S. Francesconi *et al.*, 2005). Questo potrebbe associare con alterazioni morfologiche nucleari. Topi mutanti nel gene *nnal*, che codifica per una proteina nucleare coinvolta nella differenziazione e rigenerazione neuronale, mostrano una selettiva degenerazione di specifiche popolazione neuronali (A. Harris *et al.*, 2000). In questi topi sono descritte formazioni anormali di foci di danneggiamento/riparazione del DNA, contenenti la forma fosforilata dell'istone H2AX, un sensore del danneggiamento del DNA, come anche la proteina ATM (*ataxia telangiesictasia mutated*) fosforilata, una protein chinasi che risponde al danneggiamento mitocondriale. Questo è associato con evidenze di *down*-regolazione trascrizionale con una riduzione nel numero dell'istone H4 acetilato e dei foci di RNA polimerasi II, la formazione di masse perinucleari di istone trimetilato, un aumento nel taglio e numero di masse di eterocromatina e segregazione dei nucleoli. Il fattore più importante in questo contesto è che i corpi nucleari, specificatamente i coiled bodies e i speckles di splicing sono distrutti. Sia la coilina che la proteina *survival motor neuron* (SMN) sono ridistribuite,

dalla tipica distribuzione nei coiled bodies presenti nel controllo, a strutture perinucleari. I fattori di splicing del pre-mRNA sono riorganizzati in irregolari speckles nucleari. Poiché questi cambiamenti sono osservati in cellule mancanti dell'evidenza morfologica della neuro degenerazione, sono considerate una manifestazione molto precoce della degenerazione.

1.1. 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.

1.2. Basi genetiche molecolari della SMA

Nel 1995 il gene *survival of motor neurons 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 che sono localizzate al 3' termine del gene [Figura 1]. 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. 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*, 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 2]. 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 (Cortegni et al., 2002). Di conseguenza, l'esone 7 non è riconosciuto dal macchinario di splicing, generando così un trascritto di splicing alternativo SMN2 Δ 7. È stato suggerito che la sostituzione della C con la T in *SMN2* crea un ESS per hnRNP A1, incrementando il salto dell'esone 7 (Kashima e Manley, 2003). Nella parte centrale dell'esone 7, una forte ESE ricca in purine è riconosciuta dal fattore di splicing SR-simile Htra2- β 1 e da ulteriori proteine di splicing (SRp30c, hnRNPs G e RBM), le quali facilitano l'inclusione dell'esone 7. Questa interazione tra ESE, Htra2- β 1 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 un'identica proteina di 294 aminoacidi con un codone di stop localizzato nell'esone 7. In contrasto, il trascritto *SMN2* Δ 7 produce una proteina troncata di *SMN* lunga 282 aminoacidi. Questa forma troncata è instabile ed ha una ridotta capacità di oligomerizzazione, essenziale per la corretta funzione di *SMN*.

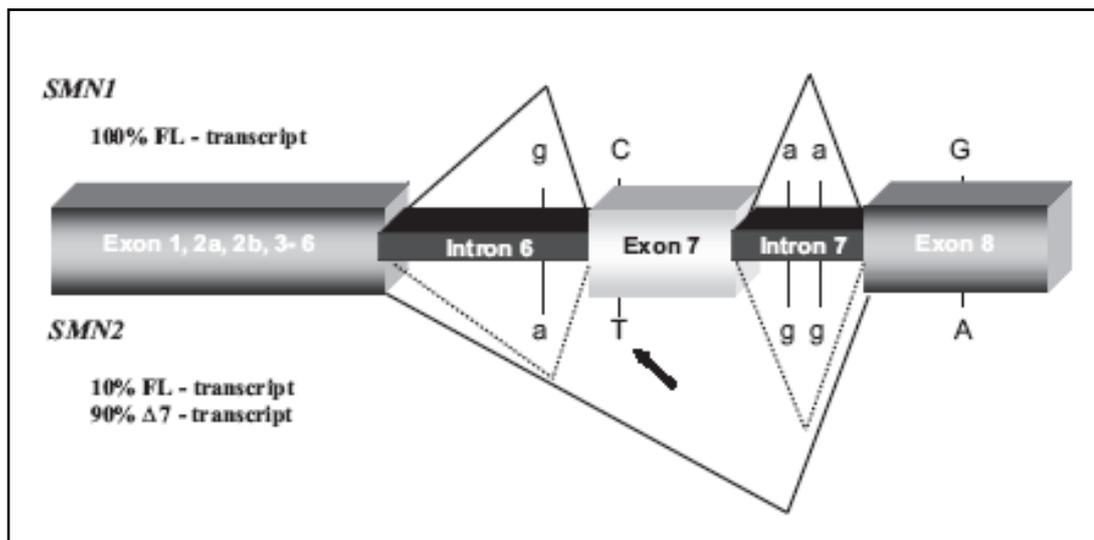


Figura 1. Struttura genomica, nucleotidica, e differenze di splicing tra *SMN1* e *SMN2*. Le copie dei geni *SMN* possono distinguersi per 5 differenti nucleotidi, dove solo la sostituzione della C a T si trova nella regione codificante. Questo nucleotide cambiato nell'esone 7 rappresenta una mutazione 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.

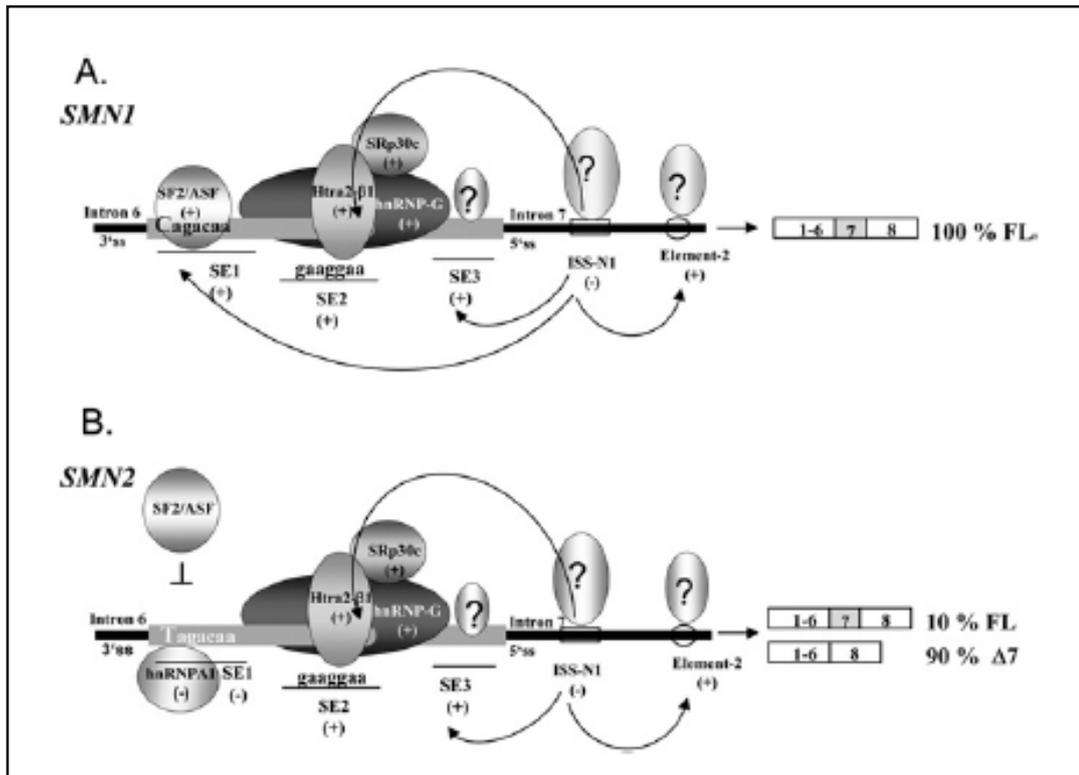


Figura 2. Regolazione dello splicing dell'esone 7 di SMN. L'esone 7 di *SMN1* contiene una sequenza eptamerica (SE1) al 5' termine riconosciuta da SF2/ASF. In *SMN2*, la sostituzione della C con la T interrompe la sequenza dentro SE1 impedendo il legame con SF2/ASF, determinando il salto dell'esone 7. 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.

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

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 3]. 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).

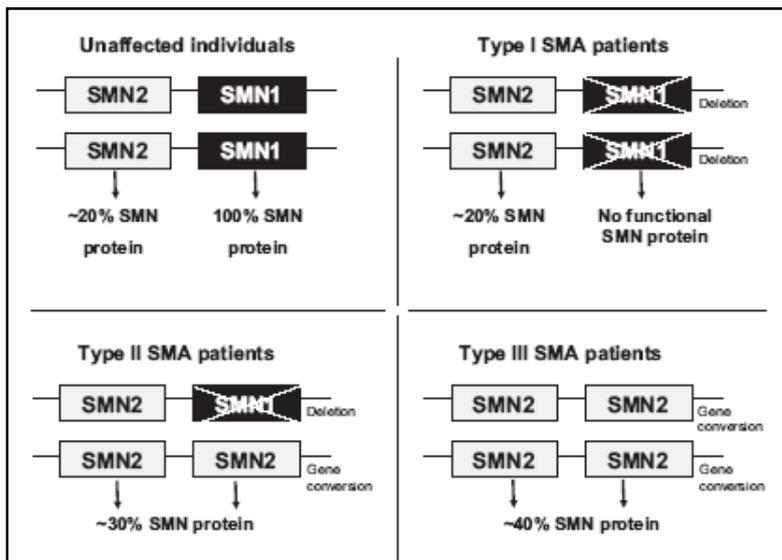


Figura 3. Genotipo di *SMN1* e *SMN2* generalmente trovato in individui affetti da SMA di tipo I-III. Notare che l'incremento del numero di copie di *SMN2*, prodotto una conversione genica, è correlato con un debole fenotipo SMA e una grande quantità di proteina trascritta intera.

1.4 Complesso di SMN

La proteina SMN è espressa in tutti gli eucarioti, eccetto *Saccoromices cerevisiae* e le piante, 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 DEAD-box), Gemin4, Gemin5/p175 (una proteina con ripetizioni WD), Gemin6 e Gemin7. Le Gemins co-localizzano con SMN nei 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 co-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 Gemins 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 (Gubitz et al., 2004) [figura 4].

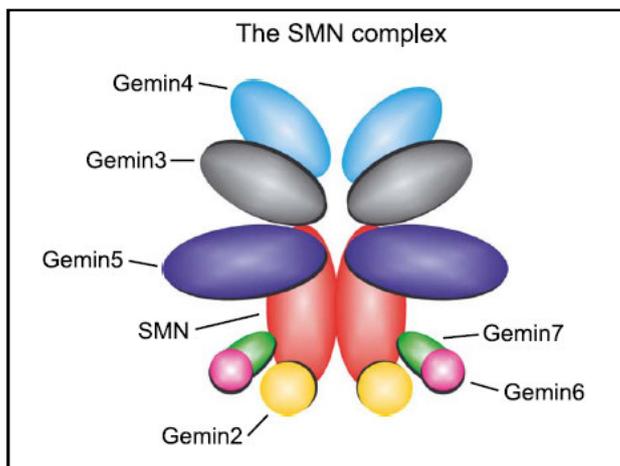


Figura 4. Il complesso di SMN. Rappresentazione schematica del complesso di SMN. Gemin2, 3, 5 e 7 legano direttamente SMN, mentre Gemin4 e Gemin6 sono associate attraverso interazioni con Gemin2 e 7, rispettivamente. Per semplicità, il complesso di SMN è illustrato come dimero sebbene è più probabile che abbia una struttura oligimerica.

1.5 La funzione del complesso di SMN

SMN è una proteina ubiquitaria con un peso molecolare di 38 KDa. SMN si associa con altre proteine a formare un grande complesso multiproteico. In questi complessi SMN interagisce con proteine come: Gemin2 (precedentemente conosciuta come SIP1 per “*SMN interacting protein*”), Gemin3 (una RNA elicasi precedentemente conosciuta come

dp103), Gemin da 4 a 7, la cui funzione rimane ancora sconosciuta, ribonucleoproteine nucleari, ribonucleoproteine nucleolari, proteine Sm (Liu Q. *et al.*, 1997; Friesen *et al.*, 2001; Brahm's *et al.*, 2001). Queste proteine sono caratterizzate dalla presenza di domini ricchi in arginina e glicina. Questi residui di arginina sono dimetilati simmetricamente il che promuove l'interazione di queste proteine con SMN. L'identificazione di proteine con funzione nota che interagiscono con SMN ha portato a concludere che SMN è coinvolta e facilita l'assemblaggio citoplasmatico delle snRNP nello spliceosoma. Nel nucleo, invece, SMN sembra essere direttamente coinvolta nello splicing del pre-mRNA (Pellizzoni L. *et al.*, 1998).

Lo spliceosoma contiene un set di sette proteine Sm che formano un complesso mediante legame con lo *stretch* di oligo U trovato negli snRNAs U1, U2, U4/U6 e U5, (vedere capitolo splicing).

Le proteine RNPs sono assemblate a partire da RNA e proteine in un processo che può essere controllato e/o facilitato a vari livelli. La sintesi ed il processamento dei componenti delle RNP devono essere eventi coordinati, in modo che tutti i componenti siano presenti in quantità sufficiente quando l'assemblaggio inizia.

Poiché l'RNA è normalmente trascritto nel nucleo e le proteine sono tradotte nel citoplasma, i processi di trasporto devono assicurare che tutti i componenti delle RNPs raggiungano il compartimento subcellulare dove avviene l'assemblaggio. A questo punto l'assemblaggio inizia (ossia il legame delle proteine all'RNA) e può essere soggetto a regolazione e/o assistenza.

Molti studi indicano che le Sm-RNPs potrebbero assemblarsi spontaneamente *in vitro* quando componenti purificati delle RNPs sono incubati in appropriate condizioni (Raker V.A. *et al.*, 1999). Ma questi studi non hanno permesso di chiarire il modo in cui RNPs sono generate *in vivo*.

Mediante studi sulla atrofia spino-muscolare è stato dimostrato che, al contrario di quanto succede *in vitro*, l'assemblaggio delle RNPs *in vivo* è un processo attivo mediato dalla proteina SMN e proteine associate. Analisi di sequenze mostrano che la proteina SMN contiene una sequenza conservata filogeneticamente chiamata "*Tudor domain*", che è stata trovata in altre proteine coinvolte nei processi metabolici dell'RNA (Ponting C.P. *et al.*, 1997).

Studi biochimici indicano che SMN forma un grande complesso di circa 1MDa (Meister G. *et al.*, 2000). Le proteine che si associano con SMN sono chiamate “Gemins” poiché colocalizzano con SMN nei Gems. Oltre alle Gemins uno specifico set di proteine interagisce in modo transiente o substechimetrico con il complesso di SMN. I fattori più caratterizzati che appartengono a questa categoria sono le proteine Sm e gli U snRNAs, il che illustra il legame funzionale fra il complesso di SMN e lo spliceosoma U snRNPs (Fisher U. *et al.*, 1997). Mediante studi *in vitro* si è dimostrato che le proteine Sm formano dei piccoli complessi che comprendono B/B'-D3, E-F-G e che legano in due step consecutivi le U snRNPs mediante dei siti di legame specifici per le Sm. Nel primo step E-G-F e D1-D2 si associano formando un complesso intermedio che è convertito nel “Sm core domain” con l'aggiunta di B/B'-D3 (Raker V.A. *et al.*, 1999) [Figura 5].

SMN sembra essere una proteina multifunzionale anche se le varie funzioni di SMN devono essere ancora chiarite. Rimangono ancora molte cose da chiarire riguardo alla funzione della proteina SMN, soprattutto capire perché l'abassamento della proteina SMN a 10% del normale può portare alla sola degradazione dei motoneuroni.

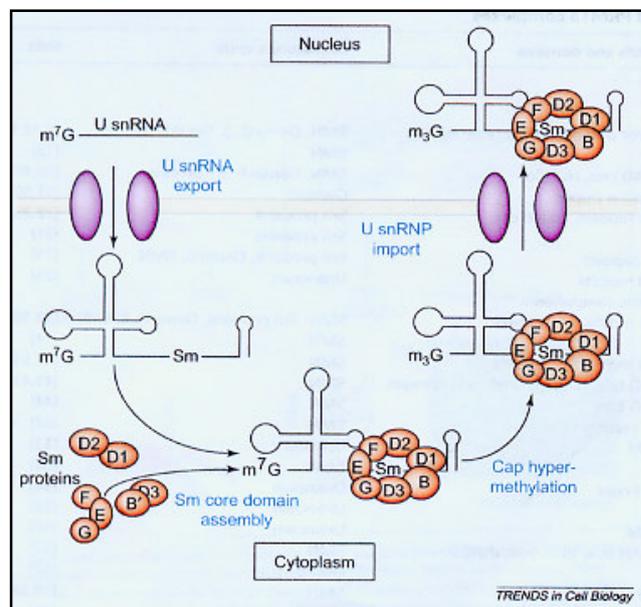


Figura 5 Biogenesi dell' Sm-RNPs (*in vitro*). Il m^7G -capped U snRNA codificato nel nucleo è trasportato al citoplasma. Le proteine Sm sono depositate in questo comparto e si assemblano con l' U snRNA per formare *Sm-core domain*. Il m^7G -capped dell'U snRNA è successivamente ipermetilato a m_3G cap. L' Sm-RNPs assemblato è allora trasportato nel nucleo dove esplica la sua funzione. Figura tratta da Meister et al, 2002.

1.6 Interazione del complesso di SMN con altre proteine

Un'ipotesi è che la proteina SMN potrebbe avere un secondo ruolo che è richiesto piuttosto nei neuroni. Per questo motivo si cercano interattori del complesso SMN. Oltre le proteine Sm, ne sono stati individuati vari.

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 delle Argonaute, e numerosi microRNAs. Così è possibile che delezioni di SMN o mutazioni 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.

Inoltre, altri 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 (heterogeneous nucleolar ribonucleoprotein) e hnRNP-Q (proteina che lega l'RNA glicina-arginina-tirosina-rich). 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 (Giesemann *et al.*, 1999).

1.7 I corpi nucleari nelle malattie neurodegenerative comuni.

Fino ad ora, alterazioni nelle strutture e funzioni nucleari sono state relativamente trascurate nei più comuni disordini neurodegenerativi quali: il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD) e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Invece, aggregati proteici citoplasmatici o extracellulari, rappresentano un importante fattore istopatologico in queste malattie. Nei rari casi familiari, le mutazioni coinvolgono geni codificanti le proteine che aggregano e questo attesta l'importanza di queste proteine nella patogenesi della malattia. Comunque la maggior parte dei casi sono sporadici con nessuna evidenza di mutazioni nei geni che codificano per le proteine che fanno parte di questi aggregati proteici. Il meccanismo patofisiologico che porta all'aggregazione proteica nelle forme sporadiche di queste malattie neurodegenerative è sconosciuto. Comunque ci sono sempre maggiori evidenze che i fattori di rischio di queste malattie potrebbero essere confinati nella membrana nucleare, coinvolgendo alterazioni a livello dell'espressione genica o dello splicing.

1.8 Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è un comune disordine neurodegenerativo progressivo di eziologia sconosciuta. La caratteristica istopatologica di questa malattia sono depositi extracellulari della proteina β -amiloide nella corteccia cerebrale e depositi intracellulari della proteina tau iperfosforilata in forma di grovigli di neurofibrille. Ci sono evidenze per un ruolo della proteina β -amiloide e della proteina tau nella patogenesi dell'Alzheimer. β -amiloide è generata da un sequenziale taglio proteolitico della proteina trans membrana di tipo I chiamata proteina precursore dell'amiloide (APP), codificata dal cromosoma 21. Recenti evidenze indicano un legame fra il processamento dell'APP e cambiamenti nell'espressione genica (X. Cao and T.C. Sudhof, 2004). Oltre a generare la proteina patogena β -amiloide, questo evento di taglio produce un frammento amminotermiale di

APP ed uno carbossi terminale, C γ . La proteina APP potrebbe portare segnali al nucleo via C γ , che è trasportata al nucleo in un complesso con la proteina adattatore Fe65 dove potrebbe regolare la trascrizione attraverso meccanismi ancora sconosciuti (X. Cao and T.C. Sudhof, 2001). Oltre a questo ruolo nella regolazione della trascrizione, C γ potrebbe avere altre funzioni nucleari. È stato dimostrato che la forma fosforilata di C γ è localizzata ai speckles di splicing nucleari (ma non ai Cajal body e ai gems) (Z. Muresan and V. Muresan, 2004). Questo suggerisce che a livello dei speckles di splicing C γ potrebbe avere un ruolo nel pre-mRNA splicing. Ci sono evidenze per una disfunzione trascrizionale e post-trascrizionale nell'Alzheimer. L'RNA totale cellulare e poliadenilato è ridotto nella corteccia di pazienti (N.K. Robakis, 2003). A livello post-trascrizionale, ci sono alterazioni nelle proteine che legano l'RNA (M. Mizukami *et al.*, 2005).

La proteina Tau, la principale costituente dei grovigli di neurofibrille, è anche implicata nella patogenesi dell'Alzheimer (R.B. Maccioni *et al.*, 2001). Tau è una proteina associata ai microtubuli che promuove la loro stabilità (D.G. Drubin and M.W. Kirschner, 1986). Nell'Alzheimer Tau diventa iperfosforilata e forma i grovigli di neurofibrille. Come la proteina tau iperfosforilata e/o i grovigli di microfibrille danneggino i neuroni rimane ancora incerto, ma potrebbero essere coinvolti meccanismi intranucleari. La forma normale di Tau ha la capacità di legare il DNA e potrebbe proteggere il DNA dalla denaturazione (Q. Hua and R.Q. He, 2003). Mentre nell'Alzheimer la formazione di neurofibrille dipende dalla iperfosforilazione di Tau, in altre tautopatie, la formazione di queste neurofibrille dipende da un aberrante pre-mRNA splicing dell'esone 10 di questa proteina (I. D'Souza and G.D. Schellenberg, 2000). La proteina glicogeno sintetasi chinasi 3 (GSK3) è un enzima chiave che regola il metabolismo di tau ed è implicata in entrambi i meccanismi (CA Grimes and R.S. Jope, 2001). GSK3 si accumula nel citoplasma dei neuroni che sviluppano le neurofibrille nell'Alzheimer ed in altre tautopatie (L. Ferrell *et al.*, 2002). Risulta interessante notare che l'inibizione dell'enzima GSK-3 in neuroni in coltura promuove l'esclusione dell'esone 10 nel processo di splicing del pre-mRNA di tau e comporta un arricchimento della proteina SC35 nei speckles di splicing nucleari dove colocalizza con GSK-3 (F. Hernandez *et al.*, 2004). Inoltre, nel nucleo, GSK-3 fosforila la proteina SC35. Quindi si potrebbe ipotizzare che anomalie nella funzione o localizzazione, a livello dei speckles di

splicing, dell'enzima GSK-3 potrebbero causare disfunzioni nel macchinario di splicing e di conseguenza avere un ruolo nella patogenesi delle tautopatie non associate a mutazioni nel gene tau e perfino nell'Alzheimer.

1.9 Parkinson

Il morbo di Parkinson è uno dei più comuni disordini neurodegenerativi ed è caratterizzato da una selettiva perdita dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*. La grande maggioranza dei casi è sporadica. I rari casi associati a mutazioni autosomiche dominanti o recessive, hanno provveduto a fornire indizi riguardanti la patogenesi delle forme sporadiche della malattia. Mutazioni associate al gene α -sinucleina causano il Parkinson, indicando un ruolo dell' α -sinucleina in questa malattia. Sia nelle forme sporadiche che familiari, l' α -sinucleina è la principale costituente dei corpi di Lewy, corpi di inclusione citoplasmatica, che rappresentano la caratteristica istopatologica della malattia. In neuroni normali l' α -sinucleina localizza al terminale assonico presinaptico e nel nucleo (L. Maroteaux *et al.*, 1988). La maggioranza degli studi hanno focalizzato l'attenzione sulla funzione dell' α -sinucleina al terminale assonico. Comunque la sua localizzazione nucleare è stata riportata in una serie di studi (J.Goers *et al.*, 2003; P.J. McLean *et al.*, 2000). Inoltre l' α -sinucleina forma inclusioni intranucleari sia in cellule neuronali che gliali in pazienti con disordini neurodegenerativi ed in topi che esprimono l' α -sinucleina umana (E. Masliah *et al.*, 2000). La sinucleina trasloca nel nucleo di topi trattati con la neurotossina paraquat, un erbicida in grado di indurre il morbo di Parkinson, e una volta nel nucleo può associare con gli istoni, indicando che una formazione anormale di complessi α -sinucleina-istone potrebbero avere rilevanza patologica nel Parkinson (J.Goers *et al.*, 2003). Inoltre è stato dimostrato che la traslocazione dell' α -sinucleina nel nucleo promuove la neurotossicità, perciò il sequestro di questa proteina nel citoplasma potrebbe avere un ruolo protettivo. Nonostante queste evidenze per un ruolo patogenetico intranucleare dell' α -sinuclein, la sua distribuzione nucleare è descritta come diffusa con nessuna referenza ad alcun particolare corpo nucleare. Inoltre, se i corpi nucleari sono riorganizzati o in altro modo alterati come conseguenza di una disfunzione nucleare dell' α -sinucleina rimane ancora da investigare.

1.10 Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

La sclerosi laterale amiotrofica è una malattia che colpisce selettivamente i neuroni motori corticali piramidali, detti motoneuroni centrali, e i neuroni motori delle corna anteriori del midollo spinale e dei nuclei dei nervi cranici, prevalentemente bulbari, detti motoneuroni periferici. È quindi una malattia che coinvolge specificatamente il controllo dei movimenti dei muscoli volontari. Si manifesta con diversi sintomi tipicamente dovuti a lesioni periferiche, che interessano in modo preferenziale gli arti superiori: paralisi flaccida, areflessia e atrofia muscolare (da qui il termine “amiotrofico”). Sebbene le precise vie molecolari che portano alla distruzione selettiva dei neuroni motori nella SLA rimangono ancora in gran parte sconosciute, la ricerca negli ultimi anni si è impegnata nel comprendere le possibili cause della patogenesi, progredendo su diverse linee di ricerca. Sono state proposte varie ipotesi sulla natura della SLA, sui meccanismi dell’insorgenza e del suo decorso, e l’idea del coinvolgimento di più determinanti [Fig.6], convergenti su uno stesso quadro clinico, è preferita all’ipotesi di un’unica causa comune. I modi con cui questi meccanismi interagiscono tra loro sono ancora oggetto di studio.

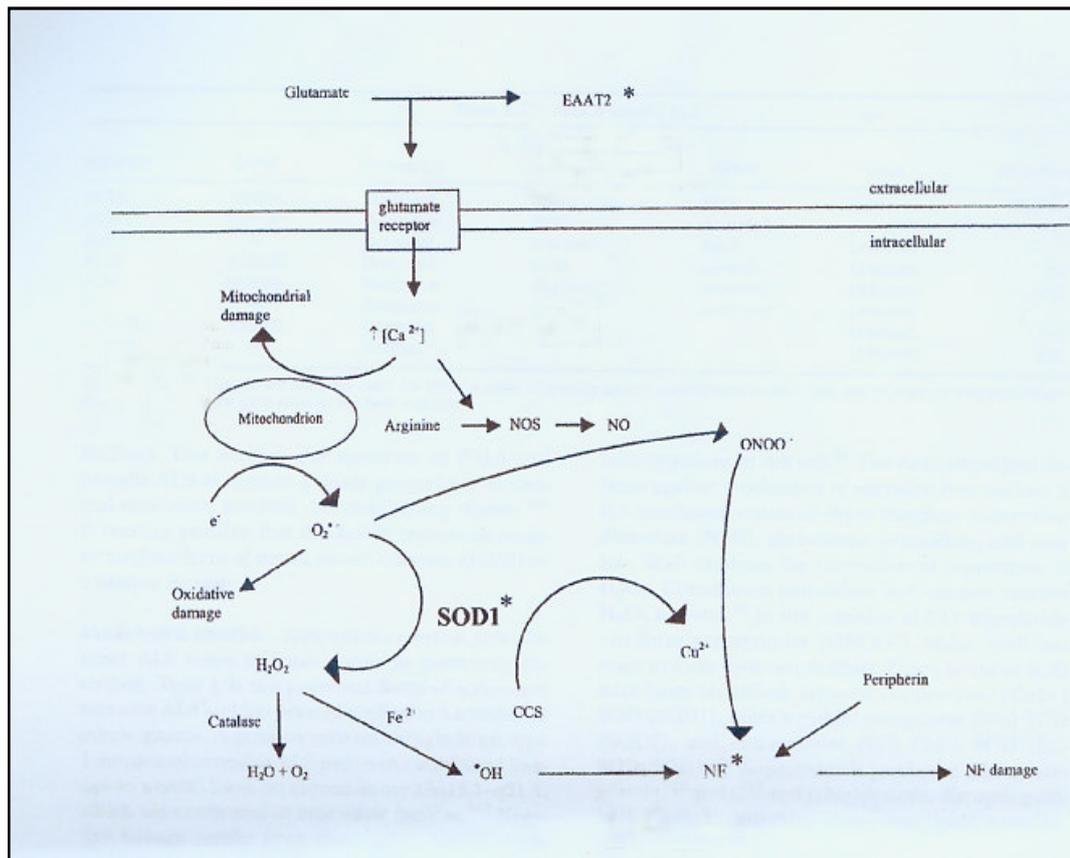


Figura 6. Meccanismi implicati nella degenerazione dei motoneuroni nella SLA. L'asterisco denota molecole mutate associate con la SLA. Il rilascio del glutammato dal terminale presinaptico attiva il recettore del glutammato posto sulla membrana cellulare del terminale postsinaptico. Il glutammato è eliminato dallo spazio sinaptico da uno specifico trasportatore: EAAT2. Alterazioni in questa proteina potrebbero interferire con la rimozione del glutammato che continua ad attivare i recettori. Una volta attivato, il recettore causa un influsso massiccio di Ca^{2+} che le cellule non hanno la capacità di tamponare efficacemente per mancanza di proteine che legano il Ca^{2+} (Ca^{2+} binding proteins, CPBs). Questo altera il metabolismo mitocondriale e comporta l'attivazione di alcuni enzimi come ad esempio l'ossido nitrico sintasi (NOS). I neuroni hanno un'alta richiesta energetica e per questo contengono molti mitocondri che generano durante il loro normale metabolismo $\text{O}_2^{\cdot-}$. La funzione della SOD1 è di inattivare l'anione superossido convertendolo in H_2O_2 , che a sua volta è convertito in O_2 dalla catalasi. Perciò mutazioni nel gene che codifica per la SOD1 potrebbero incrementare il danneggiamento ossidativo. L'ossido nitrico (NO) prodotto dall'enzima NOS reagisce spontaneamente con $\text{O}_2^{\cdot-}$ per generare perossinitrito, che nitrosila le proteine portando ad un loro danneggiamento. Le proteine target per la reazione di nitrato comprendono le subunità dei neurofilamenti, il che potrebbe portare ad un accumulo anormale dei neurofilamenti e alla distruzione del trasporto assonale. L'alto contenuto in neurofilamenti dei motoneuroni può aumentare l'effetto di questo danneggiamento. Tutti questi meccanismi potrebbero contribuire alla degenerazione dei motoneuroni osservata nell'ALS. Figura tratta da Collette *et al.*, 2001.

Circa l'85-90% dei casi di sclerosi laterale amiotrofica sono sporadici; solo nel 10-15% dei casi è stato possibile trovare una correlazione familiare; la versione familiare della malattia ha caratteristiche (sintomi, insorgenza, decorso, esito) indistinguibili da quella sporadica (Hirano *et al*, 1984, Siddique, 1991); si presuppone quindi una base patogenetica comune. Il cromosoma 21 sembra essere il più strettamente associato alla malattia. Il gene sinora conclusivamente associato con la forma familiare è infatti presente in un'unica copia nella regione q22 (Siddique, 1991), ed è mutato nel 15-20% dei casi di familiari, e nel 5% dei casi di sporadici (Cudkowics *et al*, 1997). Il gene in questione codifica per l'enzima superossido dismutasi a rame e zinco (SOD1), una proteina composta da 153 residui aminoacidici (Rosen *et al*, 1993; Deng *et al*, 1993). Questo enzima si è preservato durante l'evoluzione tanto da essere presente in forme omologhe in qualsiasi cellula vivente, compresi i batteri. Più di 90 mutazioni di questo enzima sono distribuiti su più di 40 differenti locazioni di importanza strategica per la stabilità dello scheletro della SOD1, e sono responsabili di sindromi distinte per penetranza, età di esordio, sopravvivenza e prime manifestazioni cliniche (distinte in spinali o bulbari) (Rowland, 1998). Nei soggetti normali, l'espressione di questa proteina è diffusa non solo in tutto il sistema nervoso, ma anche in tutti gli altri tessuti dell'organismo; nei casi di SLA familiare, si osservano come segni distintivi accumuli di SOD1 nei motoneuroni, in maniera particolarmente abbondante rispetto ai livelli misurati in altre strutture centrali (come le cellule piramidali corticali, le cellule dei gangli basali e le cellule ippocampali); da ciò si possono dedurre in parte i motivi della selettività con cui la malattia colpisce i neuroni motori (Pardo *et al*, 1995).

Per quel che riguarda lo studio di strutture nucleari e di corpi nucleari associati alla SLA, molto rimane ancora da chiarire. Di certo sembra che disfunzioni del macchinario di splicing siano coinvolte. Lo splicing alternativo può essere distrutto attraverso la produzione di stress a partire dalla modificazione di una primaria condizione dell'attività dei fattori di splicing o da effetti delle mutazioni degli elementi di splicing. Circa il 60-70% dei pazienti colpiti dalla forma sporadica della SLA hanno perdita di funzionalità del trasportatore astrocitario del glutammato EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) nella corteccia motoria e nel midollo spinale. La perdita di funzionalità di EAAT2 comporta un incremento extracellulare di glutammato e a degenerazione neuronale per

eccitossicità. Numerosi abnormali mRNAs di EAAT2 sono stati identificati in aree affette di pazienti SLA. Gli mRNAs aberranti sono abbondanti e trovati esclusivamente in aree affette di pazienti SLA ma non in altre regioni del cervello (Lin C.L. *et al.*, 1998). La periferina, una proteina facente parte dei filamenti intermedi, forma aggregati proteici intraneuronali ed è sovra espressa nei neuroni. Nel topo sono state identificate tre varianti di splicing: Per 58, che è codificata da tutti e 9 gli esoni del gene, Per 56 generato dall'uso di un sito accettore criptico presente all'inizio dell'esone 9 che risulta in un frame shift e un riposizionamento dei 21 amminoacidi presenti nel C-terminale di Per 58 con una unica sequenza di 8 amminoacidi, Per 61 che è generata da una ritenzione *in frame* dell'introne 4 portando all'inserzione di 32 amminoacidi entro un dominio della periferina cruciale per l'assemblaggio dei filamenti intermedi. Per 56 e Per 58 sembrano essere le isoforme normali nei motoneuroni dei topi *wild type*, mentre Per 61 non è presente. Per 61 è però espressa nei motoneuroni di mutanti SOD1, indicando che mutanti SOD1 inducono differenti splicing del pre-mRNA della periferina (Robertson *et al.*, 2003). Per 61 è tossica in colture primarie di motoneuroni, ed induce la formazione di aggregati di neuro filamenti. Lo splicing alternativo della periferina avviene anche nell'uomo.

2. Splicing

Come descritto sopra, in tutte le malattie neurodegenerative è presente un contributo nucleare. Mentre la trascrizione è ben studiata in questo contesto, lo splicing dei pre-mRNA è trascurato. Invece, lo splicing costituisce una parte importante non soltanto dell'espressione genica, ma anche della sua regolazione.

Il trascritto primario di un gene, chiamato anche pre-mRNA o RNA nucleare eterogeneo (hnRNA), prima di essere tradotto subisce delle modificazioni all'interno del nucleo. Il trascritto, infatti, viene fornito di un cap all'estremità 5', poliadenilato all'estremità 3' e privato degli introni.

In tutti gli eucarioti i geni sono interrotti da regioni non codificanti che sono rimosse dal trascritto primario. Il processo di rimozione degli introni è chiamato splicing dell'RNA.

Il meccanismo di base della rimozione degli introni è ben conosciuto (Staley and Guthrie, 1998).

Il confine esone-introne è definito dai siti di splicing presenti al 5' ed al 3' di ciascun introne, chiamati anche siti donatore ed accettore. Inoltre esiste un segnale interno, il sito di ramificazione (*branch point*), caratterizzato dalla presenza di un'adenina che è necessaria per la formazione della struttura a lazzo (*lariat*) che servirà al rilascio dell'introne. I siti di splicing 5', 3' ed il sito di ramificazione sono riconosciuti da un grande complesso costituito da più di cento proteine e cinque RNA (Splicesoma).

2.1 Catalisi

Le sequenze che definiscono il confine esone-introne nel pre-mRNA sono sequenze conservate in tutti gli eucarioti. Queste sequenze sono altamente conservate nel lievito e meno nei mammiferi.

Le sequenze necessarie per l'efficiente rimozione degli introni, negli eucarioti superiori, sono:

- Sito di splicing al 5': GU
- Sito di splicing al 3': AG
- Sito di ramificazione (a 18–40 nucleotidi di distanza dal 3' dell'introne) : YNYRRAY (la A è il sito di ramificazione, Y significa C o U, R significa A o G)
- Regione ricca in pirimidine: è situata tra il sito di ramificazione e il 3' dell'introne

Gli introni sono eliminati dal pre-mRNA in 2 tappe distinte [Figura 7]. La prima consiste in un attacco nucleofilo del gruppo 2' OH dell' adenosina situata nel sito di ramificazione, sul legame 3'-5' fosfodiesterico corrispondente alla giunzione di splicing al 5' dell' introne: la guanosina terminale si lega covalentemente all' adenosina del sito di ramificazione formando con essa un legame 2'-5' fosdiestere.

Gli intermedi di splicing che si formano sono: l'esone 1, formatosi in seguito al taglio nella sua estremità 3' e la molecola intermedia introne-esone 2, che presenta una configurazione a forma di lazzo (*lariat*).

La seconda reazione consiste nell'attacco del gruppo 3'-OH terminale dell'esone 1, precedentemente liberato, sul legame fosfodiesterico del sito di splicing al 3', risultando nella liberazione del *lariat* e nella contemporanea giunzione dell'esone1 all'esone2.

Entrambe le tappe di splicing consistono in reazioni di transesterificazione.

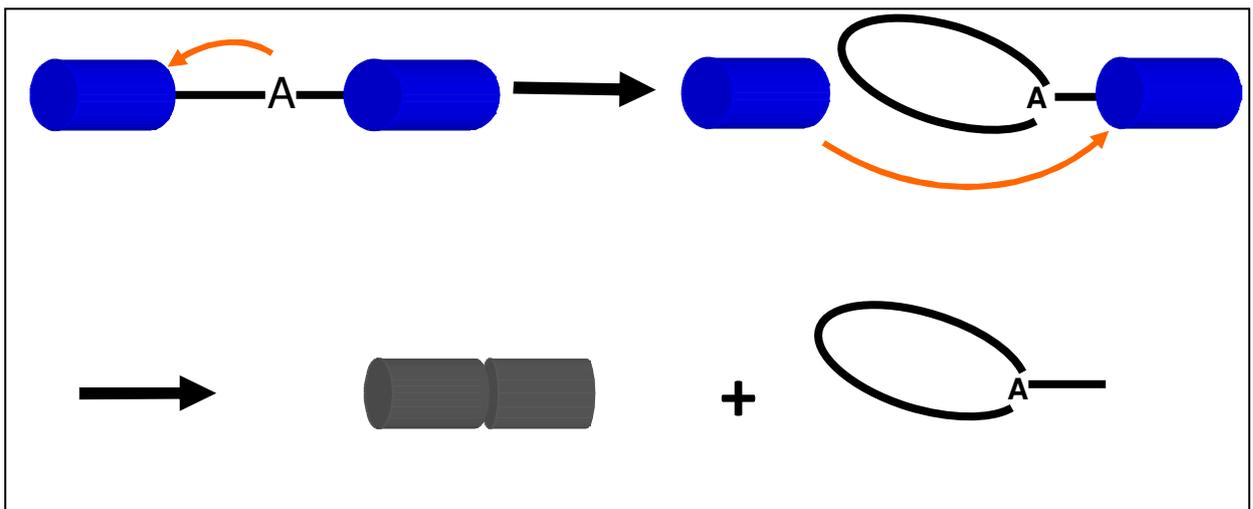


Figura 7 Lo splicing avviene in due fasi. Nella prima fase il 2' OH dell'adenosina del sito di ramificazione attacca il 3' OH dell'esone a monte, in questo modo l'esone di sinistra viene separato dalla molecola di destra che contiene esoni ed introni. La molecola di destra forma un cappio (*lariat*), in cui il terminale 5' generato all'estremità dell'introne viene unito con un legame 5'-2' alla A del sito di ramificazione. Nella seconda fase, un taglio nel sito di splicing 3' rilascia l'introne libero sotto forma di cappio, mentre l'esone di destra viene legato e saldato all'esone di sinistra.

2.2. Assemblaggio dello spliceosoma

Le reazioni catalitiche sono precedute dall' assemblaggio del pre-mRNA in una struttura competente per la reazione di splicing: lo spliceosoma.

I componenti di maggior importanza nella formazione del nucleo catalitico dello spliceosoma sono i piccoli RNA nucleari (snRNA) U1, U2, U4/U6 e U5 che, a loro volta, si trovano associati con diverse proteine per formare le U snRNPs.

Gli snRNAs U4 e U6 sono, per buona parte della loro lunghezza, appaiati tra loro ed impacchettati in un'unica particella; le altre snRNPs contengono una unica molecola di snRNA.

Tutte le snRNPs contengono sette proteine Sm che formano un complesso molto stabile con i snRNA U1, U2, U4 ed U5. Il complesso Sm-snRNA è cruciale per la maturazione e la localizzazione nucleare dei snRNP e dunque per lo splicing.

Oltre alle proteine Sm, tutte le snRNP dello spliceosoma contengono proteine specifiche, alcune delle quali hanno una importanza fondamentale nello splicing.

La prima fase specifica nell' assemblaggio dello spliceosoma è rappresentata dal legame della snRNP U1 al pre-mRNA, che non richiede ATP e coinvolge l'appaiamento delle basi dell' estremità 5' di U1 con le basi della sequenza conservata del sito di splicing al 5', questo complesso è chiamato complesso E.

Per la formazione del complesso E non è fondamentale il legame tra U1 ed il sito di splicing al 5' perchè avvenga l' interazione tra la snRNP contenete U1 e il pre-mRNA, ma la formazione del complesso E avviene in modo molto più efficiente in presenza di siti di splicing 5' e 3' intatti, in quanto c'è la possibilità di un appaiamento fra U1 ed il pre-mRNA.

Il complesso A di pre-splicing si forma in seguito al legame della snRNP U2 con il sito di ramificazione. Di nuovo, la specificità del legame dipende, in parte, da un appaiamento del snRNA con il pre-mRNA. Questa fase, come tutte le successive fasi della reazione di splicing, è ATP- dipendente.

L' assemblaggio del complesso A nelle cellule di mammifero richiede la presenza di un sito di splicing al 3' funzionale e la regione ricca in polipirimidine, mentre il sito di splicing al 5' non è fondamentale per questo processo. L' appaiamento di basi tra una regione interna dell' snRNA U2 e il sito di ramificazione risulta nella formazione di una

corta elica dalla quale viene estroflessa l' adenosina del punto di ramificazione. Si pensa che tale interazione serva per rendere accessibile l'adenosina come sito nucleofilo per la prima tappa della reazione di splicing.

Le snRNPs U4/U6 ed U5 interagiscono con il complesso A per generare il complesso di splicing B, che è successivamente convertito nel complesso C cataliticamente attivo. Nella conversione da B a C avvengono dei cambiamenti conformazionali, che sono più evidenti nelle interazioni fra gli snRNA (vedere sotto). Lo spliceosoma viene disassemblato al termine di ogni reazione splicing e riassembleto nuovamente per iniziare un nuovo ciclo catalitico. Il disassemblaggio dello spliceosoma rappresenta un processo attivo che richiede ATP ed almeno un cofattore proteico. Successivamente al rilascio delle snRNP, l'introne a forma di *lariat* viene linearizzato da uno specifico enzima deramificante, che agisce tagliando specificatamente il legame 2'-5' fosfodiesterico e viene degradato subito dopo da enzimi con attività esonucleasica.

Oltre agli appaiamenti tra gli snRNA U1 e U2 ed il pre-mRNA, durante l' assemblaggio dello spliceosoma e la successiva reazione di catalisi effettuata da quest' ultimo, si verificano anche altre interazioni fra le basi. U2 , già legato al sito di ramificazione, interagisce con U6 tramite appaiamenti multipli; gli stessi elementi di sequenza dello snRNA U6 sono coinvolti nell'appaiamento con U4 ed U2, l'interazione fra U4 e U6 è eliminata durante la maturazione dello spliceosoma. U6 ha una sequenza altamente conservata (ACAGAGA), di cruciale importanza per entrambe le fasi catalitiche. Questi nucleotidi della sequenza conservata di U6 sono particolarmente importanti perchè prendono contatto con la sequenza conservata del sito di splicing al 5' sostituendosi all' interazione che U1 aveva con questo sito. Queste interazioni possono giustapporre i siti reattivi del pre-mRNA per la prima e la seconda reazione del processo di splicing. Inoltre sia che U2 e U6 (come U5) sono localizzati in vicinanza, o all' interno, del *core* catalitico dello spliceosoma (Madhani and Guthrie, 1992).

Una serie di prove hanno avvalorato l'ipotesi di un ruolo diretto di U6 nella catalisi del meccanismo di splicing. In primo luogo, U6 è l' snRNA più conservato tra tutti gli snRNA di splicing sia nella sequenza primaria sia nella lunghezza. Inoltre, mutazioni nella sequenza conservata di U6 di nematode portano ad un aberrante attacco di U6 al sito di ramificazione invece che al sito di splicing al 5' (Yu *et al*, 1993).

Altre interazioni cruciali per la formazione dello spliceosoma e l'accurata selezione dei siti di splicing, sono le interazioni tra un'ansa conservata di U5 e sequenze esoniche situate a monte dei siti di splicing 5' e 3'. Da una parte, questa interazione potrebbe allineare i siti di splicing nel sito catalitico per la seconda fase della reazione, dall'altra parte, l'esone 1 deve essere inglobato all'interno dello spliceosoma dopo la prima reazione di taglio (Newman *et al*, 1995) .

Le interazioni degli snRNA U2, U5 e U6 con il pre-mRNA e fra di essi, sono gli elementi cruciali del nucleo catalitico dello spliceosoma. La snRNP U1 non sembra avere importanza fondamentale durante la catalisi, ma sembra di importanza cruciale per il riconoscimento iniziale del pre-mRNA e per indirizzare quest'ultimo verso il successivo processo di splicing. La sua interazione con il sito di splicing in 5' è sostituita dal legame di U6.

Come U1 anche U4 non è richiesto per il processo catalitico. Sembra piuttosto che U4 abbia un ruolo regolativo: appaiandosi a U6, U4 potrebbe sequestrare le sequenze che partecipano alla formazione del sito attivo.

Le interazioni in seguito ad appaiamento di basi all'interno dello spliceosoma, generano strutture comparabili ai domini conservati degli introni di gruppo II, avvalorando l'ipotesi che la catalisi dei pre-mRNA nucleari è mediata dall'RNA.

Data l'importanza delle interazioni RNA-RNA durante l'assemblaggio dello spliceosoma e la rimozione degli introni, sembra improbabile che le proteine essenziali per lo splicing partecipino direttamente nella catalisi della reazione, ma è più probabile che svolgano funzioni ausiliarie.

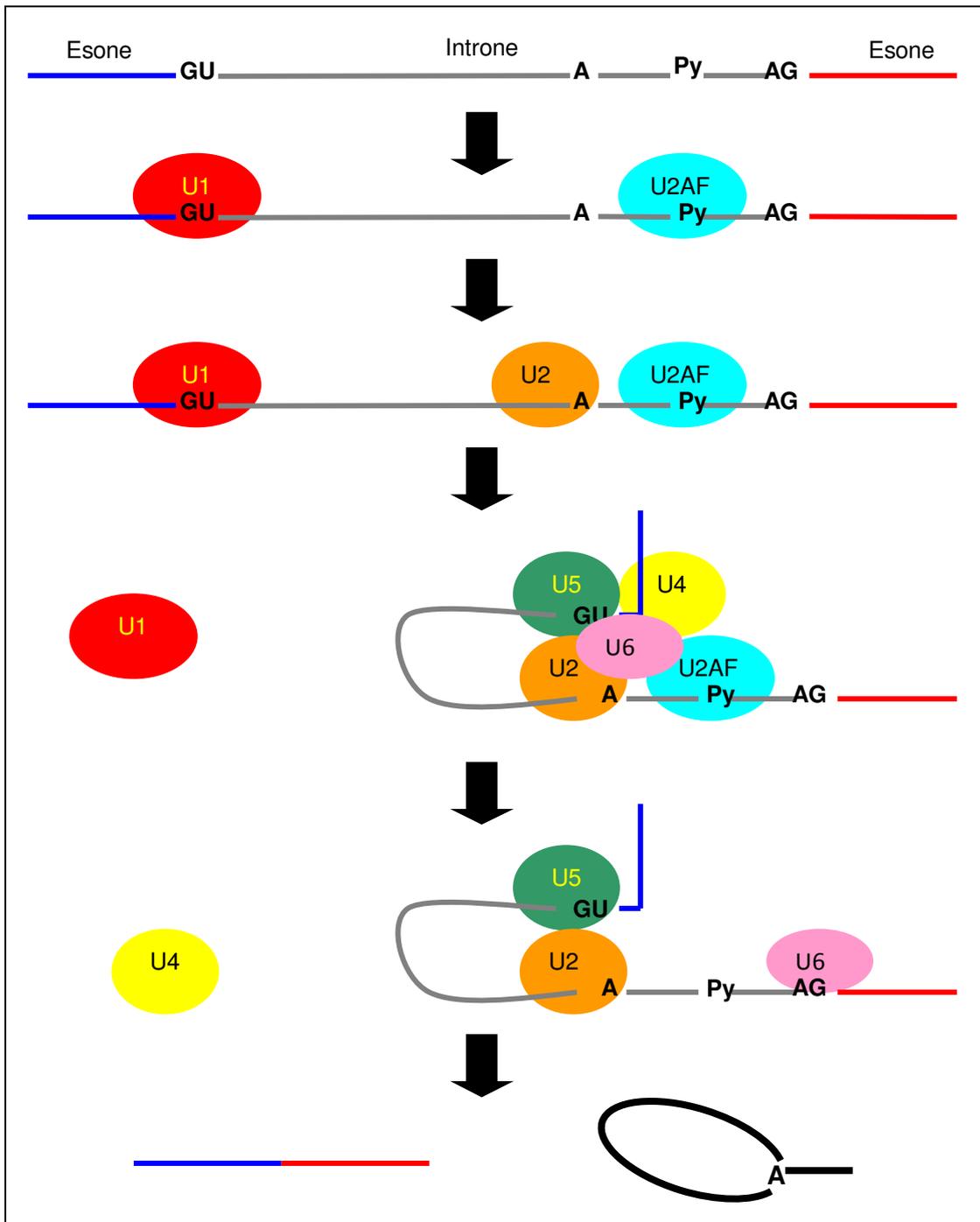


Figura 8 Rappresentazione schematica dell' assemblaggio dello spliceosoma. Il complesso E si forma in seguito al legame di U1 al sito di splicing 5' e di U2AF al tratto di polipirimidine. Il complesso A si forma in seguito al legame di U2 al sito di ramificazione. Nel complesso B U1 viene rilasciato e si lega il trimero U4/U6 U5. Nel complesso C U4 è rilasciato e avviene la catalisi con rilascio dell'introne a forma di *lariat* e gli esoni saldati fra loro.

2.3 Selezione dei siti di splicing

Nel lievito *S. Cerevisiae*, gli introni sono corti e sono facilmente riconosciuti mediante lunghi ed invarianti siti di riconoscimento: il sito di splicing 5' ed il sito di ramificazione. Perciò, l'appaiamento di basi di U1 e U2 con il pre-mRNA è completamente sufficiente per identificare, in modo non ambiguo, i siti di splicing. Negli eucarioti superiori, i siti di splicing sono degenerati e di conseguenza, la selezione dei siti di splicing diventa molto più complessa.

Il sistema più complicato è stato trovato nei mammiferi. Qui, gli introni sono grandi e interrotti solamente da brevi e sparsi esoni. La sequenza al 5' dell'esone (il sito di splicing 3') è il dinucleotide AG preceduto da una regione ricca in pirimidine (*polypirimidine stretch*). Il terminale 3' dell'esone (il sito di splicing 5') è marcato da il dinucleotide GU. Questi dinucleotidi sono trovati frequentemente in qualsiasi sequenza ed i pre-mRNAs sono, perciò pieni di siti di splicing criptici che non devono essere usati. Ovviamente, lo spliceosoma necessita di maggiori informazioni per identificare il sito di splicing autentico e corretto. Queste informazioni sono portate da elementi di sequenza *cis* agenti chiamate *enhancers* e *silencers* di splicing.

La scelta del corretto sito di splicing, nelle cellule di mammifero, si basa sul riconoscimento degli esoni fra i lunghi introni (*exon recognition model*). Questo è realizzato mediante un *network* di interazioni proteina-proteina cooperative, che permettono ai fattori di splicing positivi di riconoscere l'esone.

Tre elementi sono importanti per permettere il riconoscimento dell'esone:

- il sito di splicing 5' che è riconosciuto dal snRNA U1, come descritto sopra
- il tratto di polipirimidine che è riconosciuto dal fattore U2AF (*U 2 auxiliary factor*)
- *Enhancers* di splicing che sono tipicamente trovati lungo le regioni codificanti, le sequenze esoniche (*exonix splice enhancers, ESE*). Questi elementi sono riconosciuti dai membri della famiglia delle proteine SR.

Le proteine SR che legano le ESE costituiscono la parte più variabile del riconoscimento dell'esone e perciò la più importante nella regolazione della selezione dei siti di splicing. Le proteine SR saranno, perciò, discusse in dettaglio nel capitolo seguente sullo splicing alternativo. Brevemente, il dominio SR, che caratterizza questa famiglia di proteine,

permette interazioni proteina-proteina fra i vari membri di questa famiglia. Sia snRNP U1 (con la sua proteina di 70 KDa) che U2AF (con la sua subunità di 35 KDa) hanno subunità che contengono il dominio SR e perciò partecipano alle interazioni proteina-proteina con la famiglia delle proteine SR. Quindi, un completo set di interazioni proteina-proteina si estende lungo l'esone, dal sito di splicing 3' dell'introne a monte, (U2AF³⁵) all'ESEs (proteine SR), fino al sito di splicing 5' dell'esone a valle (U1 70K). Per evitare che il meccanismo di riconoscimento dell'esone avvenga a livello di siti di splicing criptici, la funzione delle proteine SR è antagonizzata da proteine che legano, generalmente, sequenze introniche ed in particolare *silencers* di splicing. Anche queste proteine contribuiscono ampiamente nel meccanismo di splicing alternativo, come discusso di seguito.

2.4 Splicing alternativo

Lo splicing alternativo del pre-mRNA rappresenta un importante meccanismo di regolazione dell'espressione genica in tutte le cellule degli eucarioti superiori.

Analisi genomiche hanno dimostrato che c'è una piccola differenza nel numero dei geni in differenti organismi, dal lievito all'uomo. La differenza nel numero dei geni da sola non potrebbe spiegare le differenze nella complessità funzionale e comportamentale tra invertebrati e vertebrati.

Una caratteristica significativa dell'espressione genica dei mammiferi è la presenza di trascritti multipli, generati a partire da un singolo gene, per splicing alternativo.

Lo splicing alternativo è in grado di aumentare in maniera notevole la capacità codificante di un singolo gene. Un esempio estremo è il gene *Dscam* di *Drosophila*, il suo pre-mRNA è soggetto a splicing alternativo e può potenzialmente generare 38016 isoforme diverse della proteina, più del doppio del numero di geni che costituiscono il genoma di *Drosophila* (Black, 2000).

Analisi genomiche indicano che più del 59% dei geni umani genera isoforme multiple per splicing alternativo (Lander *et al*, 2001). Questo meccanismo è usato per esprimere proteine tessuto o stadio specifiche, suggerendo che lo splicing alternativo è importante per generare diversità proteica e potrebbe spiegare, almeno in parte, come la complessità dei mammiferi sia presente anche con un numero di geni relativamente piccolo.

2.5 Meccanismo generale dello splicing alternativo

Lo splicing alternativo è il processo mediante il quale multipli mRNAs possono essere prodotti a partire dallo stesso pre-mRNA.

Lo splicing alternativo può avvenire per scelta differenziale di siti 5' e 3' alternativi, per rimozione di un esone (*exon skip*), per aggiunta di parte di un introne (*intron inclusion*).

Un dato gene può avere un singolo evento di splicing alternativo o può avere multipli eventi di splicing alternativo in diverse posizioni. Questi eventi possono avvenire indipendentemente gli uni dagli altri, o essere accoppiati in specifiche combinazioni. Ad esempio, due esoni alternativi potrebbero essere “*splicati*” alternativamente in modo tale che l'uno o l'altro sia incluso nel prodotto (*mutually exclusive exons*), oppure può essere scelto un singolo esone da una grande cassetta di esoni (*one-of-N*). In alcuni casi, lo schema definitivo di espressione è dettato dal trascritto primario perché l'uso di punti d'inizio differenti o di sequenze di teminazione diverse altera lo schema dello splicing.

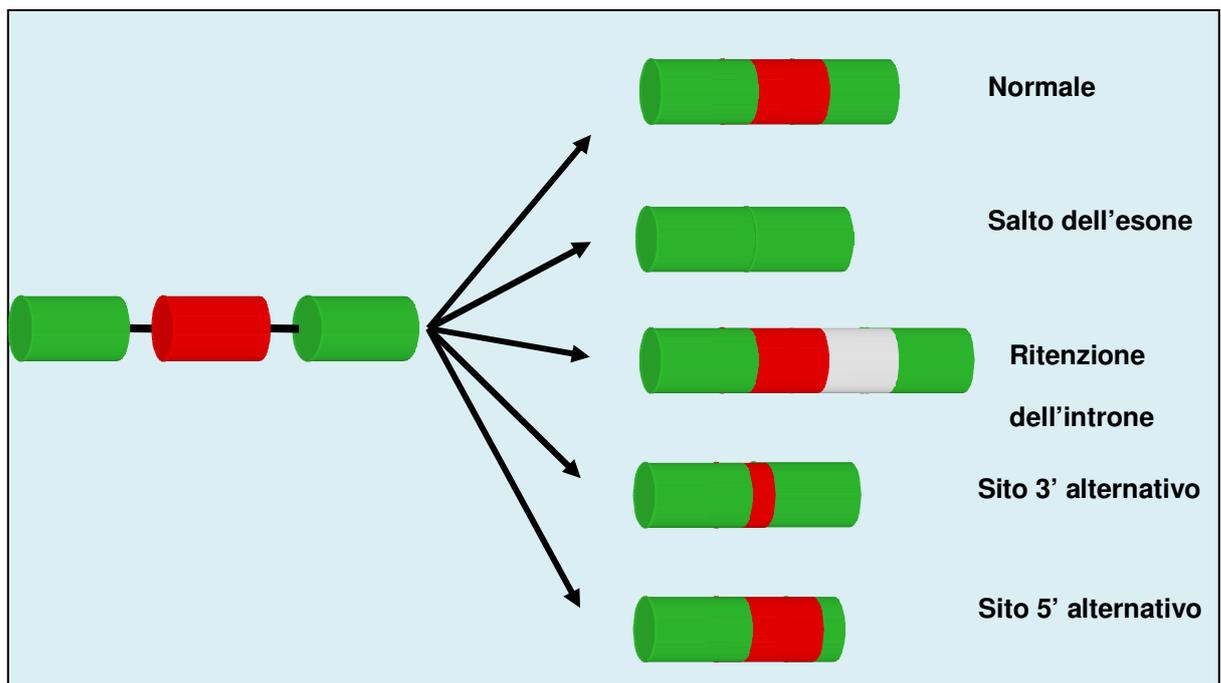


Figura 9 Rappresentazione schematica di alcuni possibili meccanismi di splicing alternativo.

I siti di splicing sono selezionati mediante l'interazione di fattori *trans* agenti con elementi di sequenza *cis* agenti. Il meccanismo della selezione dei siti di splicing nello splicing costitutivo ed in quello alternativo sono strettamente connessi. Comunque, gli esoni alternativi, hanno spesso un sito di splicing non ottimale rispetto agli esoni

costitutivi. Perciò, altri elementi *cis* agenti sono richiesti nella regione codificante di un gene, per portare il macchinario di splicing a riconoscere l' esone costitutivo e per modulare la selezione di siti di splicing alternativi (Cartegni *et al*, 2002). Sono stati descritti degli elementi *cis* agenti, che sono importanti per la corretta selezione dei siti di splicing e che sono distinti dai classici segnali di splicing. Questi elementi sono chiamati *enhancer* di splicing e possono essere presenti sia sugli esoni (ESEs) che sugli introni (ISEs) o come *silencers* di splicing, anche in questo caso presenti sia sugli esoni (ESSs) che sugli introni (ISSs). Gli *enhancer* e i *silencers* di splicing stimolano o reprimono, rispettivamente, la selezione dei siti di splicing.

La maggior parte degli *enhancer* sono ricchi in purine e sono localizzati negli esoni. Questi *enhancer* sono stati identificati in molti splicing sia costitutivi che alternativi. Alcuni *enhancer* sono ricchi in pirimidine e si trovano nell'introne in prossimità del sito di splicing al 5'.

I fattori *trans* agenti che hanno un ruolo chiave nella regolazione dello splicing alternativo fanno parte della famiglie delle proteine SR. Un'altra classe di proteine che contengono domini SR e che sono coinvolte nello splicing sono le proteine relazionate alle SR, che includono coattivatori di splicing quali SRm 160/300 e regolatori dello splicing alternativo quali Tra e Tra 2.

La maggior parte dei *silencers* di splicing si trovano sugli introni. Il loro meccanismo d'azione non è stato ancora del tutto chiarito. I *silencers* sembrano interagire con regolatori negativi, spesso appartenenti alla famiglia delle proteine hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*), come: la proteina hnRNP I (conosciuta anche come *polypyrimidine binding protein*, PTB), hnRNP A/B e hnRNP H (Cartegni *et al*, 2002).

3. La famiglia delle proteine SR e loro ruolo nello splicing

Le proteine SR rappresentano una famiglia di fattori di splicing estremamente conservati sia nei vertebrati che negli invertebrati. Sono i fattori di splicing non snRNP meglio caratterizzati (Fu, 1995).

Le proteine SR hanno una funzione essenziale nella selezione dei siti di splicing. Inoltre hanno un importante ruolo nell'assemblaggio dello spliceosoma e, come è apparso di

recente, in fasi successive dello splicing, di regolazione del ciclo vitale degli mRNAs (vedi capitolo successivo). La famiglia delle proteine SR (in senso stretto, escludendo U2AF e U1-70K) è costituita da circa 12 membri. Ciascuna proteina di questa famiglia ha uno o due domini di legame all'RNA del tipo RRM all'N-terminale e domini ricchi del dipeptide Serina/Arginina al C-terminale ("dominio SR"). Le proteine SR sono altamente fosforilate e il loro stato di fosforilazione influenza la loro attività e localizzazione.

3.1 Organizzazione strutturale

Il sequenziamento aminoacidico ed il clonaggio dei cDNA delle proteine SR hanno rivelato una organizzazione strutturale comune. L'estremità N-terminale delle SR consiste di una sequenza di riconoscimento per l'RNA (RRM) caratteristica di molte proteine leganti l'RNA come le snRNP e le hnRNP. La RRM è organizzata in 4 foglietti beta anti-paralleli e 2 alfa-eliche.

Attualmente, la famiglia delle proteine SR umane contiene 10 membri: SPp20, ASF/SF2 (SRP30a), SC35 (SRp30b), SRp30c, 9G8, SRp40, SRp46, SRp54, SRp55 and SRp75.

Fatta eccezione per SRp20, SC35 e 9G8, tutte le proteine SR contengono un secondo dominio che presenta una limitata ma significativa omologia con RRM (psi-RRM). RRM e psiRRM sono solitamente separate da una cerniera ricca in glicina.

L'estremità C-terminale delle proteine SR contiene un dominio ricco di residui di arginina (R) e di serine (S) (il dominio SR). La lunghezza variabile di questo dominio è una delle principali cause delle differenze di dimensioni osservate tra le proteine SR.

Il dominio SR è altamente fosforilato. Sequenze ricche in residui di arginina e di serina alternate sono state trovate anche in altre proteine coinvolte nello splicing, come la proteina di 70 KDa di U1, la proteina U2AF e le proteine di Drosophila tra, tra2 e SWAP che regolano gli eventi di splicing alternativi. Queste proteine differiscono nella loro organizzazione strutturale dalle proteine SR e sono state classificate come proteine relazionate alle SR.

3.2 Funzioni

Le proteine SR sono richieste sia per lo splicing costitutivo che per quello alternativo.

Vengono incorporate nello spliceosoma al momento dell'assemblaggio del complesso E e sono in grado di stimolare la formazione di quest'ultimo. Si pensa che le SR rafforzino il legame tra U1 snRNP al suo sito di splicing al 5' e, se presenti in elevata concentrazione, possono abrogare la necessità di U1 nello splicing, suggerendo ancora un ruolo iniziale nonché essenziale nell'assemblaggio dello spliceosoma e nella selezione del sito di splicing.

Le proteine SR possono reclutare la snRNP U2 al sito di ramificazione di un RNA substrato mancante di un sito di splicing al 5' e sono anche richieste per la transizione dal complesso A al complesso B, un passo che coinvolge l'incorporazione di U4\U6, U5 nello spliceosoma.

La proteina SR ASF/SF2 costituisce un complesso ternario stabile con U1 e il pre-mRNA, la cui formazione dipende dalla presenza di un sito di splicing al 5' funzionale. Il posizionamento di U1 al sito di splicing al 5' è, molto probabilmente, mediato da una interazione diretta tra le proteine SR (ASF/SF2 in particolare) legate al substrato di splicing, e la proteina di 70KDa di U1 snRNP.

Le interazioni tra ASF/SF2 e U1-70KDa possono avvenire in assenza del pre-mRNA e richiedono i domini SR di entrambe le proteine, mentre è necessario solo uno dei due domini RRM di ASF/SF2 per la formazione del complesso ternario con U1 e il pre-mRNA (Graveley, 2000).

Le proteine SR promuovono anche interazioni attraverso le sequenze esoniche. Infatti è stato dimostrato che il legame della snRNP U1 favorisce l'utilizzazione del sito di splicing 3' dell'introne a monte, favorendone l'interazione con U2AF. Complessi simili al complesso E si assemblano su *enhancer* o su substrati aventi solo un esone con un sito di splicing al 5' localizzato a valle. Le proteine SR sono presenti in questi complessi; esse si legano direttamente agli *enhancer* e sono essenziali per la funzionalità di questi ultimi. Questi risultati nel loro insieme, supportano un modello nel quale deboli interazioni tra U2AF e un sito di splicing al 3' subottimale vengono stabilizzate dalle interazioni con le proteine SR legate sugli *enhancer* dello splicing.

3.3 Regolazione tramite fosforilazione reversibile

L'attività delle SR può essere modulata tramite cicli di fosforilazione e defosforilazione.

Alcuni studi hanno mostrato che i residui di serina nel dominio SR possono essere ampiamente fosforilati da diverse chinasi. Questa fosforilazione sembra influenzare la localizzazione subcellulare delle proteine SR (Colwill *et al.*, 1996) ed è importante per permettere l'interazione con altre proteine (Xiao and Manley, 1998).

La fosforilazione reversibile può modulare l'attività delle proteine coinvolte nello splicing durante il corso della reazione, durante il ciclo cellulare, e probabilmente anche in maniera tessuto o stadio specifico.

E' molto probabile che la regolazione tramite chinasi e fosfatasi rappresenti un meccanismo generale per modulare l'attività dello splicing, come avviene in molti altri processi cellulari.

3.4 Chinasi e fosfatasi che agiscono sulle proteine SR

Il dipeptide Serina/Arginina presente al C-terminale delle proteine SR è un substrato ideale per essere fosforilato. Ed in effetti, molti fattori di splicing sono fosforilati in vivo, ma il ruolo di queste modificazioni non è chiaro. Lo stato di fosforilazione dei fattori di splicing risulta essere critico per almeno due eventi della reazione di splicing. In primo luogo, l'assemblaggio dello spliceosoma richiede fosforilazione, infatti esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che le proteine SR non vengono incorporate nello spliceosoma in presenza di fosfatasi. Inoltre quando le reazioni di splicing sono performati *in vitro* in presenza di inibitori delle fosfatasi, lo spliceosoma si assembla ma si arresta prima che avvenga lo step catalitico indicando che almeno un evento di defosforilazione è necessario per far progredire la reazione di splicing. Inoltre la fosforilazione può modulare l'interazioni delle proteine nello spliceosoma. In particolar modo la modulazione dello stato di fosforilazione di ASF/SF2, e presumibilmente di molti altri fattori di splicing, può modificare il *network* di legami durante la reazione di splicing, facilitando il dinamico riarrangiamento nel macchinario di splicing. Queste speculazioni potrebbero spiegare uno dei maggiori riarrangiamenti presenti nello spliceosoma. Le proteine SR promuovono l'assemblaggio di U1snRNP al sito di splicing al 5' mediante interazione con U1 70K per formare il complesso E. Al contrario nel complesso B1 l'interazione di U1snRNP con il sito al 5' è distrutto. Si può immaginare che inizialmente l'interazione di U1snRNP con il sito di splicing al 5' è facilitato dalla fosforilazione di

SF2/ASF, e che la sua defosforilazione, e probabilmente anche di altre proteine SR, nel complesso B1 tardivo contribuisce all'indebolimento dell'interazione di U1snRNP con il sito di splicing al 5'.

Sono state identificate diverse chinasi che fosforilano le proteine SR, inoltre diversi esperimenti con inibitori *in vitro* hanno dimostrato il coinvolgimento negli ultimi step dello splicing della fosfatasi 1 e 2A. Comunque nessuna di queste chinasi e fosfatasi è stata trovata associata stabilmente con lo spliceosoma. La fosforilazione dei fattori di splicing potrebbe avere un ruolo cruciale nello splicing costitutivo, ma anche giocare un ruolo nella selezione dei siti di splicing alternativo. Visto che la fosforilazione può modulare l'interazione proteina-proteina, queste modificazioni potrebbero anche risultare in interazioni alterate fra i fattori di splicing e di conseguenza uno *switch* nella selezione dei siti di splicing. Inoltre la selezione dei siti di splicing potrebbe essere regolata anche dalla localizzazione subcellulare e subnucleare di questi fattori.

Ci sono diverse chinasi che agiscono sulle proteine SR.

La proteina SR protein chinasi SRPK è stata inizialmente purificata biochimicamente (Gui, J.F. *et al.*, 1994). SRPK1 lega ad un non fosforilato GST-ASF/SF2 in estratti HeLa, per cui la parte N-terminale del dominio SR è richiesta. SRPK è altamente processiva, lega ASF/SF2 finchè tutte le serine che sono substrato di SRPK sono fosforilate (Aubol, B.E. *et al.*, 2003).

La chinasi Clk/Sty (cdc-like Kinase) ha una doppia specificità può fosforilare non solo le serine/treonine ma anche le tirosine, da qui il nome S-T-Y (Colwill, K. *et al.*, 1996). Nei mammiferi ci sono tre chinasi che fanno parte della famiglia delle Clk/Sty. Clk/Sty ha un substrato meno specifico rispetto ad SRPK1: fosforila non solo SC35, ASF/SF2, Srp55 o U2AF, ma anche l'istone H1 ed MBP (Colwill, K. *et al.*, 1996). Anche la chinasi Clk/Sty contiene un dominio SR al suo N-terminale e si autofosforila ai residui di tirosina e serina/treonina. L'autofosforilazione regola la sua attività su ASF/SF2 e, in maniera diversa, anche su SC35, mentre l'attività su Srp40 rimane intatta (Prasad, J. and Manley, J.L., 2003). In mutanti in cui tutti gli RS dipeptidi sono cambiati, lasciando solo 4 serine nel dominio SR inalterato, la chinasi SRPK fosforila solo mutanti RG ed RT, e solo un po'. Clk/Sty, invece, è molto meno stringente e fosforila soprattutto la versione KS dei mutant (Colwill, K. *et al.*, 1996). La fosforilazione delle protein SR è, spesso, indicata

come altamente dinamica, il che indica che è ovviamente reversibile. Nonostante ciò, ancora si sa molto poco sulle fosfatasi che agiscono sulle proteine SR. La fosfatasi PP1 chiaramente defosforila le proteine SR: l'aggiunta della fosfatasi PP1 ricombinante agli estratti nucleari li disattiva, e possono essere ripristinati dall'aggiunta di proteine SR purificate biochimicamente; la stessa cosa è osservata quando la PP1 ricombinante è aggiunta a nuclei permeabilizzati (Mermoud, J.E. *et al.*, 1994; Misteli, T. and Spector, D.L., 1996). Ulteriori studi sulle proteine SR e la fosfatasi PP1 non sono stati effettuati. Un altro candidato è la fosfatasi PP2C γ , poichè è un essenziale fattore di splicing (Murray, M.V., 1999), ma i suoi substrati ancora non si conoscono.

3.5 Localizzazione sub-cellulare delle proteine SR in risposta al loro stato di fosforilazione

Le proteine SR devono essere fosforilate per svolgere la loro funzione nello splicing. Ne segue che mutanti “costitutivamente fosforilati” con ripetizioni RD o RE invece di ripetizioni (fosfo)SR supportano lo splicing anche se meno bene delle proteine *wild type* (Cazalla, D., 2002). La fosforilazione modula l'interazione delle proteine SR fra di loro e con l'RNA, il che spiega, almeno in parte, il perché è necessaria per la funzione delle proteine SR nella selezione dei splicing. Risulta interessante notare che le proteine SR nel loro stato fosforilato, interagiscono con l'RNA a doppio filamento a livello dei siti di splicing e promuovono l'appaiamenti di basi RNA-RNA (Shen, H. and Green, M.R., 2006), il che potrebbe spiegare il loro sequestro durante l'assemblaggio dello spliceosoma: durante i vari stadi dell'assemblaggio dello spliceosoma diverse appaiamenti di coppie di basi sono formate fra il pre-mRNA e gli snRNA di U1, U2 ed U6. Un dominio SR fosforilato, tuttavia, non è sempre necessario, anzi una eccessiva fosforilazione può inibire lo splicing. Infatti, ASF/SF2 senza il suo dominio SR supporta lo splicing *in vitro* di almeno alcuni pre-mRNA (Zhu, J. and Krainer A.R., 2000). In saggi di splicing *in vitro*, sia l' ipofosforilazione che l' iperfosforilazione (dalla chinasi *clk/sty*), inibiscono l'attività delle proteine SR (Prasad, J. *et al.*, 1999). Almeno in un caso, l'iperfosforilazione delle proteine SR, dovuta all'over espressione di *clk1*, *clk2*, *clk3*, SRPK1 o SRPK2, diminuiscono l'inclusione dell'esone, un effetto generalmente osservato in seguito ad una bassa concentrazione delle proteine SR (Blaustein, M. *et al.*,

2000). Oltre all'attività sullo splicing, la fosforilazione delle proteine SR modula anche la loro localizzazione sub-cellulare. Alcune proteine SR si spostano (*shuttle*) fra citoplasma e nucleo - SRp20, ASF/SF2, 9G8 (Cáceres, J.F. *et al.*, 1998), ovviamente anche tra2- β 1 (Daoud, R. *et al.*, 2002) – mentre altre rimangono confinate nel nucleo: SC35, SRp40 (Cáceres, J.F. *et al.*, 1998). Il segnale di *shuttling* di ASF/SF2 è parte del suo dominio SR, mentre il dominio SR di SC35 contiene un segnale di ritenzione nucleare (Cazalla, D. *et al.*, 2002). Nel nucleo le proteine SR si accumulano negli “speckles di splicing” che rappresentano al microscopio elettronico clusters di granuli di eterocromatina (IGCs), punteggiature elettroniche dense interposte fra domini di cromatina – gli speckles non sono siti di trascrizione o di splicing, ma hanno il ruolo di deposito di particelle (Misteli, T. *et al.*, 1997). SRPK1 e 2 sono principalmente citoplasmatiche (Ding, J.H. *et al.*, 2006). Il dominio chinasi delle SRPKs può agire come un segnale di localizzazione nucleare, ma entrambe le SRPK contengono un motivo di ritenzione citoplasmatica (Ding, J.H. *et al.*, 2006). L'overespressione di SRPK1 o di SRPK2 o mutanti cataliticamente inattivi delle stesse, confinano l'ASF/SF2 endogeno e taggato con *myc* al citoplasma (Koizumi, J., *et al.*, 1999), risultati simili si osservano overesprimendo la *clk/sty* (Cáceres, J.F. *et al.*, 1998). E', perciò concepibile che SRPK è necessaria per l'importo di ASF/SF2 nel nucleo. *Clk/sty*, invece, è nucleare (Colwill, K. *et al.*, 1996; Prasad, J. and Manley, J.L., 2003).

Clk/sty va a livello dei speckles nucleari e induce aumento di concentrazione delle proteine SR nei stessi speckles. Questo è ampiamente confermato per SC35 ma non per il fattore di splicing non SR U2-B che è anche arricchito negli speckles nucleari (Sacco-Bubulya, P. and Spector, D.L., 2002) . Al contrario, ASF/SF2 è rilasciato dalla *clk/sty* dagli speckles nucleari attraverso fosforilazione di parte del C-terminale del suo dominio SR (Ngo, J.C. *et al.*, 2005) e lo stesso è osservato per SC35 e U2-B, dopo overespressione di *clk/sty* (Sacco-Bubulya, P. and Spector, D.L. 2002). Infine PP1 modula la distribuzione delle proteine SR nei nuclei di cellule permeabilizzate che sono state incubate con estratti nucleari (Misteli, T. and Spector, D.L. 1996). Questo potrebbe essere interpretato con l'osservazione che la proteina PP1 è richiesta per il ritorno delle proteine SR dal sito di splicing agli speckles. In conclusione le proteine SR ipofosforilate sono accumulate negli speckles, mentre l'iperfosforilazione le rilascia nel citoplasma. E'

interessante notare che la dissoluzione degli speckles di splicing indotta dalla chinasi clk/sty blocca lo splicing *in vivo*, mentre la trascrizione va avanti (Sacco-Bubulya, P. and Spector, D.L., 2002), indicando che le proteine SR iperfosforilate presenti nel nucleoplasma solubile non necessariamente supportano lo splicing.

3.6 Segnali di regolazione della fosforilazione/defosforilazione

La chinasi SRPK1 entra nel nucleo nella fase G₂ tardiva (Ding, J.H.*et al.*, 2006). Immediatamente successiva è la defosforilazione di Srp38 e lo splicing è represso in maniera generale in cellule mitotiche (Shin, C. and Manley, J.L., 2002) – non è chiaro se c'è un legame fra i due fatti. Non esistono ulteriori indicazioni che le chinasi SRPK e clk/sty possano essere regolate nella loro attività. Invece, altri enzimi sembrano regolare la fosforilazione/defosforilazione delle proteine SR in risposta a segnali cellulari:

- L'enzima glicogeno sintetasi chinasi 3, GSK-3, interagisce con diverse molecole coinvolte nell'eziologia dell'Alzheimer. L'inibizione di GSK-3 in neuroni in coltura aumenta l'inclusione dell'esone 10 dell'mRNA di tau. GSK-3 ricombinante fosforila SC35 ma solo se il suo dominio SR è pefosforilato. L'inibizione di GSK-3 porta ad un incremento di SC35 nei speckles (Hernández, F. *et al.*, 2004).
- L'insulina o ras → pathway della chinasi P13 attiva akt/PK-B e promuove l'inclusione intronica in almeno due casi, chiamati PKCβII mRNA (Patel, N.A. *et al.*, 2005) ed EDA mRNA (Blaustein, M. *et al.*, 2005). L'overespressione di Akt costitutivamente attiva ha lo stesso effetto della stimolazione del *pathway*, e Akt isolate fosforila diverse proteine SR ma non ASF/SF2 ΔSR – notare che Srp40, ma non la fosforilazione di ASF/SF2 risponde a stimoli di insulina. In fibroblasti Akt2^(-/-), l'inclusione dell'esone PKCβII è bassa e non incrementa dopo stimolazione con insulina.
- La ceramide, un importante regolatore in varie risposte allo stress, inclusi TNFα, Interferone, IL-1, calore, o luce UV, attivano diverse fosfatasi non identificate, che inibiscono, fra le altre, anche la chinasi AKT/PK-B (Chalfant, C.E.*et al.*, 2001). Una fosfatasi attivata dalla ceramide è la PP1, che si sa che defosforila le protein SR (Chalfant, C.E. *et al.*, 1999).

- Particolarmente importante per la neurodegenerazione, un rilascio di Ca^{2+} nel citoplasma provocato dalla *thapsigargin*, un inibitore della pompa del Ca^{2+} del reticolo endoplasmatico, e/o una diminuzione nell'ATP cellulare, causano una rilocalizzazione di tra2- β 1 nel citoplasma, non al 100% ma abbastanza pronunciata. Simultaneamente alcune proteine che mostrano immunoreattività all'anticorpo mAb104 (un anticorpo che riconosce il dominio SR fosforilato) e la protein Sam68 vanno, anche loro, nel citoplasma. Questo è accompagnato da una migrazione apparentemente più lenta della banda di tra2- β 1 iperfosforilata (Daoud R., *et al.*, 2002). Le chinasi/fosfatasi coinvolte in questo processo non sono state ancora identificate.

3.7 Ciclo delle proteine SR fra citoplasma e nucleo

Mentre il genoma del lievito non codifica neanche una proteina con un singolo dominio SR, sembra generalmente accettato che l'equivalente nel lievito di una proteina SR è Np13p. Np13p è fosforilata nel citoplasma dalla chinasi connessa con la SRPK Sky1p. Solo uno degli otto RS/SR dipeptidi presenti sulla proteina sono fosforilati (Gilbert, W. *et al.*, 2001). La forma iperfosforilata di Np13p associa fortemente con gli mRNAs poly(A)⁺ e si accumula nel citoplasma (Gilbert, W.*et al.*, 2004), mentre la fosforilazione incrementa la sua affinità per il recettore di importo nucleare Mtr 10p (Yun, C.Y. and Fu, X.D. 2000). Nel nucleo la fosfatasi Glc10p defosforila Np13p, il che consente alla fine il suo esporto nel citoplasma (Gilbert, W. and Guthrie, C.). Perciò cicli di fosforilazione/defosforilazione guidano Np13p dal nucleo al citoplasma e viceversa, e questo *shuttling* è cruciale per l'esporto nucleare degli mRNAs. Nei mammiferi, l'esporto nucleare è accoppiato allo splicing del pre-mRNA, ma le basi molecolari di questo accoppiamento rimangono sconosciute. Recentemente, il complesso di giunzione esonica (exon-junction complex EJC) che è depositato dallo spliceosoma 17 nucleotidi a monte di una giunzione esone-esone, è stata annunciata come la soluzione poichè EJC associa con i fattori di esporto dell'mRNA. Il fatto che diversi componenti dell'EJC, chiamati RNPS1, non sono essenziali per l'espressione genica nel nematode *C.Elegans* (MacMorris M. *et al.*, 2003; Longman D. *et al.*, 2003) e nemmeno in *Drosophila*

(Gatfield D. and Izaurralde E., 2002) pone un grande dubbio sull'essenzialità dell'EJC nell'esporto dell'mRNA.

Ci sono comunque chiare evidenze che lo *shuttling* delle proteine SR guidato dal loro stato di fosforilazione/defosforilazione guida l'esporto dell'mRNA fuori dal nucleo, in maniera simile a come Np13p fa in lievito.

Le proteine SR necessitano di essere fosforilate per entrare nello spliceosoma. Invece sembra che vengano defosforilate per permettere alla reazione dello splicing di procedere: la proteina fosfatasi PP1 è richiesta al termine del completo assemblaggio dello spliceosoma, ma prima dello step iniziale della reazione di splicing; PP1 defosforila le proteine SR (Mermoud, J.E *et al.*, 1994; Yun C.Y. and Fu X.D. 2000). Inoltre la tiosforilazione, che precede la defosforilazione, sia di U1-70K (Tazi, J. *et al.*, 1993) che di ASF/SF2 (Cao W., 1997) blocca la reazione di splicing. A favore di quanto detto ci sono esperimenti di splicing in vitro con 9G8 marcato con ³⁵S che guida alla defosforilazione delle proteine (Huang Y. *et al.*, 2004). Lo *shuttling* delle proteine SR rimane associato con gli mRNAs: le hnRNPs che contengono principalmente mRNAs splicati contengono anche ASF/SF2 e 9G8 entrambi presenti nella loro forma iperfosforilata. Inoltre solo la forma iperfosforilata lega abbastanza fortemente per essere *crosslinked* agli mRNAs polyA⁺ (Sanford, J.R. *et al.*, 2005).

Le proteine SR, iperfosforilate durante la reazione di splicing, hanno un ruolo chiave per l'esporto dal nucleo. E' molto probabile che portino l'mRNA con loro nel citoplasma, poichè l'esporto nucleare di ASF/SF2 dipende non solo dall'andare avanti della trascrizione, ma anche dalla capacità della proteina di legare l'RNA (Duncan P.I. *et al.*, 1997). Per completare il ciclo è richiesto il rilascio delle proteine SR dall'mRNA e il loro ritorno nel nucleo. L'interazione delle proteine SR con il loro recettore di importo nucleare (TNR-SR) dipende dalla fosforilazione del dominio SR, indicando che la rifosforilazione avviene nel citoplasma. Ci sono indicazioni che la trasportina- SR accompagna le proteine SR agli speckles, invece di lasciarle al poro nucleare. In accordo, la proteina ASF/SF2 con ripetizioni RD o RE nel dominio SR localizza nel nucleo, anche se, nel caso della versione RE non completamente (Lai M.C. *et al.*, 2000; Lai M.C., 2001).

Ovviamente ci sono anche eccezioni. Infatti la protein hTra2 α è importata a prescindere dal suo stato di fosforilazione, e hTra2 β necessita di essere fosforilata solo quando trasportata dal suo recettore di trasporto TNR-SR2, non quando interagisce con TNR-SR1. Da notare che TNR-SR1 e TNR-SR2 sono isoforme prodotte dallo stesso gene per splicing alternativo, con TNR-SR2 espresso solo in alcuni tessuti e in alcune cellule (Yun C.Y. *et al.*, 2003). Cambiamenti nello splicing alternativo di TNR-SR, ad esempio in risposta al cambiamento nello stato di fosforilazione di hTra2 β , può di conseguenza cambiare la concentrazione nucleare di hTra2 β , creando un circolo vizioso o una possibile regolazione a *feedback*.

4. Altri fattori coinvolti nello splicing

4.1 La famiglia delle proteine hnRNP

Le proteine hnRNP impaccano il pre-mRNA nascente appena trascritto, legandosi cooperativamente a segmenti di circa 500 nucleotidi e sono escluse dallo spliceosoma. Queste proteine associate all'RNA formano un complesso ribonucleoproteico.

I complessi ribonucleoproteici sono le forme funzionali in cui i pre-mRNAs e gli mRNAs si trovano nella cellula.

Oltre al loro ruolo nell'impaccare l'RNA in un complesso ribonucleoproteico, le proteine hnRNPs svolgono funzioni che influenzano l'espressione genica, quali: regolare lo splicing del pre-mRNA e la scelta del sito di splicing 3' (Dreyfuss *et al.*, 1993; Varani and Nagai, 1998).

La maggior parte delle proteine hnRNPs contiene una struttura modulare con uno o più domini di legame all' RNA e almeno un dominio di interazione proteina-proteina.

Oltre al dominio RRM di legame all' RNA ne possono essere presenti altri, come ad esempio il dominio KH. Inoltre è sempre presente un dominio RGG (Arginina-glicina-glicina) per l'interazione proteina-proteina.

Queste proteine si muovono dal nucleo al citoplasma in continuazione (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1992; Michael *et al.*, 1995a, b), suggerendo un ruolo anche nell'esporto dell'mRNA (Izaurralde *et al.*, 1997).

In alcune proteine hnRNP sono state identificate dei segnali di esporto dal nucleo (NES) e di ritenzione nucleare (NRS) (Nakielny and Dreyfuss 1996).

Le proteine hnRNP riconoscono e si legano ai *silencers* di splicing e sono dei regolatori negativi. Hanno, infatti, un effetto opposto sulla selezione dei siti di splicing rispetto alle proteine SR.

Mentre un aumento della concentrazione delle proteine SR porta alla scelta del sito di splicing più prossimo al 5' dell'introne in un pre-mRNA che contiene duo o più siti di splicing alternativi, un eccesso delle proteine hnRNP, in particolare di hnRNP A/B promuove la scelta del sito di splicing distale presente al 5' dell'introne.

Molto spesso, la funzione antagonista delle proteine SR e hnRNP è basata sul legame competitivo al pre-mRNA, come nel caso di SF2/ASF e hnRNP A1.

SF2/ASF interferisce con il legame di hnRNP A1 mentre favorisce il legame dell'snRNP U1 a tutti i siti di splicing al 5', risultando nella selezione del sito prossimale. Al contrario hnRNP A1 lega in modo cooperativo ed indiscriminato il pre-mRNA interferendo con il legame di U1 ai siti di splicing, portando alla selezione del sito di splicing distale (Eperon *et al.*, 2000).

Quindi la relativa abbondanza delle proteine SR ed hnRNP è importante nella regolazione dello splicing alternativo.

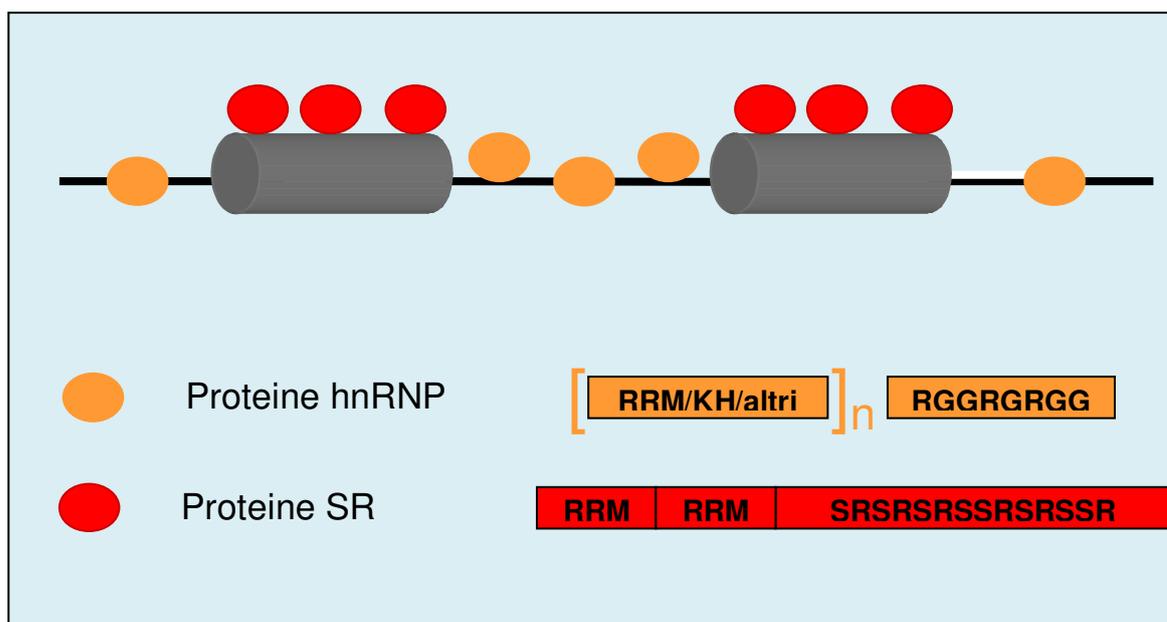


Figura 10 Rappresentazione schematica dei principali domini strutturali delle proteine della famiglia delle SR e delle hnRNP. Le proteine hnRNP si legano preferenzialmente ai *silencers* di splicing presenti sugli introni, mentre le proteine SR si legano preferenzialmete agli *enhancer* di splicing presenti sugli esoni. Le proteine SR e hnRNP hanno un effetto antagonista sulla selezione del sito di splicing.

4.2 PTB (*Polypyrimidine tract binding protein*)

La PTB, anche conosciuta come hnRNP I è una proteina di ~62 KDa.

La PTB non ha una funzione nello splicing costitutivo, ma può intervenire nella selezione di splicing alternativi, funge da regolatore negativo dello splicing. PTB e U2AF competono per il legame al tratto di polipirimidine e si ritiene che questa competizione sia alla base del meccanismo mediante il quale PTB agisce da regolatore negativo (Càceres and Kornblihtt, 2002). Inoltre PTB stessa è presente con tre isoforme dovute a splicing alternativo che hanno funzioni diverse nello splicing alternativo (Wollerton *et al.*, 2001).

4.3 La famiglia delle proteine CELF

Le proteine CELF sono una famiglia di proteine coinvolte nella regolazione dello splicing durante lo sviluppo ed in maniera cellula-specifico. Hanno tre motivi di legame all'RNA (RRM) e un dominio di funzione non ancora chiarita (Ladd *et al.*, 2001). L'espressione di due proteine CELF, CELF3 e CELF5, è ristretta al cervello.

4.4 Fattori tessuto specifici

Esistono diversi fattori espressi solo in determinati tessuti che regolano lo splicing alternativo. E' stata identificata in particolare una proteina, NOVA-1, espressa esclusivamente nei neuroni che regola lo splicing alternativo in queste cellule. Questa proteina possiede un dominio KH di legame all'RNA ed è stato dimostrato che topi in cui il gene NOVA-1 è stato deletato, mostrano specifici difetti nello splicing di due recettori inibitori del sistema nervoso, GlyR e GABA_A (Jensen *et al.*, 2000).

4.5 Splicing alternativo e malattie neurodegenerative

Lo splicing alternativo è un meccanismo importante nella regolazione dell'espressione genica, soprattutto in cellule altamente specializzate, come i neuroni. Ad esempio, la maggior parte dei recettori per i neurotrasmettitori contengono subunità che sono soggette a splicing alternativo, che influenza la loro localizzazione, la specificità di legame per il ligando, le vie di traduzione del segnale associate e le proprietà elettrofisiologiche (Lin *et al.*, 1997; Ehlers *et al.*, 1995; Stamm *et al.*, 1994).

In molte malattie neurodegenerative, sono stati identificati meccanismi anomali di splicing di pre-mRNAs che codificano per proteine di cruciale importanza per la funzionalità dei neuroni. In base a questo, sono state fatte delle speculazioni circa l'esistenza di uno specifico sistema che regola lo splicing nei neuroni, ma, risultati a supporto di tale ipotesi non sono stati ancora ottenuti.

La maggior parte di quello che si conosce riguarda il coinvolgimento di fattori di splicing ubiquitari. Certamente questi fattori sono essenziali nella regolazione dello splicing nei neuroni, ma non spiegano la regolazione di tutti gli eventi di splicing unici che si verificano nei neuroni.

Recentemente è stata identificata la proteina NOVA-1 (*neuro-oncological ventral antigen 1*). Questa proteina è esclusiva dei neuroni ed è coinvolta nella regolazione dello splicing (Buckanovich *et al*, 1993; Jensen *et al*, 2000).

Questo è il primo fattore di splicing specifico per i neuroni ad essere stato identificato nei mammiferi e la sua identificazione ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un sistema specifico per le cellule nervose per la regolazione dello splicing.

Alterazioni del corretto schema di splicing dovute a mutazioni nelle sequenze dei siti donatore ed accettore, o nelle sequenze interne di consenso sono alla base di diverse malattie genetiche. Lo splicing in corrispondenza di siti critici, smascherati dalla mutazione di quelli veri, determina mutazioni come teminazione prematura della sintesi proteica oppure introduzione di slittamenti della corretta cornice di lettura (*frameshifting*).

Si conoscono numerose malattie neurologiche causate da alterazioni nel macchinario di splicing.

In alcune malattie neurodegenerative, che colpiscono selettivamente i motoneuroni, come la sclerosi laterale amiotrofica e l'atrofia spino-muscolare sono state identificate delle isoforme aberranti, prodotte per splicing alternativo, di alcune proteine necessarie per la sopravvivenza cellulare. A seguito di ciò, si è ipotizzato che anomalie nello splicing possano essere un meccanismo che causa o comunque aggrava queste malattie.

SCOPO DELLA TESI

Come descritto nell'introduzione, malattie neurodegenerative comuni come il Parkinson l'Alzheimer e la SLA mostrano caratteristiche simili a livello cellulare, e sicuramente è presente in tutte queste malattie un contributo nucleare. Per quanto riguarda la trascrizione questo è stato un meccanismo ben studiato. Ma lo splicing del pre-mRNA è anche un importante step nella regolazione dell'espressione genica e ci sono, invece, evidenze che lo splicing alternativo potrebbe essere disturbato.

Nei pazienti SLA, ad esempio, l'abbondanza dell'isoforma minore del gene *survival of motor neuron (SMN)-interacting protein (SIP1)* aumenta (Aerbajinai et al. 2002), e il rapporto fra le isoforme FLIP/FLOP dei recettori AMPA cambia (Tomiya et al. 2002). I livelli delle isoforme del trasportatore del glutammato EAAT2 varia nei pazienti umani di SLA (Lin et al. 1998), ed anche in un modello murino di SLA (Münch et al. 2002). Nei pazienti di Alzheimer, il rapporto fra le isoforme dell'mRNA della presenilina2 cambia (Sato et al.1999; Smith et al. 2004) e nel Parkinson ci sono evidenze che il rapporto fra le isoforme della sinucleina potrebbe cambiare (Neystat et al.1999). Mentre questi sono dei casi isolati, sembra possibile che il disturbo fra il rapporto delle isoforme potrebbe essere un fenomeno generale. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se lo splicing alternativo è disturbato in maniera generale in condizioni di neurodegenerazione. Per testare questa ipotesi, abbiamo usato cellule di neuroblastoma trattate con una neurotossina (paraquat) come modello per le malattie neurodegenerative. Abbiamo dimostrato che il paraquat induce cambiamenti in molti geni che vanno incontro a splicing alternativo, e che le cellule di origine neuronale sono più suscettibili a questo effetto rispetto a cellule di altro tipo. Infine, i nostri dati indicano che il danneggiamento mitocondriale influenza lo splicing attraverso la deplezione di ATP. Questo potrebbe rappresentare un importante modo attraverso cui il danneggiamento mitocondriale sconvolge il precario equilibrio che caratterizza le cellule di origine neuronale, contribuendo perciò alla morte cellulare in malattie neurodegenerative.

Abbiamo poi cercato di capire quale fosse la via di trasduzione del segnale coinvolta nel cambiamento dello splicing alternativo. Due classi di proteine determinano la selezione dei siti di splicing: le proteine hnRNPs e le proteine SR (vedi introduzione). Entrambe sono fosforilate e la fosforilazione è importante per la loro attività. Molto poco, invece, è conosciuto sulla cascata del segnale che determina la fosforilazione di queste proteine.

Abbiamo prima cercato di mappare eventuali cambiamenti nelle popolazioni delle proteine hnRNPs ed SR. Sia le proteine SR che le hnRNPs possono essere purificate e studiate utilizzando un approccio sub-proteomico. Abbiamo inoltre utilizzato inibitori di diverse vie di trasduzione del segnale presenti nella cellula per capire quale fosse quella che influenza lo splicing alternativo.

Questi studi si pongono l'obiettivo di capire come stimoli esterni modulino lo splicing alternativo nei neuroni e la correlazione di questo con i processi neurodegenerativi.

MATERIALI E METODI

MATERIALI

1. Enzimi

Gli enzimi 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.

2. Soluzioni comunemente utilizzate

TAE Tris 40 mM
 Acido acetico 20 mM
 EDTA 1mM

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%
BUFFER A	10 mM Hepes 50 mM NaCl 0,5 M saccarosio 0,1 mM EDTA 0,5% Triton X-100 100 mM NaF 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
BUFFER B	10 mM Hepes 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
BUFFER C	10 mM Hepes 500 mM NaCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 0,2% Triton X-100 1 mM DTT

	0,5 mM PMSF
RSB 300	10 mM Tris-HCl [pH 7.4]
	300 mM NaCl
	2.5 mM MgCl ₂

3. Composti chimici

- Metyl viologeno (paraquat): inibitore complesso I dei mitocondri e generatore di ROS è sciolto in PBS e conservato a -20°C;
- Rotenone: inibitore complesso I dei mitocondri è sciolto in PBS e conservato a -20°C
- tert-Butile idroperossido: generatore ROS, soluzione al 70% in H₂O;
- 2,4 dinitrofenolo: disaccoppiante catena respiratoria con la produzione di ATP è sciolto in metanolo e conservato a 2°-8°C;
- Cycloheximide: inibitore della traduzione è sciolto in DMSO e conservato a -20°C;
- SB-203580 : inibitore della P38 MAPK è sciolto in DMSO e conservato a -20°C;
- SP-600125: inibitore di JNK 1,2 e 3; viene sciolto in DMSO e conservato a -20°C;
- U0126: inibitore delle ERK; viene sciolto in DMSO e conservato a -20°C;
- KN93: inibitore delle CamK è sciolto in DMSO e conservato a -20°C
- FK506: inibitore della calcineurina è sciolto in DMSO e conservato a -20°C

I composti chimici sono stati acquistati dalla Sigma.

4. Linee Cellulari

Le colture sono mantenute in un incubatore termostato a 37°C in atmosfera arricchita in CO₂ al 5% . Sono stati usati i seguenti terreni: D-MEM F12 reso completo con 10% FBS (fetal bovine serum) 1X Pen/Strep per le cellule: SH-5YSY, glioma U373 e NSC-34; D-MEM reso completo con 10% FBS (fetal bovine serum) 1X Pen/Strep è stato usato per le cellule HEK ed HeLa; il terreno RPMI1640 supplementato con 20% FBS è stato usato per le cellule jurkart. Terreni e FBS sono acquistati da Gibco. Approssimativamente al 90% di confluenza i composti chimici riportati sopra sono stati aggiunti alla concentrazione finale riportata in figura.

5. Anticorpi utilizzati

Gli anticorpi utilizzati per questi studi sono: anti ASF/SF2 (Zymed, monoclonale di topo 1:1000 per Western Blot) anti Tra2 beta 1 (Stefan Stamm, Università di Erlangen, policlonale di coniglio 1:1000) anti hnRNPA1 (sigma, monoclonale di topo 1:2000). Gli anticorpi secondari utilizzati sono: anticorpo monoclonale coniugato ad HRP (Horseradish Peroxidase) (Amersham 1:10000), anticorpo policlonale coniugato ad HRP (Amersham, 1:10000).

METODI

1. RT-PCR

Le cellule di una piastra di 10 cm di diametro sono raccolte mediante tripsinizzazione, centrifugate a 250 g per 5 minuti e lavate con PBS. L'RNA totale è stato estratto usando il kit RNeasy (Qiagen). Il cDNA è stato preparato mediante retro trascrizione di 10 ug di RNA totale usando M-Mulv (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, New England Biolabs), 2 uM oligo dT20 e 0,5 mM deossi NTP. Le reazioni di PCR sono eseguite in accordo al protocollo della Taq polimerasi (New England Biolabs), usando 35 cicli ed una temperatura di appaiamento degli oligo di 60°C. Le sequenze dei primers sono descritte in tabella1.

I prodotti PCR sono separati su un gel di agarosio al 2%. Come marcatore di peso molecolare abbiamo usato un 100 bp ladder (Fermentas), con le seguenti bande mostrate in figura: 1000, 900, 800, 700, 600, 500 (più intensa), 400, 300, 200, 100 bp. Le immagini sono state prese con una CCD camera (Bio-rad) e i segnali sono stati quantificati usando il software ImageQuant 2.2 (Amersham).

I risultati sono riportati come \pm deviazione standard. La significatività dei cambiamenti rispetto al controllo è stata saggiata mediante lo Student t-test; una probabilità minore dello 0,05 è stata considerata come abbastanza significativa per rigettare l'ipotesi nulla che il cambiamento potrebbe essere solo il risultato di fluttuazioni casuali intorno al valore medio.

2. Misurazioni di ROS e ATP

La generazione di intermedi reattivi dell'ossigeno è stata rilevata usando la diclorofluoresceina diacetata (H₂DCFDA).

Cellule trattate e di controllo sono incubate con 5 μ M di H₂DCFDA (Molecular Probes) in D-Mem F12 (Gibco) supplementato con 1% di FBS a 37°C in un'atmosfera di aria arricchita con 5% CO₂ per 45 minuti. Le cellule sono lavate con PBS e raccolte con uno scraper in 400 μ l di PBS. Per misurare la mortalità cellulare le cellule risospese sono incubate con 12.5 μ g/mL di 7-aminoactinomicina D che entra nelle cellule morte. Le misure sono state effettuate con un FACS Calibur (BD Bioscience). I dati sono compensati e analizzati utilizzando FlowJo software (TreeStar).

Le misure di ATP sono state effettuate utilizzando una reazione chemiluminescente guidata dall'ATP come descritto dal fabbricante del kit di rilevamento (ATPlite; Perkin Elmer). In breve, cellule trattate e di controllo sono lavate due volte in PBS e raccolte in 400 μ l di PBS più 200 μ l di soluzione di lisi, tutto su ghiaccio. Ciascun campione è diviso in tre aliquote da 180 μ l ciascuno; per ciascun campione sono aggiunti 60 μ l di miscela di D-luciferina/luciferasi e la luminescenza è misurata immediatamente su un Victor3V multilabel counter (Perkin Elmer). Le concentrazioni di ATP sono calcolate usando uno standard a concentrazione nota di ATP e i valori sono normalizzati rispetto al contenuto di proteine negli estratti proteici misurate con un saggio Bradford (Bio-rad).

3. 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 μ g e in ordinata l'assorbanza) è possibile ottenere i μ g di proteine totali.

4. Western blotting

Tutti gli estratti proteici utilizzati 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-ASF/SF2 1:1000; anti-Tra2 β 1 1:1000; anti-hnRNP A1 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).

5. Estratti proteici citoplasmatici e nucleari

Le cellule trattate e di controllo sono staccate con uno scraped in 2 ml di PBS a cui è affiunto 1 mM di EDTA. Le cellule sono poi centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti e il pellett è lavato con 2 ml di PBS. Il pellet è risospeso in 6 volumi di buffer A e tenuto in ghiaccio per 5 minuti. Successivamente centrifugato a 2000 rpm per 5 minuti. Il super (estratto citoplasmatico) è chiarificato mediante centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti. Il pellet (nuclei) sono lavati in 6 volumi di buffer B e centrifugati a 2000 rom per 5 minuti. Il pellet è poi risospeso in 4 volumi di buffer C e tenuto in agitazione a +4°C per 15 minuti. L'estratto nucleare è poi chiarificato mediante centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti. Gli estratti sono poi quantizzati tramite saggio brado.

6. Cromatografia su colonna con biglie di DNAss

In una colonna di plastica vengono fatte passare 1ml di biglie di DNAss-Agarose al 15% in sospensione nel buffer RSB300 e si attende che le biglie si siano impacchettate.

Successivamente la colonna è equilibrata con 5 ml di RSB300. Le biglie di DNAss-agarose sono utilizzate per purificare le proteine hnRNPs, che essendo proteine in grado di legare l'RNA, legano anche il DNA a singolo filamento. Successivamente è passato il campione. Prima di essere utilizzati gli estratti proteici sono digeriti con la nucleasi micrococcica per rompere i complessi ribonucleoproteici e liberare le proteine hnRNPs. Sono utilizzate 100 unità di nucleasi per ml di estratto più 1 mM di CaCl₂ (la nucleasi è

un enzima calcio dipendente). L'estratto è incubato 15 minuti a 30°C. Per inibire la nucleasi agli estratti è aggiunto 5 mM di EGTA.

Gli estratti digerati sono poi passati su colonna ed incubati in agitazione a +4°C per 15 minuti. La colonna è poi lavata 4 volte con 5 ml di RSB300. Per eluire le proteine che si sono legate alle biglie è usata UREA 4M in RSB 300. Le frazioni sono raccolte manualmente in un volume finale di 500 ul.

Le proteine così raccolte sono poi precipitate in 6 volumi di 50%Etanolo 25% Metanolo 25% Acetone a -20°C O.N. (over night).

7. Precipitazione delle proteine SR

Gli estratti proteici è aggiunto solfato di ammonio al 65% della saturazione. Dopo di 2h in agitazione a +4°C gli estratti sono centrifugati ad 8000g per 20 minuti. Il supernatante è trasferito in un nuovo tubo e centrifugato nuovamente a 8000 g per 20 minuti. Il supernatante è raccolto ed è aggiunto solfato di ammonio al 90% di saturazione. DEopo 0,5-12 ore di agitazione a 4°C, gli estratti sono centrifugati a 25000 rpm a 4°C per 1 ora. Il supernatante è rimosso e il pellet è lavato con 90% di solfato di ammonio in "isolation buffer" (65 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM HEPES at pH 7.6, 10 mM Na⁺EDTA, 5 mM DTT, 5 mM potassium fluoride (KF), 5 mM p-glycerophosphate, 0.2 mM PMSF, 2 ug/ml of aprotinin).

Il pellet è risospeso in 10 ml di dialysis buffer (65 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM HEPES at pH 7.6, 1 mM Na₂EDTA, 2 mM DTT, 5 mM KF, 5 mM β-glycerophosphate, and 0.2 mM PMSF) e dializzati 3 volte contro 1,4 litri di dialisi buffer nel corso di 16 h. Il dializzato è raccolto e conservato in aliquote di 1 ml a -80°C. Le aliquote dializzate sono scongelate e centrifugate a 15 minuti a 13000g. Il supernatante è trasferito in un nuovo tubo ed è aggiunto MgCl₂ ad una concentrazione finale di 20mM. Dopo 1 h di incubazione su ghiaccio i tubi sono centrifugati a 13000g per 30 minuti. Dopo aver rimosso il supernatante i pellet sono lavati con 200 ul di Dyalisis buffer con 20 mM MgCl₂. Il pellet contiene le proteine SR purificate e può essere risospeso nell'opportuno buffer, a seconda dei successivi esperimenti.

8. SDS-PAGE

L'elettroforesi si basa sulla proprietà di una molecola dotata di carica netta di muoversi in un campo elettrico. Le separazioni elettroforetiche vengono effettuate in gel di poliacrilammide.

Resolving gel 10% 2,5 ml 4X Protein gel
2,5 ml acrilammide-bis acrilammide 29:1
33 µl APS 10%
6,7 µl Temed
H₂O fino a 10 ml

Stacking gel 5% 2,5 ml 4X stacking buffer
1,25 ml acrilammide-bis acrilammide 29:1
33 µl APS 10%
33 µl Temed
H₂O fino a 10 ml

Ai campioni viene aggiunta una quantità appropriata di *Sample Buffer* 4X (costituito da: 2X *stacking buffer*, 2% SDS, 200 mM β-Mercaptoetanolo, 0,1% BpB, 26% glicerolo) e quindi, bolliti a 90°C per 5 minuti.

Mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% a 30 mA per circa 1 ora sono state effettuate le separazioni delle proteine.

Le proteine dopo separazione possono essere visualizzate mediante diverse tecniche.

9. Colorazione delle proteine su gel mediante Sypro Ruby

Sypro Ruby (Bio-rad) è marcatore fluorescente che permette di rilevare le proteine separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Dopo la corsa elettroforetica il gel è rimosso dal suo supporto, messo in un contenitore di plastica e lavato per 30 minuti con una soluzione di fissaggio costituita da 40% etanolo e 7% Acido acetico. Successivamente la soluzione di fissaggio è rimossa e il gel è coperto con Sypro Ruby, in genere per un gel di dimensioni 8X10 cm sono usati 50 ml di Sypro Ruby. Lasciare il gel in agitazione al buio per 3 h. Mettere in gel in 10% metanolo e 7% acido acetico per

eliminare la fluorescenza di fondo, lavare il gel in acqua prima di procedere con l'acquisizione. Le immagini sono state prese con una CCD camera (Bio-rad).

RISULTATI

1. Il Paraquat cambia lo splicing alternativo dei geni SMN ed Apaf1

Per verificare se il paraquat, una sostanza modello implicata nella neurodegenerazione, afferisce la selezione dei siti di splicing in maniera generale, abbiamo deciso di testare il suo effetto sui pattern di splicing di cellule in coltura. Abbiamo scelto linee cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y conosciute come sistema modello per lo studio dei processi neurodegenerativi. Per settare il sistema sperimentale abbiamo iniziato a studiare due mRNAs che sono conosciuti avere isoforme prodotte per splicing alternativo: Apaf-1 un fattore pro-apoptotico (Cecconi *et al.*, 1998) e SMN per via del suo ruolo in una particolare malattia neurodegenerativa: l'atrofia spino-muscolare. Le cellule sono trattate per 24 h con 0, 0.4 e 1 mM di paraquat, aggiunto al terreno di coltura. La maggior parte delle cellule sopravvivono ma diventano suscettibili agli stimoli di morte cellulare. Dopo 24 h a 37°C, le cellule sono state raccolte e l'RNA è stato estratto. Il cDNA è preparato mediante retro trascrizione usando oligo(dT) e l'mRNA è stato amplificato mediante PCR. Gli oligo per la PCR sono scelti in maniera tale da coprire la regione con gli esoni alternativi: per SMN si appaiano nell'esone 4 e 8 per monitorare gli esoni alternativi 5 e 7; per Apaf-1 si appaiano nell'esone 17 e 19 per monitorare l'esone alternativo 18. (vedere Tabella 1 per informazioni sulla sequenza).

I prodotti PCR sono stati identificati dalla loro lunghezza su gel di agarosio e sequenziati per conferma. Il risultato dell'RT-PCR è mostrato in figura 1(a) per SMN si osservano due bande maggiori nel controllo senza paraquat, l'isoforma full-length e, meno intensa, l'isoforma mancante dell'esone 7. Inoltre si osservano altre due deboli bande che rappresentano l'isoforma mancante dell'esone 5 e l'isoforma mancante sia dell'esone 5 che dell'esone 7. Dopo trattamento con paraquat l'isoforma full-length diminuisce d'intensità e tutte e tre le isoforme più piccole aumentano d'intensità. Per Apaf-1 si osservano due bande: la full-length e l'isoforma mancante dell'esone 18. Mentre l'isoforma full-length è più abbondante nel controllo, questo risultato è invertito dopo aggiunta di paraquat. Per quantificare queste osservazioni abbiamo fatto l'integrale di ciascuna banda (vedere materiali e metodi per maggiori informazioni). Poiché l'RT-PCR non è una tecnica quantitativa in termini assoluti, abbiamo usato l'isoforma full-length come controllo interno e calcolato la quantità di isoforma più piccola rispetto all'isoforma full-length. Inoltre, un esperimento con primers marcati radioattivamente

indica che questa quantità non cambia in maniera significativa tra 20 e 35 cicli (dati non mostrati). Abbiamo normalizzato la quantità del controllo senza paraquat come 1 e perciò espresso la quantità dopo trattamento come aumento rispetto al controllo. Tre esperimenti rappresentativi sono stati quantificati e i risultati sono mostrati in fig. 1(b): per SMN c'è un aumento di 2 volte dell'isoforma mancante dell'esone 7 e fino ad un aumento di 5 volte per l'isoforma mancante dell'esone 5. In entrambi i casi l'aumento tra 0.4 e 1 mM di paraquat è piccolo. Per Apaf-1 l'aumento dopo trattamento è di 3 volte e in questo caso sembra esserci una maggiore differenza fra le due concentrazioni di paraquat. Riassumendo, concludiamo che il paraquat induce uno shift nell'abbondanza relativa delle isoforme di SMN e Apaf1 e di conseguenze sembra avere un effetto sulla selezione dei siti di splicing.

Tabella 1

GENE	upstream primer anneals to		alternatively spliced sequences		downstream primer anneals to	
	sequence	exon	startno missing nts..... ... end	exon	Sequence	exon
hApaf1	CATCAGCAAATGAGAGGAAAA	E17	CTTTTTGAC ...109nts ...AGAAATCAGG	E18	AAGGTGGCTGATTGCAG AGG	E19
hBcl2A1	GGAGTTTGAAGACGGCATCA	E1	GGGAAATGGC... 36nts ...ACAAGAAGAG	E2	TCTGTGAAATGCTATCTC TCC	E3
hBcl-x	AGGCAGGCGACGAGTTGA	E2	GTAGTGAATG...169nts ...CGGCGGCTGG	E2(3')	ACTGTGGCCGGCGTGGT TCT	E3
hCasp3	GTGCTATTGTGAGGCGGTT	E1	TTAATAAAGG...173nts ...AAAAGCACTG	E2-E3	TGACATCTCGGTCTGGTA CA	E4
hCasp8	AACCTGCTGGATATTTTCATAG	E4	AGAGAAGCAG... 25nts ...TTTTCAAATG	E5	GAACAGGATAGTGAATC ACAG	E6
hCasp9	CAGAGGTTCTCAGACCGGA	E2	GTGCTCTTGA...430nts ...TGTGGTGGGG	E3-E6	CAGTGACATCTTTGTGTC CTA	E7
hLSm1	TGAACTATATGCCTGGCACC	E1	CAAACCTAGT... 96 nts...AGGAGAAATA	E3	GAGAAGTTGAAAGTGCA GGC	E4
hPTB	GACGGGCAGAACATCTACAA	E8	GTGCACCTGG... 58nts ...CAAGCTGCAG	E9	GGAAATTCTGTATTGCTG GTC	E10
hSIP1	GAGTTGATGCCTCGGCTATTGC	E1	GTAGAGCCTT... 64nts ...GGCGGGTCCA	E1(3')	TGTGAACAAACATAGAA GTAC	E4
hSMN	GGCCAAGACTGGGACCAGG	E4	CCAGGTCTAA... 76nts ...TGGACCACCA GGTTTCAGAC... 32nts ...TTAAATTAAG	E5 E7	AAATGCTGGCATAGAGC AGC	E8
mEno2	CGTGGAGGTGGATCTCTAT	E2	CCAAGTTTGG...337nts ...AACAGCGAAG	E6-E7	CGCTGATCCTCCCGATA C	E8
mhnR-A2B1	GGATTCTCGTGGTGGCGG	E6	GGCAATTTTG...169nts ...ATGGAGGAGG	E8	GAACATGGGAGGACCAT ATG	E9
mhnR-D	CAGAGGGAGCCAAGATCG	E1	CCATCAAAC... 34nts ...AGCGGGAAGA	E2	GCACTCTGAAGTTAGAT CCTA	E3

Tab. 1 In Tabella sono riportati i nomi degli mRNAs, il sito di appaiamento degli oligo a monte più il numero dell'esone, la sequenza della parte alternativa (sono riportati i primi 10 nucleotidi, il numero dei nucleotidi che non sono mostrati, ed infine gli ultimi 10 nucleotidi di ciascuna sequenza) e il sito di appaiamento degli oligo a valle più il numero dell'esone. Se un esone è numerato come segue "(3)", significa che la sequenza alternative si trova solo nel 3' del rispettivo esone.

Fig. 1

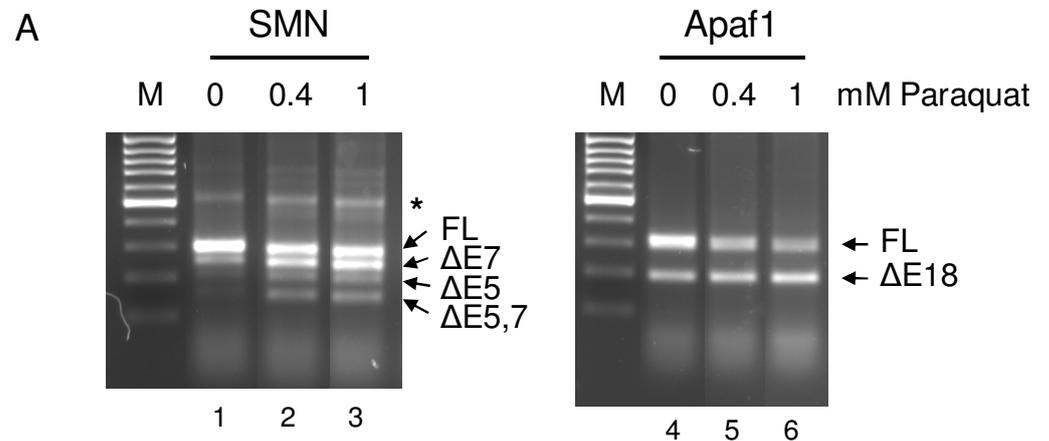
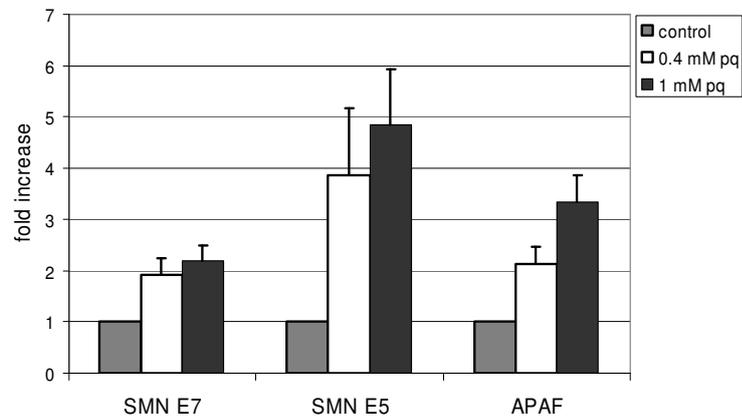
**B**

Fig. 1 Il trattamento con il paraquat cambia lo splicing alternativo. (a) Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY sono incubate per 24 h senza paraquat (corsia 1 e 4,) con 0.4 mM di paraquat (corsia 2 e 5) e con 1 mM di paraquat (corsia 3 e 6). E' stato estratto l'rRNA totale e le isoforme di SMN e Apaf1 sono state monitorate mediante RT-PCR usando primers che coprono la regione con gli esoni alternativi. La reazione di PCR è stata separata mediante elettroforesi su gel d'agarosio e i prodotti sono evidenziati mediante colorazione con bromuro di etidio. Le bande specifiche sono indicate dalle frecce sul lato destro del pannello. L'asterisco indica un prodotto minore non specifico per SMN, M marcatore 100 pb. (b) Le bande sono quantizzate e normalizzate rispetto alle relative bande nel controllo senza paraquat (barre grigie). Le bande bianche e nere indicano l'incremento nell'intensità dell'intensità della banda dopo trattamento con 0.4 e 1 mM di paraquat rispettivamente. La barra di errore indica la deviazione standard per 3 esperimenti indipendenti.

Per testare la cinetica di induzione del cambiamento nei patterns di splicing di SMN e Apaf1, le cellule di neuroblastoma sono state trattate con 1 mM di paraquat per 0, 6, 12 e 24 h. Come mostrato in fig. 2(a) di nuovo osserviamo le stesse isoforme che cambiano in intensità con il tempo. La quantificazione di tre esperimenti mostra un graduale incremento fino al *time point* di 24 h. Il *time point* a 4 h non mostra un significativo cambiamento nella quantità delle isoforme. Quindi concludiamo che l'effetto del paraquat a queste concentrazioni richiede diverse ore per manifestarsi.

Fig. 2

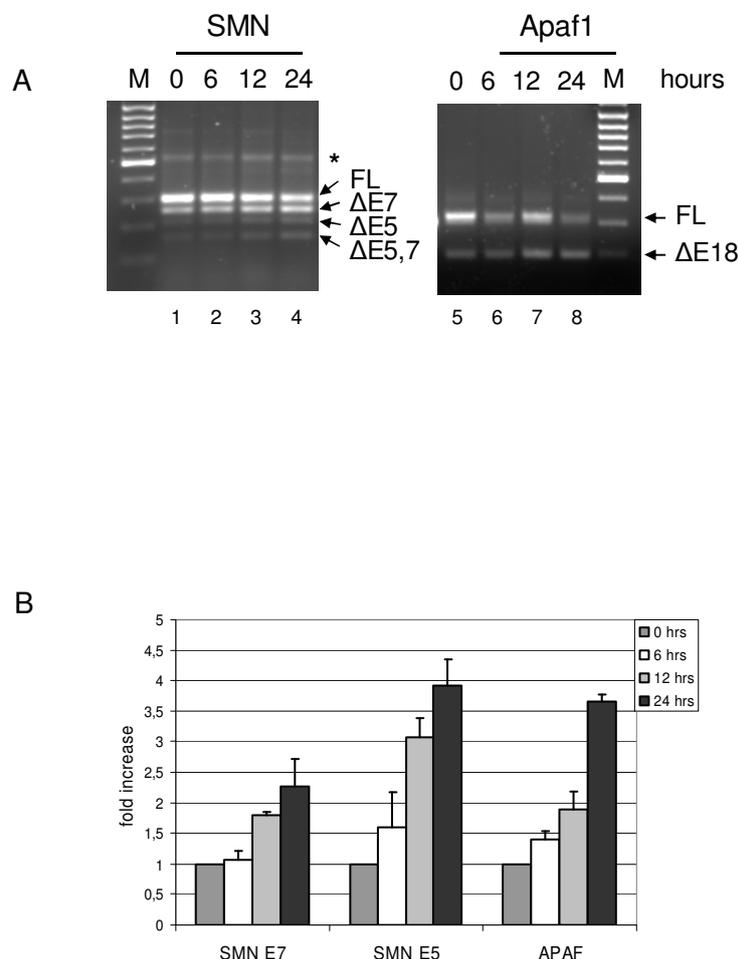


Fig. 2 L'effetto del paraquat richiede diverse ore per manifestarsi. (a) Le cellule di neuroblastoma sono incubate con 1 mM di paraquat per diversi tempi (indicati in alto sopra ciascuna corsia). Le regioni degli mRNAs di SMN e Apaf1 che vanno incontro a splicing alternativo sono amplificate e visualizzate in fig. 1. L'asterisco indica un prodotto secondario di SMN non specifico. M, marcatore. Le bande sono quantizzate e normalizzate rispetto al controllo a 0 h. Le bande bianche, grigie e nere indicano l'incremento nell'intensità delle bande dopo 6, 12 e 24 h rispettivamente. La barra di errore indica la deviazione standard per 3 esperimenti indipendenti.

2. Il cambiamento dello splicing alternativo riguarda diversi mRNAs

Per dimostrare se lo splicing è disturbato in maniera generale abbiamo testato diversi mRNAs. Abbiamo selezionato mRNAs che hanno un ruolo nell'apoptosi (Bcl2A-1, Bcl-x, caspasi) o che sono coinvolti nel metabolismo dell'mRNA (SIP1, Lsm1, PTB). In queste famiglie funzionali abbiamo cercato mRNA che esprimono isoforme alternative che sono presenti nel database "*of human expressed sequence tags*" (pubblicate nel GenBank of the NIH). Questo database contiene un grande numero di sequenze di "*randomly picked mRNA*" e perciò riflette il *pool* di mRNA trascritti e processati. Le isoforme che abbiamo deciso di monitorare sono riassunte nella tabella 2. In 5 esperimenti indipendenti, le cellule di neuroblastoma sono state trattate per 24 h con 1 mM di paraquat, l'RNA è stato estratto e il cDNA sintetizzato. Da questi cDNAs, sono state amplificate le regioni di interesse dell'mRNA ed è stata calcolata la abbondanza relativa delle loro isoforme. Le cellule di neuroblastoma SH-5YSY non esprimono alcune isoforme che sono presenti nell' EST database probabilmente a causa di regolazioni dello splicing tessuto specifico o durante lo sviluppo. Queste isoforme non sono state osservate neanche dopo induzione con il paraquat (vedi tabella 2). Per le altre isoforme abbiamo calcolato il cambiamento nell'abbondanza relativa dell'isoforma più piccola e calcolato la deviazione standard. Tutti gli mRNAs analizzati cambiano in maniera significativa dopo trattamento con paraquat, passando da un aumento di 1,3 volte della caspasi 3 esone 1 a 5,1 volte per Apaf1 esone 18. Per testare la significatività dell'incremento abbiamo effettuato un t-test. Una probabilità di meno dello 0,05 è usualmente accettata come evidenza per un cambiamento significativo. Secondo questo criterio il cambiamento osservato per SIP1 e la caspasi 3 non è significativo, mentre tutti gli altri mRNAs mostrano un incremento significativo dell'isoforma più piccola dopo trattamento con paraquat, i valori del t-test vanno da 0,048 per Lsm1 a 0.000003 per SMN. Noi concludiamo che l'effetto del paraquat sullo splicing alternativo non è limitato ad SMN ed Apaf1, ma anche altri mRNAs sono colpiti. Lo splicing del pre-mRNA non è comunque completamente disturbato: gli eventi di splicing che sono costitutivi in queste cellule rimangono non colpiti. Infatti sembra esserci una forte correlazione fra l'abbondanza dell'isoforma più piccola prima del trattamento con il paraquat e l'incremento dopo il trattamento (tabella 2).

Tabella 2

Gene	alternative exon ¹	abundance ²	change ³
PTB	E9	0	no change
Bcl2A1	E2	0	no change
Bcl-x	E2 (alt 5'SS)	0	no change
Casp3	E1	0.05	1.3 ⁴
SIP1	E1 (alt 5'SS)	0.06	1.6 ⁴
SMN	E5	0.09	2.88
hLSm1	E3	0.14	2.1
Casp8	E5	0.19	1.97
SMN	E7	0.4	2.64
Casp9	E3-6	0.65	3.7
Apaf1	E18	1.0	5.06

Tab. 2 1 Gli esoni che sono saltati nell'isoforma minore. In Bcl-x e SIP1 il rispettivo esone è più corto nell'isoforma minore. 2 Quantità dell'isoforma minore rispetto alla full length prima del trattamento con paraquat. 3 Aumento di questa quantità dopo trattamento con paraquat. 4 Valori troppi piccoli per avere una rilevanza statistica.

Fig. 3

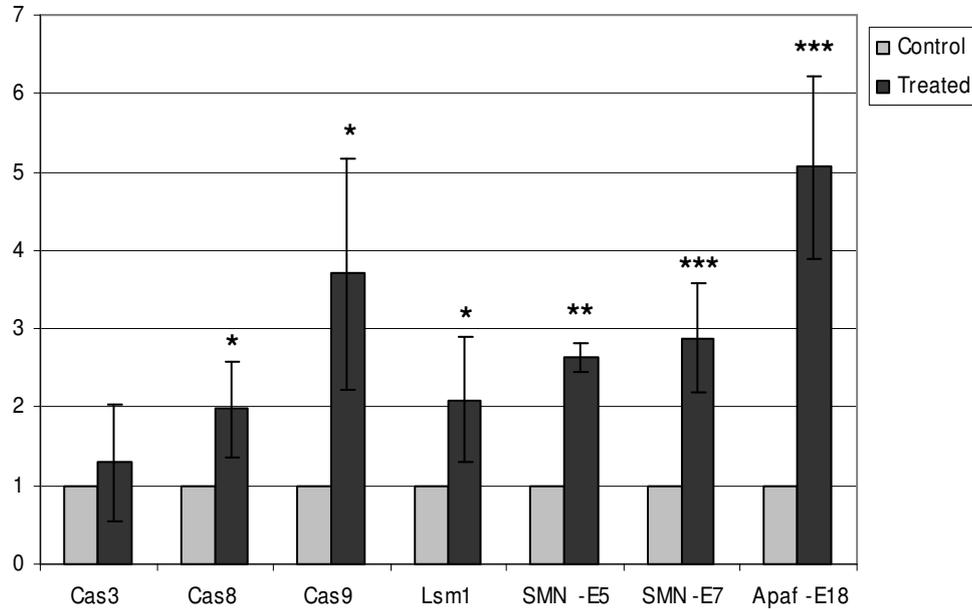


Fig. 3 Diversi mRNAs che vanno incontro a splicing alternativo nell'abbondanza relativa delle isoforme dopo trattamento con il paraquat. In 5 esperimenti indipendenti, le cellule di neuroblastoma umano sono trattate con 1 mM di paraquat per 24 h. E' stato estratto l'RNA totale e le regioni dei rispettivi mRNAs che vanno incontro a splicing alternativo sono state analizzate e quantizzate. Le barre indicano l'incremento dell'isoforma indicata dopo trattamento con paraquat; la barra di errore indica la deviazione standard. Gli asterischi indicano il risultato dello student t-test.*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$; Cas3, Caspasi3, Cas8, Caspasi 8, Cas9, caspasi 9.

3. Cellule di origine neuronale sono più suscettibili allo stress cellulare causato dal paraquat

Per testare se questo effetto sullo splicing alternativo è una specifica risposta delle cellule neuronali abbiamo ripetuto lo stesso set di esperimento su più di 5 linee cellulari. Abbiamo studiato la linea cellulare derivata dalla fusione moneuroni/neuroblastoma, NSC-34, che mostra un fenotipo di tipo neuronale perfino quando non è differenziato ed è generalmente considerato un buon modello per i motoneuroni. Queste linee cellulari sono di origine murina e comunque gli eventi di splicing alternativo non sono ben conservati fra specie diverse (Pan *et al.*, 2005). In particolare le cellule NSC non esprimono le isoforme Apaf1 $\Delta E18$ ed SMN $\Delta E7$ (dati non mostrati). Perciò abbiamo cercato altri eventi di splicing alternativo specifici per il topo. Abbiamo scelto il gene neuronale enolasi 2 (che ha due esoni alternativi il 6 e il 7), hnRNP A2/B1 (esone 8) e hnRNP D (esone 2). Le cellule sono state trattate per 24 h con 0.4 e 1 mM di paraquat e le isoforme dei geni citati prima sono state monitorate mediante esperimenti di RT-PCR. Ogni esperimento è stato ripetuto 4 volte. Come mostrato in figura 4(a) tutte e tre le isoforme cambiano con un effetto a malapena significativo per hnRNP D ad un cambio drastico per l'enolasi 2. Inoltre abbiamo studiato 4 linee cellulari umane di origine non neuronale: cellule HEK293, linfociti umani jurkart, HeLa SS6 e glioma U373. Come mostrato in figura 4 (b-e) c'è un lieve se non nullo incremento delle isoforme più piccole. L'isoforma piccola di Apaf1 aumenta di circa 1,5 volte rispetto alle 5 volte del neuroblastoma. L'isoforma di SMN $\Delta E7$ apparentemente diminuisce nelle jurkart ed aumenta di 1,7 nelle HEK e di 1,5 nel glioma rispetto all'aumento di 2,7 volte del neuroblastoma. Concludiamo che entrambe le linee cellulari neuronali mostrano una forte risposta al paraquat rispetto alle 4 linee cellulari non neuronali analizzate che al contrario mostrano un debole cambiamento. Questo indica che le cellule di origine neuronali sono molto più suscettibili.

Fig. 4

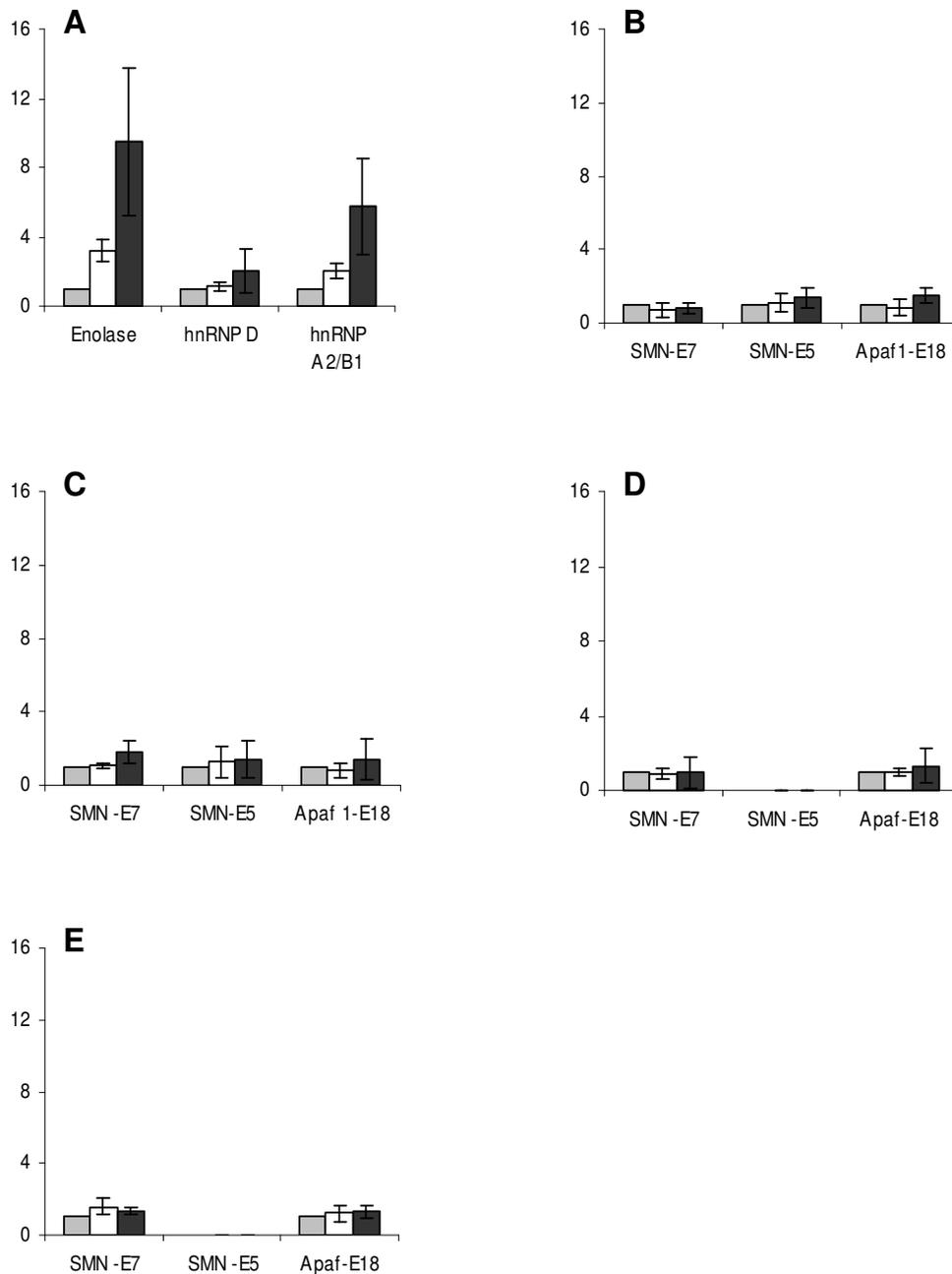


Fig. 4 Le linee cellulari neuronali sono più suscettibili ai cambiamenti indotti dal trattamento con il paraquat rispetto a cellule di origine non neuronale. Il risultato grafico di tre esperimenti indipendenti su cellule ibride motoneuroni neuroblastoma(a), linfociti jurkart (b), cellule Hek(c), HeLa (d) e glioma U373 (e). Le cellule sono trattate con 0, 0,4 e 1 mM di paraquat (barre grigie, bianche e nere, rispettivamente) per 24 h e i pattern di splicing per SMN e Apaf1 (Enolasi, hnRNP d, hnRNP A2/B1 nel caso delle NSC34) sono stati analizzati come descritto precedentemente. La barra di errore rappresenta la deviazione standard. Notare che le cellule HeLa e il glioma non esprimono livelli apprezzabili dell'isoforma di SMN DE5).

4. Via di trasduzione del segnale che regola lo splicing alternativo

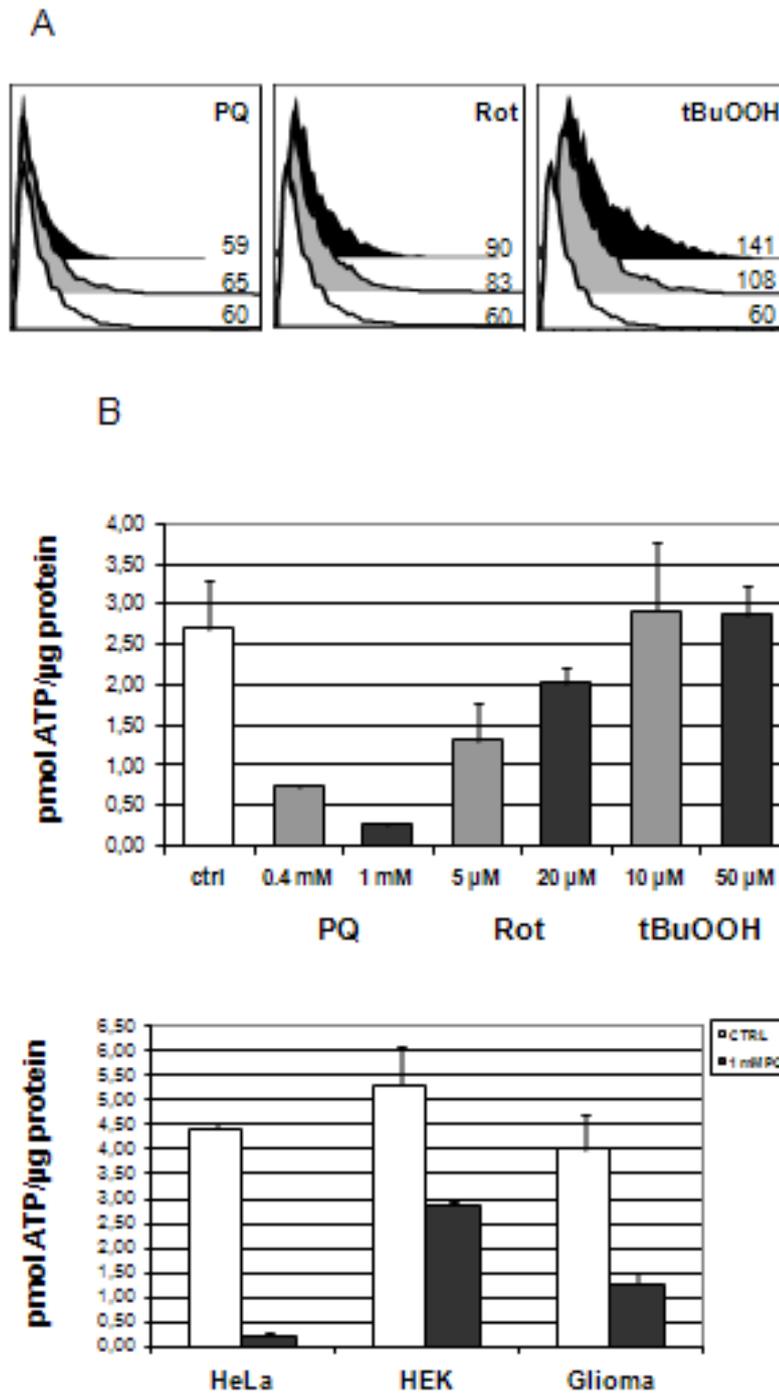
4.1 Il danno mitocondriale e la deplezione di ATP modulano lo splicing alternativo

Abbiamo cercato di capire come lo stress cellulare creato dal paraquat è trasmesso al macchinario dello splicing. Il paraquat è sia un generatore di radicali liberi che un inibitore del complesso I della catena respiratoria dei mitocondri. L'effetto più tardivo è sicuramente lo stress ossidativo ma potrebbero essere attivate anche altre vie di trasduzione del segnale e esserci una riduzione dell'ATP intracellulare (vedi introduzione). Per testare se lo stress ossidativo o il danneggiamento mitocondriale è la causa diretta dello switch osservato nello splicing alternativo, abbiamo comparato l'effetto del paraquat con altri due composti: il *tert*-butile idroperossido, che è un diretto produttore di ROS, e il rotenone che è un inibitore altamente specifico del complesso I (Degli Esposito, 1998). Come prima cosa abbiamo quantificato l'effetto di tutti e tre i composti sui livelli di ROS intracellulari prodotti: cellule di neuroblastoma umano sono state incubate per 4 h con 0,4 e 1 mM di paraquat, con 5 e 20 μ M di rotenone ((Higgins and Greenamyre 1996), e con 10 e 50 μ M di tBuOOH. Tempi di incubazione più lunghi danno risultati simili (dati non mostrati). Per rilevare i livelli di ROS le cellule sono trattate per 45 minuti con il derivato della fluoresceina H2DCFDA nella continua presenza del paraquat, rotenone e tBuOOH, rispettivamente. H2DCFDA diventa spontaneamente fluorescente dopo ossidazione e i livelli di ROS liberi intracellulari possono essere misurati mediante citofluorimetria. Il risultato è mostrato in fig. 5(a). Le cellule di controllo (riportate per poter confrontare in tutti e 3 i pannelli) mostrano una distribuzione statistica intorno al valore medio di 60 unità arbitrarie di fluorescenza, corrispondente al valore di background dei livelli di ROS in cellule non trattate. tBuOOH (10 e 50 μ M) sposta il picco a 108 e 141 unità di fluorescenza rispettivamente (pannello a destra), indicando l'aspettato aumento di ROS. Anche il rotenone aumenta il segnale della fluorescenza anche se in maniera meno estesa (83 e 90 unità, rispettivamente, pannello centrale). Il paraquat in queste condizioni non cambia in maniera significativa la concentrazione di ROS rispetto al controllo (pannello di sinistra). In seguito abbiamo misurato i livelli di ATP intracellulare. Le cellule sono state trattate per 24 h con gli stessi composti alle stesse concentrazioni di sopra, lisate, e le concentrazioni di ATP sono state

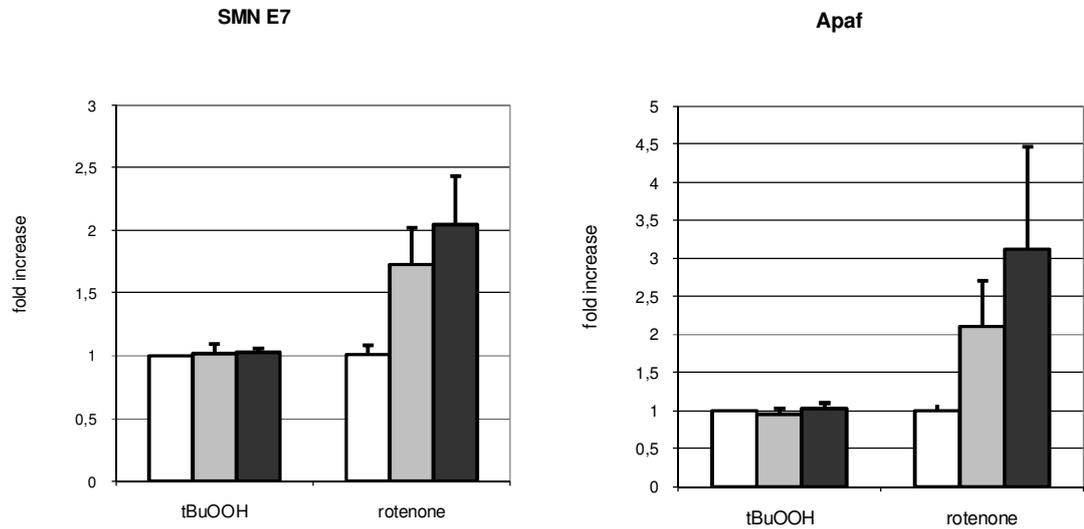
misurate in triplicato mediante un saggio enzimatico (vedi materiali e metodi). Il risultato è normalizzato per la quantità di proteine estratte. Come mostrato in figura 5(b), cellule di controllo contengono approssimativamente 2,7 pmol ATP/ug di proteine e il tBuOOH non cambia significativamente questo valore. Il rotenone (5 e 20 uM) riduce il valore di ATP a livelli fra 1.3 e 2.0 pmol/ug (la differenza fra le due concentrazioni di rotenone rientra nel margine dell'errore sperimentale). Il paraquat, infine, mostra una drammatica riduzione dei livelli di ATP intracellulare a meno di 0.3 pmol/ug alla concentrazione di 1 mM. Risulta interessante notare che anche le altre linee cellulari mostrano un decremento dei livelli di ATP intracellulari anche se con varie estensioni: nelle HeLa SS6 è severo quanto il neuroblastoma, nelle HEK293 e nel glioma U373 è meno pronunciato (fig.5(b) pannello in basso). Quindi riassumendo, tBuOOH aumenta i livelli di ROS nelle cellule, mentre il rotenone ha un effetto più debole e il paraquat un effetto nullo. Il paraquat e il rotenone ma non il perossido diminuiscono i livelli di ATP intracellulare. Questo è in linea con l'assunzione che sia il paraquat che il rotenone interferiscono con la catena di respirazione dei mitocondri, mentre il tBuOOH è una diretta fonte di ROS. Il fatto che il paraquat non rilascia livelli apprezzabili di ROS indica che probabilmente le cellule SH-5YSY sotto queste condizioni di crescita sono in grado di inattivare i ROS prodotti da questo composto. Infine confrontiamo l'effetto dei tre composti sullo splicing alternativo. Il rotenone, ma non il suo carrier dimetilsolfossido (DMSO), induce un significativo shift nella distribuzione delle isoforme di SMN ed Apaf1 (fig. 5(c), il controllo con il DMSO è riportato nel grafico come la barra bianca). Al contrario il tBuOOH a due differenti concentrazioni non causa cambiamenti nello splicing alternativo dei due pre-mRNA (fig.5c). In maniera simile il perossido d'ossigeno e la xantina/xantina ossidasi entrambi diretti generatori di ROS, non hanno effetto sullo splicing. Questo dimostra che non è lo stress ossidativo a causare il cambiamento osservato nei patterns di splicing, ma che questo correla piuttosto con un deficit di ATP intracellulare, suggerendo che il danneggiamento mitocondriale rilascia il suo effetto sul macchinario dello splicing attraverso la deplezione di energia. A supporto di questa affermazione abbiamo testato il 2,4 dinitrofenolo (DNP), una sostanza che scoppia la catena respiratoria mitocondriale con la produzione di ATP. Come mostrato in figura 5(d) il DNP disturba lo splicing in maniera dose dipendente, con un effetto paragonabile a quello del paraquat e del

rotenone. Quindi concludiamo che una delle varie conseguenze del danneggiamento mitocondriale, la deplezione di ATP, causa cambiamenti nel macchinario di splicing.

Fig. 5



C



D

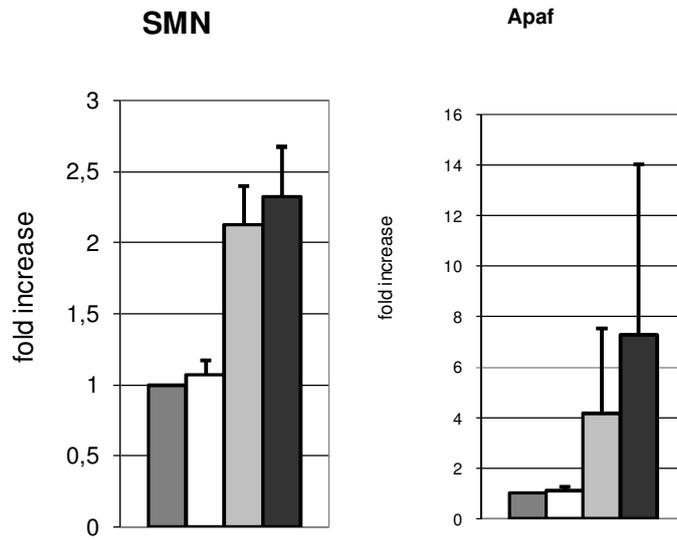


Fig. 5 La deplezione di energia causa cambiamenti nello splicing alternativo. (a) Livelli di ROS indotti in cellule di neuroblastoma SH-5YSY. Le cellule sono trattate per 4 h con 0.4 e 1 mM di paraquat (pannello di sinistra), con 5 e 20 uM di rotenone (pannello al centro), o 10 e 50 uM di tButOOH (pannello a destra). Poi è stata aggiunta H₂DCFDA e l'incubazione è continuata per ulteriori 45 minuti prima di analizzare le cellule al citofluorimetro. Ciascun pannello mostra l'intensità della fluorescenza (in scala lineare) sull'asse delle x, e il numero delle cellule sull'asse delle y. Le tre curve in ciascun pannello rappresentano: in alto, la curva in nero, rappresenta la concentrazione più alta di ciascun composto, la curva al centro in grigio, le concentrazioni più basse, la curva in basso in bianco il controllo. (b, in alto), livelli di ATP in cellule di neuroblastoma SH-5YSY trattate. Le cellule sono da sinistra a destra, trattate con mock, o con 0,4 e 1 mM di paraquat, 5 e 20 uM di rotenone, o 10 e 50 uM di *tert*-butile idrossiperoxide per 24 h. Le cellule sono state lisate e l'estratto è stato saggiato in triplicato. È mostrato il contenuto di ATP (pmol ATP/ug di proteine totali) per le cellule di controllo (barra bianca), e per cellule trattate (b, in basso). Livelli di ATP in cellule non neuronali. Cellule HeLa, HEK293 o glioma U373 sono trattate con mock o con 1 mM di paraquat per 24 h. ATP (pmol ATP/ug proteine totali) è rappresentato dalla barra bianca per il controllo e da quella nera per le cellule trattate. (c) Il rotenone ma non il *tert*-butile cambia lo splicing alternativo. Le cellule sono trattate per 24 h con 10 e 50 uM di t-BuOOH (barre grigie e nere nel primo e terzo gruppo) o 5 e 20 uM di Rotenone (barre grigie e nere nel secondo e quarto gruppo). L'abbondanza dell'isoforma piccola di SMN DE7 (metà di sinistra) e di Apaf DE18 (metà di destra) è determinata e quantificata come spiegato precedentemente. I risultati sono normalizzati per l'abbondanza delle relative isoforme in cellule trattate con mock (barra bianca nel gruppo del t-BuOOH). Le barre bianche nel gruppo del rotenone indicano i cambiamenti dello splicing indotti dal DMSO, il carrier del rotenone. (d) 2,4 dinitrofenolo cambia lo splicing alternativo. Le cellule sono trattate con mock (barre grigio scuro) o trattate con 2% di metanolo, il carrier del DNP e con 100 uM DNP (barre grigio chiaro) o 200 uM DNP (barre bianche). L'abbondanza dell'isoforma più piccola di SMN DE7 (sinistra) e di Apaf DE18 (destra) è determinata e quantizzata come descritto precedentemente. La barra di errore indica la deviazione standard.

4.2 Il calcio è coinvolto nella via di trasduzione del segnale che modula lo splicing alternativo

Per capire quale sia la cascata del segnale coinvolta nei cambiamenti dell'equilibrio fra le diverse isoforme degli mRNAs indotte da deplezione di energia causate da un danno mitocondriale, le cellule sono state trattate con diversi inibitori per verificare se uno di questi fosse in grado di annullare l'effetto causato dal paraquat.

Un primo candidato per la cascata del segnale coinvolta nello splicing alternativo è il pathway di p38 MAPK, perché è stato dimostrato essere attivo nella neuro degenerazione e di influenzare la proteina hnRNP A1 (Patel NA, *et al.*, 2005).

Come mostrato in figura 6 le cellule sono state trattate con inibitori per: p38 (SB203580), ERK(U0126) e jnk (SP600125), incubate con 0 e 1 mM di paraquat con e senza l'inibitore per 24 h. Le cellule sono state raccolte, è stato estratto l'RNA e le regioni di interesse per Apaf1 ed SMN sono state evidenziate mediante RT-PCR. In figura 6 è riportato l'incremento dell'isoforma alternativa prima e dopo trattamento con paraquat con e senza inibitore per SMN(a) e Apaf1 (b). Le bande sono state quantizzate come

descritto precedentemente. Come risulta evidente nessuno dei tre inibitori usati è stato in grado di neutralizzare l'effetto del paraquat.

Fig. 6

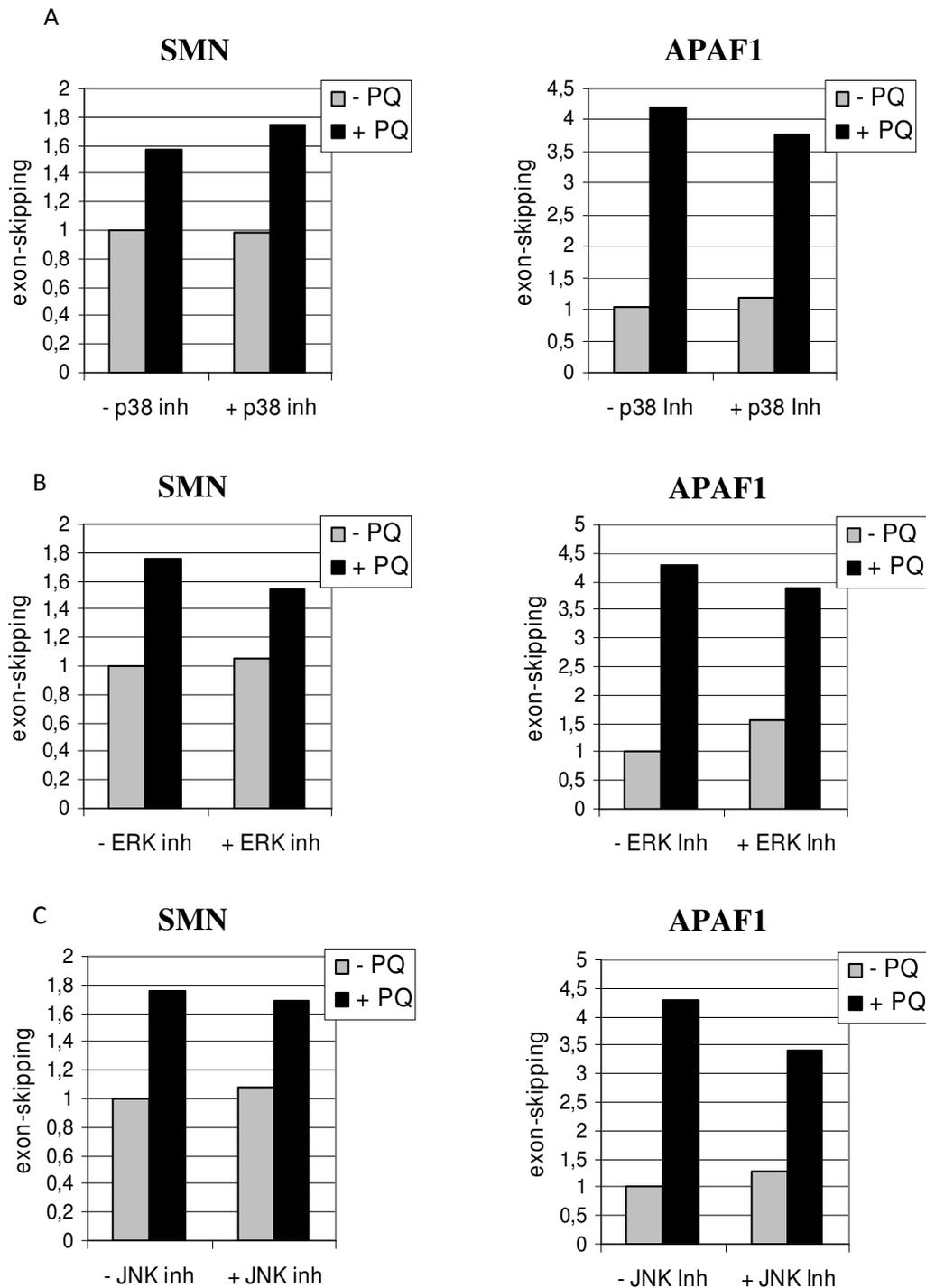
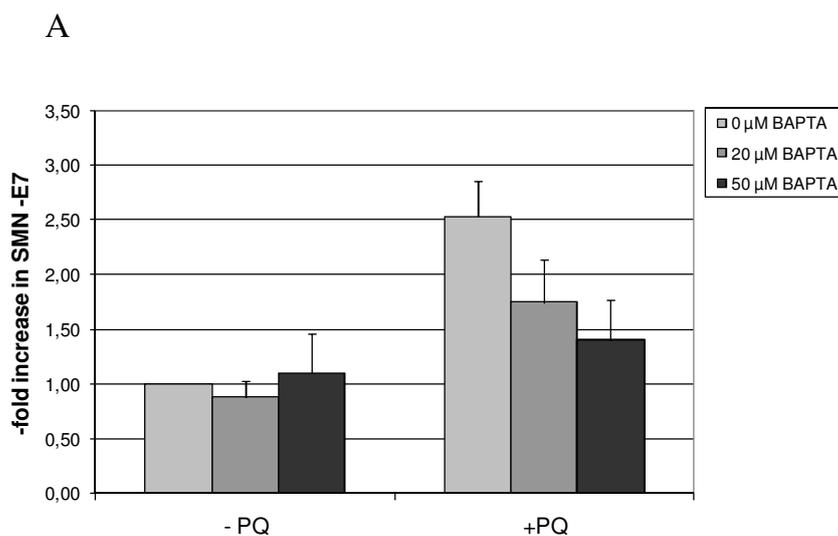


Fig. 6 Gli inibitori per p38, ERK e JNK non annullano l'effetto del paraquat. (a) Cellule di neuroblastoma umano sono trattate per 24 h con 0 (barre grigie) e 1 mM di paraquat (barre nere) in presenza (parte sinistra del grafico) o in assenza (parte destra del grafico) dell'inibitore di p38. Le regioni di interesse per SMN ed Apaf1 sono state amplificate mediante RT-PCR e quantificate come descritto precedentemente. (b) Come (a) ma utilizzando l'inibitore per le ERK. (c) come (a) ma utilizzando l'inibitore per JNK.

In condizioni fisiologiche, lo splicing alternativo di molti geni è regolato da proteine chinasi calcio/calmodulina dipendenti, per questo motivo abbiamo ipotizzato che il calcio potrebbe essere coinvolto. Per verificare questa ipotesi abbiamo trattato le cellule con il BAPTA-AM, un agente in grado di chelare il calcio intracellulare e di conseguenza annullare eventuali aumenti della concentrazione di calcio all'interno della cellula. Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY sono state trattate con 20 e 50 μM di BAPTA-AM in presenza di 0 e 1 mM di paraquat per 24 h. Le regioni di interesse per Apaf1 ed SMN sono state amplificate mediante RT-PCR e le bande quantizzate come descritto precedentemente. In figura 7 è riportato nella parte destra del grafico l'aumento dell'isoforma alternativa di SMN mancante dell'esone 7 per cellule trattate con 0 (barre grigio chiaro), 20 (barre grigio scuro) e 50 (barre nere) μM di BAPTA-AM in assenza di paraquat (parte sinistra del grafico), o in presenza di paraquat (parte destra del grafico). Come risulta evidente dalla figura il BAPTA-AM è in grado di abbassare notevolmente l'effetto del paraquat. Infatti, per SMN, l'aumento dell'isoforma alternativa dopo trattamento con paraquat è di circa 2,5 volte e diventa di circa 1,3 volte in presenza di paraquat e 50 μM di BAPTA-AM, mentre per Apaf1 l'aumento di circa 3,5 volte osservato in presenza di solo paraquat si abbassa a circa 1,2 in presenza del paraquat e di 50 μM di BAPTA-AM..

Fig. 7



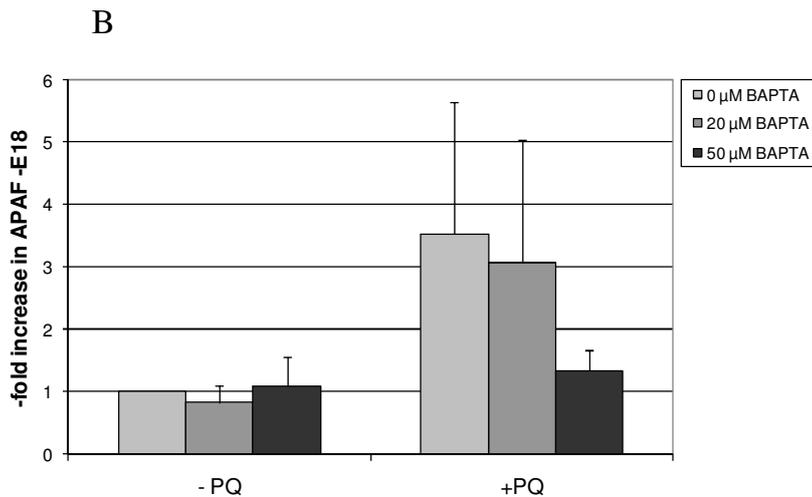


Fig. 7 Il BAPTA-AM annulla l'effetto del paraquat. Cellule di neuroblastoma umano sono trattate con 0, 20 e 50 μ M di BAPTA-AM in assenza o in presenza di 1 mM di paraquat. Le regioni di interesse per SMN e Apaf1 sono state amplificate e quantizzate come descritto precedentemente. La barra di errore rappresenta la deviazione standard per tre esperimenti indipendenti.

Visto che abbiamo dimostrato il coinvolgimento del calcio nella via di trasduzione del segnale che porta al cambiamento dello splicing in seguito al trattamento con la neurotossina paraquat, il passo successivo è stato quello di vedere se le principali chinasi calcio dipendenti presenti nella cellula, ossia le chinasi calcio-calmodulina dipendenti (CamK) siano coinvolte. Per verificare il coinvolgimento delle CamK abbiamo usato la sostanza KN93, che è un potente inibitore delle CamK con particolare affinità per la CamK II. Come mostrato in figura 8, le cellule di neuroblastoma umano sono state trattate con 0 (barre grigio chiaro), 10 (barre grigio scuro) e 30 (barre nere) μ M di KN93 in presenza di 0 (parte sinistra del grafico) o 1 mM di paraquat (parte destra del grafico). I geni analizzati sono, nuovamente, SMN ed Apaf1 e le regioni di interesse di questi geni sono state amplificate e quantizzate come descritto precedentemente. Come risulta evidente in fig. 8 l'inibizione delle CamK non è in grado di sopprimere l'effetto del paraquat, ma al contrario l'inibizione delle CamK sembra avere lo stesso effetto del paraquat. Infatti anche in assenza di trattamento con paraquat l'inibizione delle CamK provoca un aumento delle isoforme alternative di Apaf1 ed SMN.

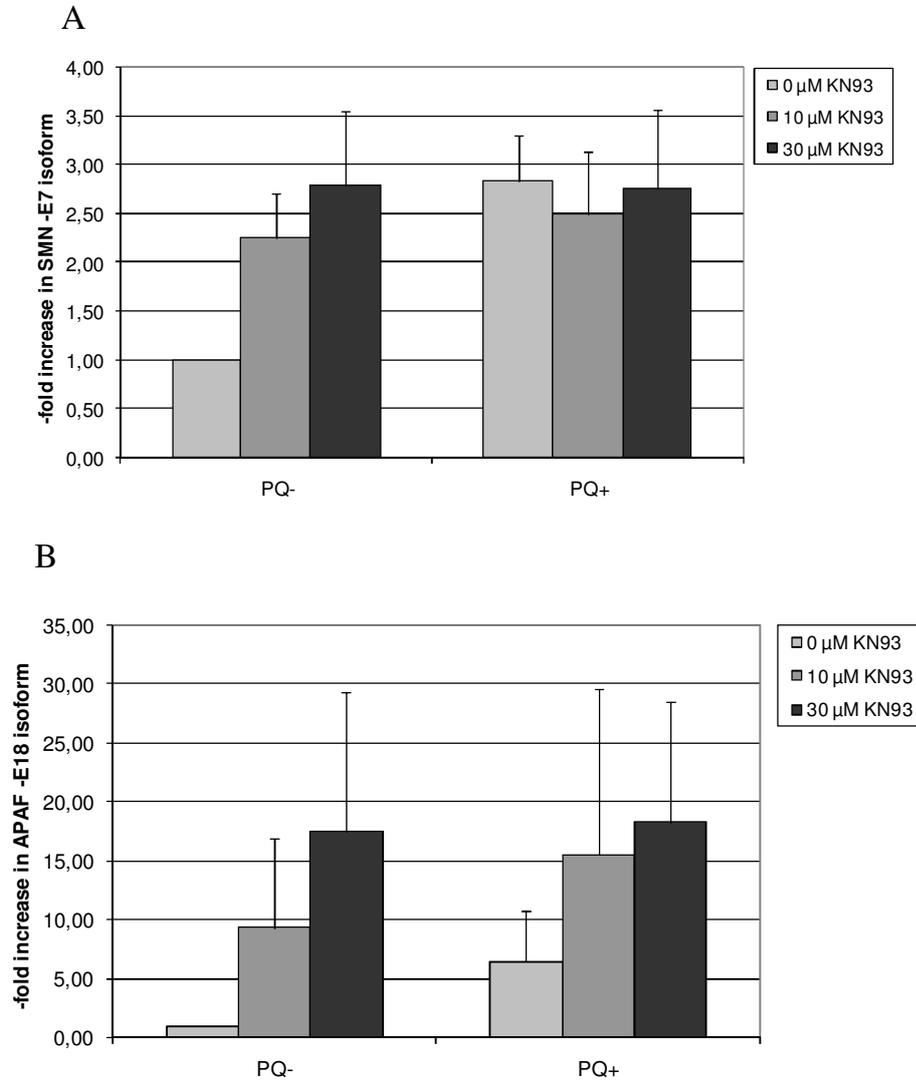
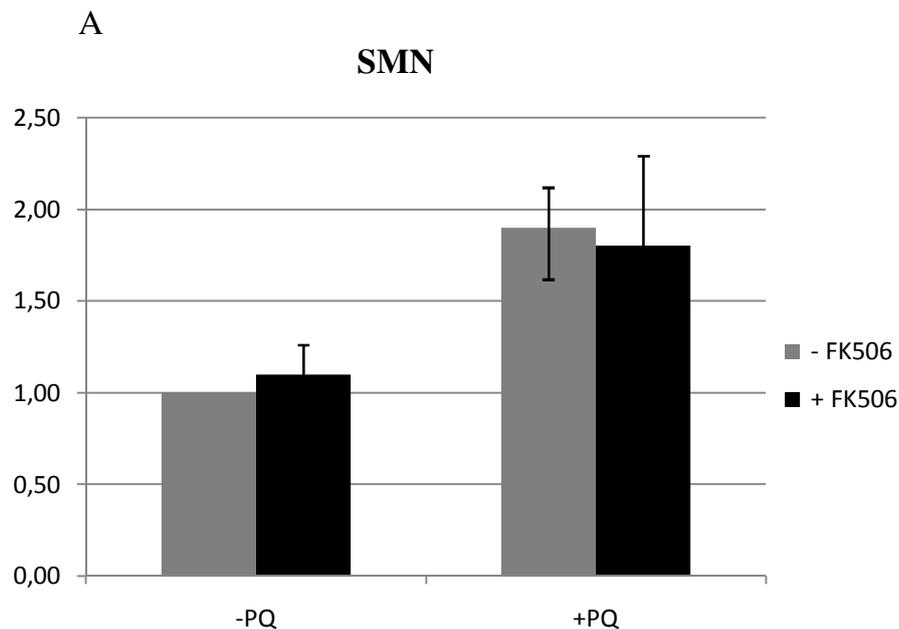
Fig. 8

Fig. 8 Il KN93 non inverte l'effetto del paraquat. Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY, sono trattate con 0, 10 e 30 μM di BAPTA-AM in assenza o in presenza di 1 mM di paraquat. Le regioni di interesse per SMN e Apaf1 sono state amplificate e quantizzate come descritto precedentemente. La barra di errore rappresenta la deviazione standard per tre esperimenti indipendenti.

Abbiamo allora cercato di capire se fosse invece coinvolta la calcineurina, una fosfatasi calcio dipendente, utilizzando un inibitore di questa fosfatasi: l'FK506. Come descritto precedentemente per gli altri inibitori le cellule di neuroblastoma umano sono state trattate con 100 uM di FK506 in presenza o assenza di 1 mM di paraquat. Le cellule sono state raccolte, estratto l'RNA e le regioni di interesse per Apaf1 ed SMN sono state amplificate e quantizzate come descritto in precedenza. Come risulta evidente dalla figura 9 neanche l'FK506 è in grado di annullare l'effetto del paraquat.

In conclusione, il calcio è sicuramente coinvolto nella via di trasduzione del segnale che dallo stress cellulare prodotto dal paraquat porta al cambiamento dello splicing alternativo, ma questi dati non sono ancora conclusivi, rimane, infatti, da investigare quale siano gli intermediari di questo processo (vedi discussione).

Fig. 9

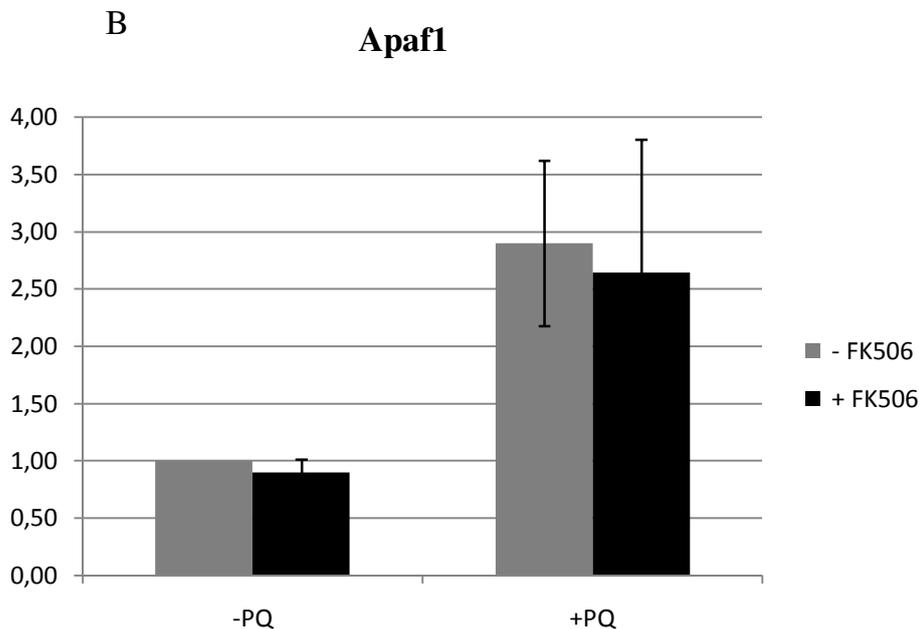


Fig. 9 L'FK506 non inverte l'effetto del paraquat. Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY. sono trattate con 0 e 100 uM di FK506 in assenza o in presenza di 1 mM di paraquat. Le regioni di interesse per SMN e Apaf1 sono state amplificate e quantizzate come descritto precedentemente. La barra di errore rappresenta la deviazione standard per 3 esperimenti indipendenti.

5. Cambiamenti dei fattori di splicing

5.1 Il cambiamento dello splicing non richiede sintesi di proteine ex novo

Il passo successivo è stato quello di cercare di capire quale fosse la via di trasduzione del segnale coinvolta nel cambiamento dello splicing alternativo che abbiamo osservato. La maggior parte delle isoforme studiate è prodotta mediante salto dell'esone. Gli esoni sono riconosciuti al loro sito donatore ed accettore di splicing, inoltre l'inclusione dell'esone nel messaggero nascente è aumentata dalla presenza di sequenze cis-agenti. Il salto dell'esone indica, quindi, che i siti di splicing e/o sequenze cis agenti non sono riconosciute e di conseguenza o che i fattori di splicing positivi sono down-regolati o che i negativi sono up-regolati. Dall'osservazione che l'effetto del paraquat richiede diverse ore per manifestarsi si potrebbe speculare che regolatori negativi vengano sintetizzati de novo.

Quindi, poiché vediamo un effetto del paraquat solo dopo diverse ore abbiamo ipotizzato che il cambiamento nei patterns di splicing che osserviamo richiede sintesi ex-novo di proteine. Per verificare questa ipotesi le cellule di neuroblastoma sono state incubate per 24 h sia con il paraquat che con 25 o 50 ug/mL di cycloheximide (CHX), un inibitore della traduzione. Come controllo le stesse concentrazioni di CHX sono state usate senza paraquat. Come esperimento preliminare dimostriamo che quando le cellule sono incubate sia con paraquat che con CHX la mortalità aumenta del 15-20% (dati non mostrati), quindi per non estremizzare troppo le condizioni abbiamo scelto come concentrazione finale del paraquat 0,4 mM. In questo esperimento monitoriamo l'isoforma di SMN mancante dell'esone 5 e dell'esone 7. Come mostrato in figura 10(a), le isoforme alternative sono di nuovo più visibili in cellule trattate con il paraquat (corsie 2, 4 e 6) rispetto ai controlli (corsie 1,3 e 5). La quantificazione dimostra che aumentando la concentrazione di CHX il gap fra cellule di controllo e cellule trattate diminuisce per le isoforme di SMN mancanti sia dell'esone 5 che del 7 – entrambe sono aumentate di circa il 200% senza CHX e di circa il 50% a 50 ug/mL di CHX. Di nuovo, perfino alla più alta concentrazione di CHX c'è un significativo cambiamento nello splicing alternativo di SMN indotto dal paraquat. CHX (50 ug/mL) è più che sufficiente a inibire la traduzione in cellule di mammifero in coltura e sembra avere, a queste concentrazioni, secondari effetti sul macchinario dello splicing, come l'incremento delle isoforme mancanti dell'esone alternativo perfino in assenza di paraquat. Concludiamo che la CHX non inibisce completamente il cambiamento nello splicing alternativo, indicando che almeno in parte la risposta è trasmessa senza sintesi di proteine ex novo ma potrebbe essere trasmessa piuttosto attraverso modificazioni post-traduzionali.

Fig. 10

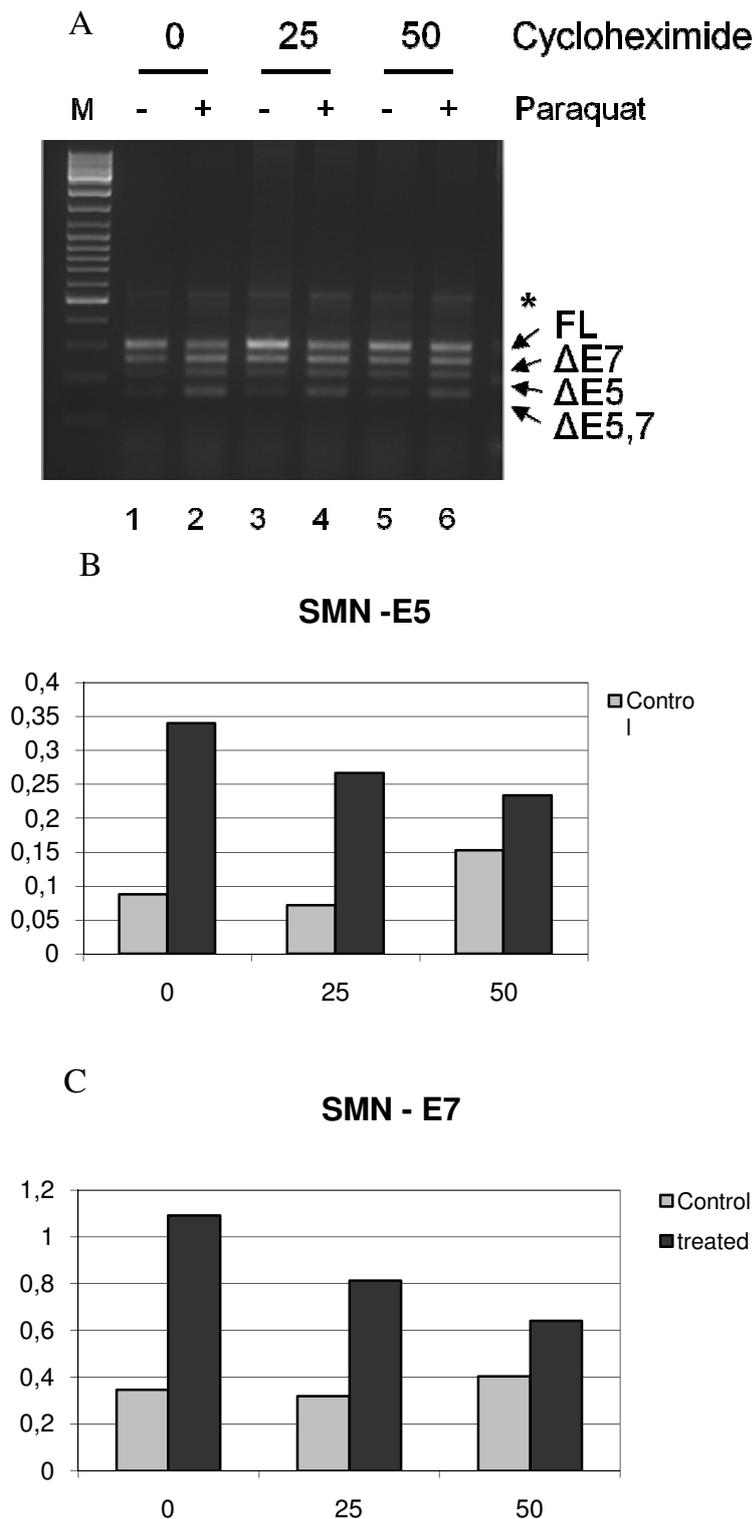


Fig. 10 La Cycloheximide non annulla completamente il cambiamento indotto dal paraquat. (a) Le cellule di neuroblastoma sono incubate con (corsie 2, 4 e 6) o senza (corsie 1, 3 e 5) 0,4 mM di paraquat per 24 h. Inoltre 0 (corsia 1 e 2), 25 ug/mL (corsie 3 e 4) o 50 ug/mL (corsie 5 e 6) cycloheximide sono aggiunti insieme al paraquat. La regione soggetta a splicing alternativo di SMN è stata amplificata ed è mostrata in fig. 1. L'asterisco indica un prodotto minore di SMN non specifico. (b) Quantificazione dei risultati. Le bande sono quantificate e normalizzate rispetto alla banda che rappresenta l'isoforma full-length. Il pannello in alto rappresenta la quantità relativa dell'isoforma mancante dell'esone 5 nel controllo (barre grigie) e nelle cellule trattate (barre nere). Il pannello in basso rappresenta lo stesso per l'isoforma mancante dell'esone 7.

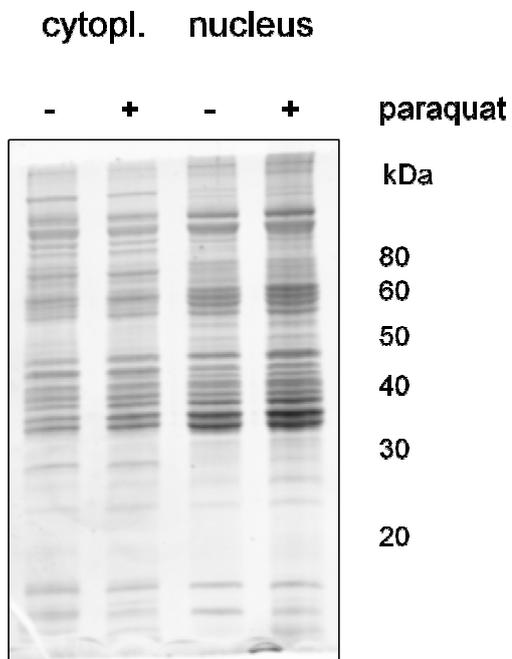
5.2 Le proteine hnRNPs non sono coinvolte

Dei potenziali regolatori dello splicing alternativo tutte le proteine SR e almeno alcune delle proteine hnRNP sono fosforilate. Nel caso delle proteine SR i residui in serina nei domini serine/arginine rich (domini SR) sono altamente modificati e queste modificazioni sono cruciali per la loro funzione come attivatori dello splicing (Gravely, 2000). Inoltre almeno alcune delle proteine hnRNPs sono regolate da fosforilazione. Quindi abbiamo cercato di verificare se ci fosse un cambiamento nello stato di fosforilazione di queste famiglie di proteine dopo trattamento con il paraquat. La prima famiglia di proteine analizzate è stata quella delle hnRNP.

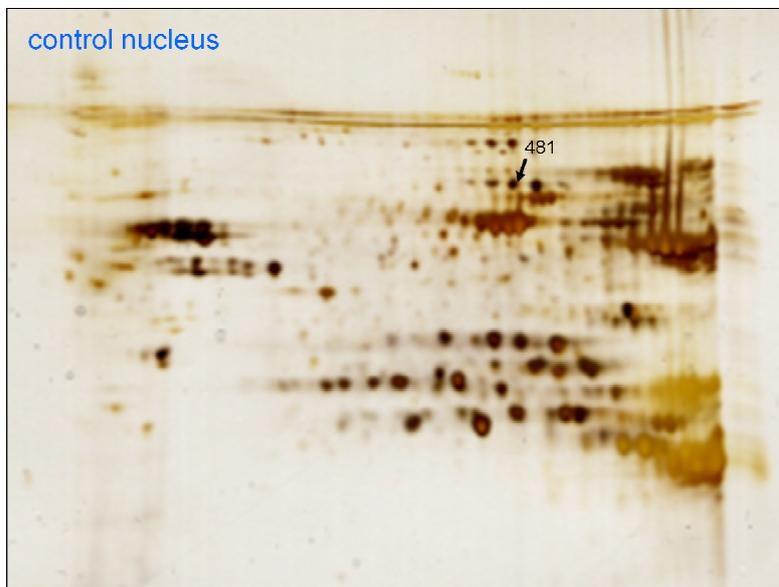
Le cellule sono state trattate con 0 e 1 mM di paraquat per 24 h, lisate e sono stati preparati estratti citoplasmatici e nucleari (come descritto in materiali e metodi). Gli estratti sono stati successivamente digeriti con la nucleasi micrococcica, per distruggere i complessi RNP e liberare le proteine hnRNPs, e caricati su una colonnina di DNAss-agarose. Le proteine hnRNP hanno diversi motivi di legame all'RNA e di conseguenza legano anche il DNA a singolo filamento. Le proteine sono poi eluite con 4 M di urea e 1/5 di queste frazioni è corsa su un gel al 10% di acrilamide e rilevate mediante colorazione con sypro ruby. Come mostrato in figura 11(A), il gel a 1D non vede cambiamenti allora 2D in questo modo gli estratti sono stati fortemente arricchiti in proteine hnRNPs. La maggior parte degli estratti così purificati è stato successivamente corso su un gel a due dimensioni e gli spot più significativi tagliati e analizzati mediante spettrometria di massa (collaborazione gruppo Giorgio Federici/Andrea Urbani). La maggior parte degli spot analizzati rappresenta proteine hnRNPs e come è rappresentato in fig.11(B) la maggior parte delle proteine hnRNPs non cambia in seguito a trattamento con paraquat. Uno dei spot che presenta cambiamenti (indicato con la freccia) è in realtà un artefatto, infatti il sequenziamento di questo spot ha indicato che corrisponde all'albumina. L'unica proteina che mostra un cambiamento fra cellule trattate e non è la proteina hnRNP K come indicato in figura (regione cerchiata in rosso). Questa proteina non ha però un ruolo ben conosciuto nello splicing, ma è più che altro coinvolta nella traduzione. Questi dati suggeriscono quindi che la famiglia delle hnRNPs contribuisce poco al cambio nello splicing alternativo osservato.

Fig. 11

A



B



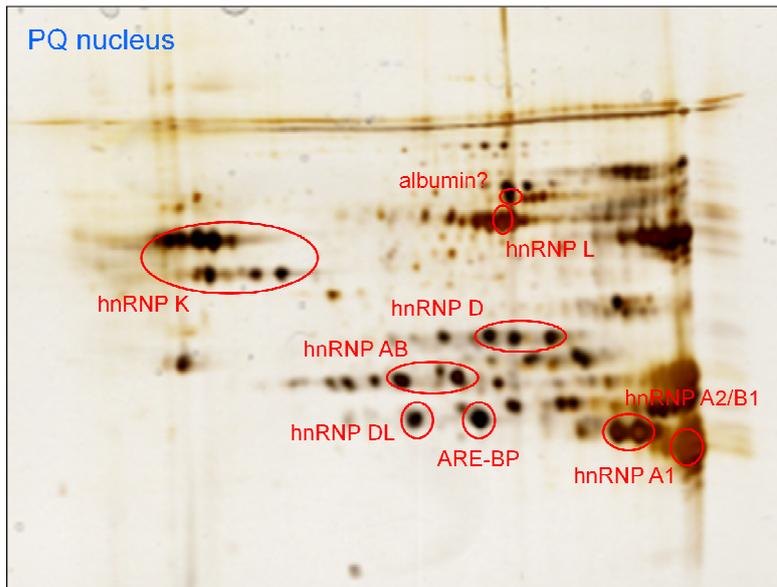


Fig.11 Le proteine hnRNPs cambiano poco dopo trattamento con paraquat. Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY sono trattate con 0 e 1 mM di paraquat per 24h, lisate e sono state estratte proteine citoplasmatiche e nucleari. Dopo digestione degli estratti proteici con nucleasi micrococcica, le proteine hnRNPs sono state purificate mediante cromatografia con biglie di DNAss. 1/5 delle frazione eluite sono corse su un gel al 10% di acrilamide e rivelate mediante colorazione con sypro ruby(A). Il restante è corso su un gel a 2D (B).

5.3 Le proteine SR sono down regolate

Visto che le proteine hnRNPs non sono coinvolte, abbiamo analizzato l'altra famiglia coinvolta nella selezione dei siti di splicing: le proteine SR.

Come descritto precedentemente per le proteine hnRNPs le cellule di neuroblastoma umano sono state trattate per 24h con 0 e 1 mM di paraquat, lisate e sono stati preparati estratti citoplasmatici e nucleari. La maggior parte delle proteine SR hanno un peso da 20 e 40 KDa, ci sono bande arricchite in questa zona nel controllo ma non nel trattato e così risulta evidente che la purificazione non riesce in cellule trattate. La purificazione delle proteine SR avviene attraverso una doppia precipitazione con 60-90% di solfato di ammonio seguita da una precipitazione con 20 mM di MgCl₂ in seguito alla quale la maggior parte delle proteine SR precipitano. 1/5 di tutte le proteine SR estratte sono corse su un gel di acrilamide al 10% e le proteine evidenziate mediante colorazione con Sypro Ruby. Come risulta evidente in figura 12, la precipitazione di questa famiglia di proteine non riesce molto bene in cellule trattate. La spiegazione potrebbe essere che le proteine SR siano down-regolate in seguito a trattamento

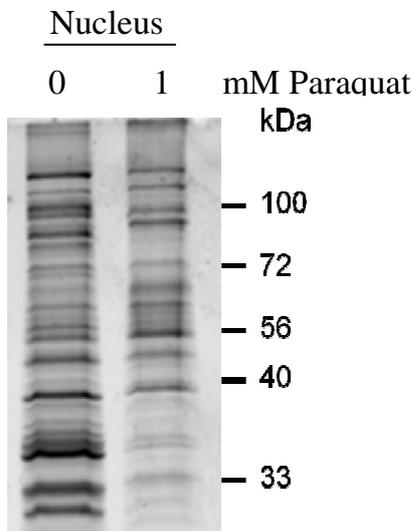
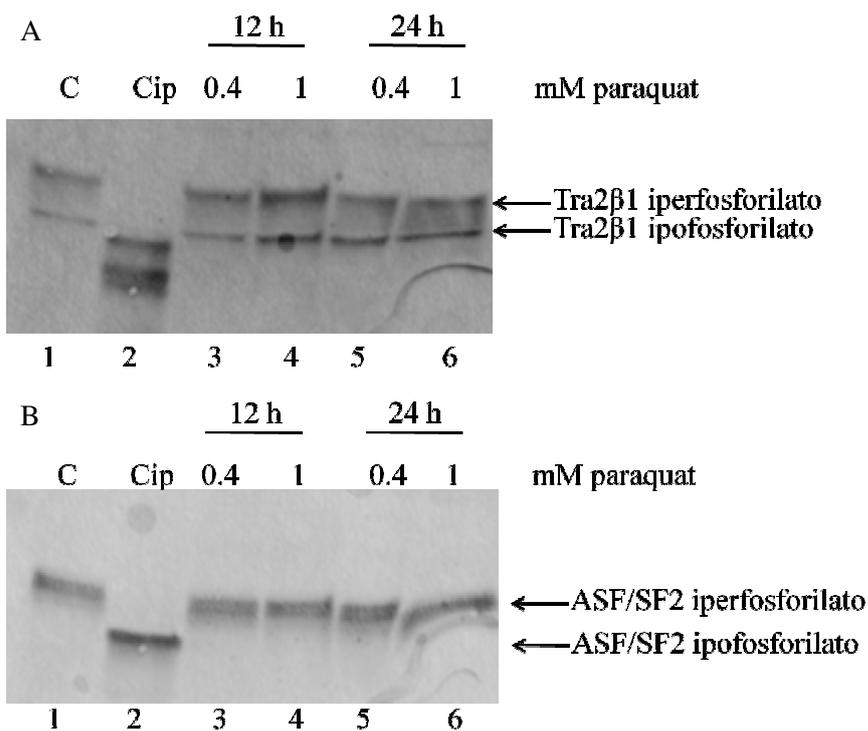
Fig.12

Fig.12 Le proteine SR non precipitano bene in cellule trattate con paraquat. Cellule di neuroblastoma umano SH-5YSY sono trattate con 0 e 1 mM di paraquat per 24h, lisate e sono state estratte proteine citoplasmatiche e nucleari. Dopo digestione degli estratti proteici con nucleasi micrococcica, le proteine SR sono purificate mediante una doppia precipitazione con 60-90% di solfato di ammonio seguita da una precipitazione con 20 mM di MgCl₂.

Vista la difficoltà a purificare le proteine SR da cellule trattate, abbiamo analizzato mediante Western Blot due particolari proteine SR, Tra2- β 1 e ASF/SF2, che sono coinvolte in vari eventi di splicing alternativo. Per verificare se queste proteine sono down regolate dopo trattamento con paraquat, cellule di neuroblastoma umano sono trattate con 0, 0,4 e 1 mM di paraquat per 12 e 24 h, lisate e sono stati preparati estratti citoplasmatici e nucleari. 10 μ g di estratti nucleari sono caricati su un gel a gradiente di acrilamide 8-16%, che permette, almeno per la proteina Tra2- β 1, di distinguere fra la forma iperfosforilata e ipofosforilata. Come controllo, per verificare lo stato di fosforilazione delle isoforme osservate, 10 μ g di proteine estratte da cellule di controllo sono trattate con la fosfatasi CIP. In figura 13A è mostrato il risultato per Tra2- β 1, si osservano due bande la più alta corrisponde alla forma iperfosforilata, la più bassa alla forma ipofosforilata, come dimostrato dal controllo trattato con la CIP (corsia 2), in cui è presente solo la forma ipofosforilata e una ulteriore isoforma probabilmente corrispondente a Tra2- β 1 completamente defosforilato. In figura 13B è riportato il risultato per ASF/SF2, in questo caso è presente una unica banda corrispondente alla

forma iperfosforilata, come di mostrato dal controllo trattato con la fosfatasi CIP, in cui invece è presente solo la forma defosforilata. In figura 13C è mostrato il risultato per la proteina hnRNPA2B1, che non mostra significativi cambiamenti fra cellule trattate ed è stata usata per normalizzare i valori di Tra2- β 1 ed ASF/SF2. In entrambi i casi non sono evidenziabili significativi cambiamenti fra cellule di controllo (corsia1) e cellule trattate con 0,4 e 1 mM di paraquat (corsie 3, 4,5,6), sia a 12 (corsie 3, 4) che a 24 h (corsie 5, 6). Quindi concludiamo che queste due proteine SR non sono coinvolte nel cambiamento dei patterns di splicing osservato quando le cellule sono trattate con la neurotossina paraquat, o che se ci sia un cambiamento nel loro stato di fosforilazione non è possibile metterlo in evidenza mediante western blot.

Fig. 13



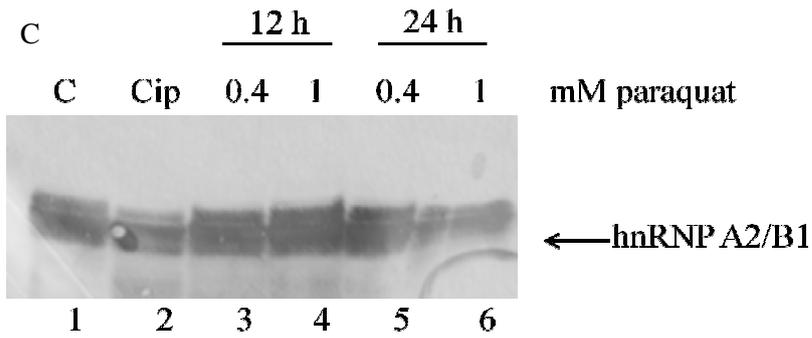


Fig.13 Le proteine Tra2- β 1 ed ASF/SF2 non sembrano essere down regolate dopo trattamento con paraquat. Cellule di neuroblastoma umano sono trattate con 0, 0,4 e 1 mM di paraquat (corsie 3, 4, 5, 6) per 12 (corsie 2, 3) e 24 h (corsie 5, 6). Sono state estratte le proteine nucleari e 10 μ g di proteine totali sono state caricate su un gel a concentrazione crescente di acrilamide 8-16%. Le proteine di interesse Tra2- β 1 (A), ASF/SF2 (B), hnRNP A2/B1 sono state riconosciute mediante un anticorpo specifico dopo aver blottato le proteine su una membrana di nitrocellulosa.

DISCUSSIONE

In questi studi abbiamo dimostrato che il paraquat, un composto usato per creare un modello di malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer e la SLA, cambia il patterns di splicing di molti mRNAs. Lo splicing non è, comunque, generalmente compromesso: a causa di come sono stati disegnati gli oligo della PCR, i nostri saggi di RT-PCR hanno monitorato anche diversi esoni costitutivi prossimi a quelli alternativi (SMN esone 6, hLSm1 esone 2, hSIP1 esone 2 e 3, enolasi 2 esone 3 e 4, hnRNP A2/B1 murina esone 7) e un set di siti che sono riportati alternativi in altre cellule ma apparentemente sono costitutivi nelle cellule di neuroblastoma SH-5YSY (PTB, Bcl-x, Bcl-2A1). Questi esoni sono anche costitutivamente inclusi dopo trattamento con il paraquat. Infatti i nostri dati suggeriscono un possibile legame fra l'abbondanza dell'isoforma alternativa prima del trattamento con paraquat e il suo incremento in seguito al trattamento (tabella 2). Infatti le isoforme alternative dei geni SIP1 e hLSm1 sono difficilmente evidenziabili nel controllo e non cambiano significativamente. L'isoforma minore di Apaf1 al contrario è rilevabile facilmente nel controllo e diventa l'isoforma maggiore dopo trattamento. Mentre sarebbe necessario analizzare molti più mRNAs per avere conferma di una correlazione lineare, possiamo concludere dai nostri dati che il danneggiamento mitocondriale causato dal paraquat causa un cambiamento diffuso nell'equilibrio fra le isoforme degli mRNAs, il che per la prima volta mostra che questo tipo di stress modula il pre-mRNA splicing in maniera generale.

Paragonando diverse linee cellulari abbiamo visto che linee di origine neuronale sono più suscettibili di altre linee cellulari al cambiamento nello splicing alternativo indotto dal paraquat. Il paraquat danneggia le cellule attraverso la produzione di stress ossidativo e il danneggiamento mitocondriale. Sia lo stress ossidativo che il danneggiamento mitocondriale rappresentano dei markers della degenerazione dei neuroni in malattie quali Parkinson, Alzheimer e SLA. Lo stress ossidativo e il malfunzionamento dei mitocondri genera un circolo vizioso, ed è spesso difficile determinare quale sia la causa principale del danneggiamento. Qui, abbiamo dimostrato che i cambiamenti osservati nello splicing alternativo possono essere attribuiti alla disfunzione dei mitocondri e non alla presenza di ROS: il rotenone, un selettivo inibitore del complesso I dei mitocondri, usato inoltre per creare dei modelli murini di Parkinson, ha lo stesso effetto sullo splicing del paraquat mentre il perossido che genera ROS senza danneggiare i mitocondri non ha

lo stesso effetto. I cambiamenti nello splicing sembrano quindi correlati con la deplezione di ATP suggerendo che una deplezione di energia potrebbe portare all'attivazione di segnali che alterano lo splicing. Questa osservazione è fortemente supportata dal fatto che il DNP, che specificatamente inibisce la sintesi di ATP da parte dei mitocondri, ha un effetto simile al paraquat sullo splicing.

Non tutte le linee cellulari testate reagiscono al paraquat con lo stesso calo di ATP. Le cellule HeLa mostrano un drastico calo di ATP intracellulare quando esposte al paraquat, ma lo splicing non subisce modificazioni evidenti. Inoltre l'effetto del rotenone indica che già una piccola deplezione di ATP è sufficiente a creare un cambiamento nello splicing del neuroblastoma, mentre un simile decremento in cellule HEK e nel glioma non ha lo stesso effetto. Perciò il pre-mRNA splicing sembra essere più sensibile alla deplezione di ATP nelle cellule di neuroblastoma, di conseguenza la via di trasduzione del segnale che dallo stress cellulare porta all'attivazione dei fattori di splicing è più facilmente attivata in queste linee cellulari. Quindi è molto probabile che negli organismi viventi, i neuroni sono più suscettibili a questo cambio.

I diffusi cambiamenti potrebbero avere un importante impatto sulle funzioni e sulla sopravvivenza della cellula, perché potrebbero distruggere il naturale equilibrio delle cellule nervose e di conseguenza contribuire alla morte cellulare. Lo splicing alternativo frequentemente altera la capacità codificante di un mRNA, il che può modificare l'attività della proteina codificata, alcune volte cambiando perfino la sua funzione. Questo può essere chiaramente esemplificato da due mRNA che mostrano cambiamenti nei nostri studi: SMN ed Apaf1. Apaf1 ha un ruolo chiave nel rilascio del segnale apoptotico dal mitocondrio all'attivazione della cascata delle proteasi caspasi. Il C-terminale di Apaf1 contiene domini WD40, domini di interazione proteina-proteina, che interagiscono sia con l'N-terminale che con il segnale pro-apoptotico, il citocromo c. L'interazione interna inibisce l'attività apoptotica di Apaf1 dell'N-terminale che è rilasciato dopo legame al citocromo c. Perciò i domini WD40 sono di cruciale importanza per l'attività pro-apoptotica di Apaf1. L'esone 18 codifica esattamente per un dominio WD40 all'inizio della regione costituita da ripetizione di domini WD40 e perciò l'isoforma mancante dell'esone 18 potrebbe avere un comportamento diverso nell'apoptosi. Il fatto che lo stress ossidativo causa una disregolazione di Apaf1 è in linea con la nozione generale che

l'attivazione inappropriata di questi pathway gioca un ruolo centrale in almeno tre malattie neurodegenerative, il Parkinson (Yang et al. 2004), l'Alzheimer (Ivins et al. 1999; Troy et al. 2000) e la SLA (Friedlander 2003; Guegan and Przedborski 2003) e con evidenze che Apaf1 gioca un ruolo centrale nella morte cellulare indotta in cellule neuronali da due differenti tipi di stimoli tipici di malattie neurodegenerative, quali il trattamento con il peptide AB1-42 (un modello per l'Alzheimer) e l'espressione di mutanti SOD1 tipica della forma di SLA familiare (Cozzolino et al. 2004, 2006).

L'isoforma di SMN mancante dell'esone 7 non compensa completamente una mancanza della proteina full-length, come risulta evidente dalla malattia atrofia spino-muscolare, in cui il gene SMN1, l'unico che va incontro ad uno splicing corretto, è deletato e rimane il gene SMN2, che va incontro ad uno splicing alternativo in cui viene saltato l'esone 7 (Nicole et al. 2002). Questa malattia colpisce in maniera selettiva i motoneuroni e ha un decorso clinico molto simile alla SLA. Nel nostro sistema modello il rapporto fra l'isoforma mancante dell'esone 7 e l'isoforma full-length diminuisce significativamente. Molto probabilmente questo risultato deriva dallo splicing del trascritto di SMN2, poiché è l'unico che va incontro a splicing alternativo. Quest'osservazione è supportata dal fatto che lo splicing di SMN non cambia nel neuroblastoma murino che ha solo il gene SMN1. Ovviamente l'effetto del cambiamento dello splicing di SMN2 non è così severo come la perdita del gene SMN1, ma potrebbe sempre contribuire alla neurogenerazione.

La seconda parte dei nostri studi è stata mirata a cercare di chiarire quale sia la cascata del segnale che modula lo splicing alternativo in risposta al paraquat, il che porta a delucidare i meccanismi di regolazione dello splicing alternativo in generale, che sono ancora poco conosciuti. Abbiamo dimostrato che le proteine hnRNPs non sono principalmente coinvolte, mentre sembra che la cascata del segnale che stiamo osservando alla fine converga sulla regolazione delle proteine SR e del loro stato di fosforilazione. Sono conosciute due chinasi che fosforilano in maniera specifica i domini SR: clk/sty e SRPK (vedi introduzione), ciascuna delle quali ha differenti isoforme codificate da geni differenti. Entrambe le chinasi sono costitutivamente attive, e nessun segnale di regolazione è conosciuto. In primo luogo sembra che le proteine SR siano down regolate, infatti la purificazione biochimica di queste proteine da estratti di cellule trattate con paraquat rispetto a cellule di controllo è molto meno efficiente, inoltre

trattando le cellule con l'inibitore della protein chinasi SRPK si ottiene lo stesso effetto del paraquat. Questo dimostra che, alla fine, la cascata del segnale converge sulle chinasi (o fosfatasi) che regolano la fosforilazione delle proteine SR.

Molto poco è conosciuto circa la regolazione della fosforilazione delle proteine SR in risposta a stimoli extracellulari o a programmi di sviluppo. Però, diverse cascate del segnale sono attivate in seguito a stress mitocondriale e/o condizioni di neurodegenerazione. Queste includono, ad esempio, MAP chinasi e segnali legati al calcio. La MAP chinasi p38 modula lo splicing alternativo mediante cambiamenti dello stato di fosforilazione della proteina hnRNP A1 (Allemand E, *et al.* 2005),

L'inibizione della MAP chinasi p38 non ha prodotto significativi effetti sui cambiamenti osservati nei patterns di splicing alternativi il che è in accordo con i nostri risultati che le proteine hnRNPs non sono coinvolte nel nostro sistema. Invece, il BAPTA-AM, un chelante che sequestra il calcio citoplasmatico, abolisce l'effetto del paraquat sullo splicing alternativo. Le chinasi calcio/calmodulina dipendenti cambiano, in condizioni fisiologiche, ma non patologiche, lo splicing alternativo di alcuni geni specifici in risposta a ripetute stimolazioni, spikes di calcio causati dall'attività neuronale suscitano un sottile cambiamento nello splicing alternativo che è trasmesso tramite la CamKIV (Xie J and Black DL 2001) e sembra coinvolgere nuovamente hnRNPA1 (An P and Grabowski PJ, 2007). Abbiamo, perciò, testato inibitori delle Cam chinasi ma questi esperimenti non mostrano risultati di importanza rilevante. E', però, ovvio che chinasi (o fosfatasi) dipendenti dalla calmodulina trasmettono lo stress mitocondriale al macchinario di splicing. Rimane, quindi, da investigare quale sia l'anello di congiunzione tra il calcio e lo splicing alternativo.

Infatti, veramente poche cascate del segnale sono conosciute influenzare lo splicing: la cascata del segnale che coinvolge Akt modifica l'attività di alcune proteine SR (Blaustein M, *et al.* 2005). In conclusione, rimane ancora un enigma il meccanismo mediante il quale stimoli esterni regolino lo splicing alternativo.

Quindi le prospettive future di questi studi saranno sicuramente mirate ad analizzare le basi molecolari dello splicing alternativo, analizzando ciascuna chinasi o fosfatasi calcio/calmodulina dipendente, e il loro coinvolgimento nello splicing alternativo. Questi

studi potranno essere basati su trasfezioni di siRNA diretti contro questi enzimi oppure mediante l'overespressione di mutanti costitutivamente attivi.

Possiamo, quindi, concludere che c'è sicuramente un legame fra la neuro degenerazione e lo splicing alternativo. Probabilmente, significativi cambiamenti nella quantità di isoforme di molti se non tutti i geni che sono regolati da splicing alternativo, potrebbero alterare molti equilibri nei neuroni e di conseguenza contribuire alla morte cellulare neuronale. Nonostante le significative differenze a livello clinico, il Parkinson e l'Alzheimer mostrano caratteristiche simili a livello cellulare e molecolare, caratteristiche osservate anche in altre malattie neurodegenerative come la SMA e la SLA. La patogenesi di queste malattie non è stata ancora chiarita e sembra che la morte cellulare dei neuroni sia in ultima analisi dovuta a diversi fattori. E' importante notare che le cellule nervose in tutte e quattro le patologie sopra menzionate, mostrano segni di stress ossidativo e disfunzioni mitocondriali. Visto che, alla fine, la morte cellulare nella neurodegenerazione sembra essere causata da fattori multipli, solo una strategia farmaceutica combinata che tiene conto simultaneamente dei diversi meccanismi deleteri può alla fine risultare vincente. E' perciò importante capire tutti i meccanismi che sono attivi nella neuro degenerazione per trovare una terapia per queste malattie. Di conseguenza capire quale sia la via di trasduzione del segnale coinvolta nel cambiamento dello splicing alternativo in seguito a stimoli di stress nei neuroni è sicuramente importante per identificare eventuali nuovi target terapeutici per queste fatali malattie.

BIBLIOGRAFIA

Aerbajinai W., Ishihara T., Arahata K. and Tsukahara T. (2002) Increased expression level of the splicing variant of SIP1 in motor neuron diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 699–707.

Allemand E., Guil S., Myers M., Moscat J., Caceres J. F. and Krainer A. R. (2005) Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoproteinA1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3605–3610.

An P, Grabowski PJ (2007) Exon Silencing by UAGG Motifs in Response to Neuronal Excitation. *PLoS Biol.* **5**, 263-280.

Andersen J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* **10**, S18–S25.

Aubol, B.E., Chakrabarti, S., Ngo, J., Shaffer, J., Nolen, B., Fu, X.D., Ghosh, G. and Adams, J.A. (2003) Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12601-12606.

Becher M.W., Kotzuk J.A., Sharp A.H., Davies S.W., Bates G.P., Price D.L., Ross C.A. (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol. Dis.* **4** 387–397.

Bendotti C. and Carri` M. T. (2004) Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends Mol. Med.* **10**, 393–400.

Benedict M. A., Hu Y., Inohara N. and Nunez G. (2000) Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase 9. *J. Biol. Chem.* **275**, 8461–8468.

Black D.L. (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**, 367-370.

Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M.J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J.R., Muschietti, J.P., Kornblihtt, A.R., Cáceres, J.F. et al. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1037-1044.

Borden K.L. (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* **22** (2002) 5259–5269.

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.

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.

Buckanovic R.J., Posner J.B., Darnell R.B. (1993). Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* **11**, 657-672.

Caceres J. F. and Kornblihtt A. R. (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**, 186-193.

Cáceres, J.F., Sreaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.*, **12**, 55-66.

Cao X., Sudhof T.C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293** 115-120

Cao X., Sudhof T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* **279** 24601-24611.

Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA*, **3**, 1456-1467.

Carri` M. T., Ferri A., Cozzolino M., Calabrese L. and Rotilio G. (2003) Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res. Bull.* **61**, 365-374.

Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Rev Genet.* **3**, 285-298.

Cashman N. R., Durham H. D., Blusztajn J. K., Oda K., Tabira T., Shaw I. T., Dahrouge S. and Antel J. P. (1992) Neuroblastoma · spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn.* **194**, 209-221.

Cazalla, D., Zhu, J., Manche, L., Huber, E., Krainer, A.R. and Cáceres, J.F. (2002) Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6871-6882.

Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A. and Gruss P. (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**, 727-737.

Chalfant, C.E., Kishikawa, K., Mumby, M.C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. and Hannun, Y.A. (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20313-20317.

- Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B.J., Pettus, B.J. and Hannun, Y.A.** (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44848-44855.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, 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.
- Chen C. L. and Feigelson P.** (1979) Cycloheximide inhibition of hormonal induction of a2u-globulin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2669–2673.
- Chen H.H., Wang Y.C., Fann M.J.** (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26** 2736–2745.
- Chu C.T., Plowey E.D., Wang Y., Patel V., Jordan-Sciutto K.L.** (2007) Location, location, location: altered transcription factor trafficking in neurodegeneration, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66** 873–883
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI.** (1996). The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* **15**, 265-275.
- Colwill, K., Feng, L.L., Yeakley, J.M., Gish, G.D., Caceres, J.F., Pawson, T. and Fu, X.D.** (1996) SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24569-24575.
- Cortegni, 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.
- Cozzolino M., Ferraro E., Ferri A. et al.** (2004) Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration. *Cell Death Differ.* **11**, 1179–1191.
- Cozzolino M., Ferri A., Ferraro E., Rotilio G., Cecconi F. and Carri M. T.** (2006) Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **21**, 69–79.
- Cudkowicz, M E, McKenna-Yasek, D , Sapp, P E, Chin, W, Geller, B, Hayden, D L, Schoenfeld, D A , Hosler, B A, Horvitz, H R, Brown, R H.** (1997) Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **41**, 210-221.
- Daoud R., Da Penha Berzaghi M., Siedler F., Hubener M., Stamm S.**(1999). Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **11** 788–802.

- Daoud R., Mies G., Smialowska A., Ola' h L., Hossmann K. A. and Stamm S.** (2002) Ischemia induces a translocation of the splicing factor tra2-b1 and changes alternative splicing patterns in the brain. *J. Neurosci.* **22**, 5889–5899.
- Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L., Bates G.P.** (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90** 537–548.
- Degli Esposti M.** (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 222–235.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al.** (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn Superoxid dismutase. *Science* **261**, 1047-1051.
- Dickinson L.A., Edgar A.J., Ehley J., Gottesfeld J.M.** (2002). Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **277** 25465–25473.
- Ding, J.H., Zhong, X.Y., Hagopian, J.C., Cruz, M.M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J.A. and Fu, X.D.** (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 876-885.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S and Burd CG** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* **62**, 289-321.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N.** (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 195-205.
- Drubin D.G., Kirschner M.W.** (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* **103** 2739–2746.
- D'Souza I., Schellenberg G.D.** (2000). Determinants of 4-repeat tau expression.Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusionN. *J. Biol. Chem.* **275** 17700–17709.
- Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M. and Bell, J.C.** (1997) In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5996-6001.
- Elhers MD, Tingley WG, Haganir RL** (1995). Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* **269**, 1734-1737.
- Eperon IC, Makarova OV, Mayeda A, Munroe SH, Cáceres JF, Hayward DG, Krainer AR.** (2000). Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1. *Mol Cell Biol.* Nov **20**(22):8303-18.

- Ferrer I., Barrachina M., Puig B.** (2002). Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal de generation. *Acta Neuropathol.* **104** 583–591.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G.** (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**,1023-1029.
- Francisconi S., Codenotti M., Ferrari-Toninelli G., Uberti D., Memo M.** (2005). Preservation of DNA integrity and neuronal de generation. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48** 347–351.
- Friedlander R. M.** (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1365–1375.
- 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.
- Fu XD.** (1995). Superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* **1**, 663-80.
- Fukushima T., Yamada K., Hojo N., Isobe A., Shiwaku K. and Yamane Y.** (1994) Mechanism of cytotoxicity of paraquat. III. The effects of acute paraquat exposure on the electron transport system in rat mitochondria. *Exp. Toxicol. Pathol.* **46**, 437–441.
- Gabbianelli R., Ferri A., Rotilio G. and Carri` M. T.** (1999) Aberrant copper chemistry as a major mediator of oxidative stress in a human cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **73**, 1175–1180.
- Gatfield, D. and Izaurrealde, E.** (2002) REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *J. Cell Biol.*, **159**, 579-588.
- 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.
- Gilbert, W. and Guthrie, C.** (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol. Cell*, **13**, 201-212.
- Gilbert, W., Siebel, C.W. and Guthrie, C.** (2001) Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA*, **7**, 302-313.
- Goers J., Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Millett I.S., Doniach S., Di Monte D.A., Uversky V.N., Fink A.L.** (2003). Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* **42** 8465–8471.
- Graveley B. R.** (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**, 1197–1211.

- Grimes C.A., Jope R.S.** (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65** 391–426.
- Gubitz A.K., Feng, W. e Dreyfuss G.** (2004). The SMN complex. *Exp. Cell Res.* **296**, 51-56.
- Gue'gan C. and Przedborski S.** (2003) Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Invest* **111**, 153–161.
- Guerini D., Wang X., Li L., Genazzani A., Carafoli E.** (2000). Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca(2+)pump in neurons. *J. Biol. Chem.* **275** 3706–3712.
- Gui, J.F., Lane, W.S. and Fu, X.D.** (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, **369**, 678-682.
- Han K., Yeo G., An P., Burge C.B., Grabowski P.J.** (2005). A combinatorial code for splicing silencing: UAGG and GGGG motifs. *PLoS Biol.* **3** e158.
- Harris A., Morgan J.I., Pecot M., Soumare A., Osborne A., Soares H.D.** (2000) Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol. Cell. Neurosci.* **16** 578–596.
- 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.
- Hernandez F., Perez M., Lucas J.J., Mata A.M., Bhat R., Avila J.** (2004). Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279** 3801–3806.
- Higgins D. S. Jr and Greenamyre J. T.** (1996) [3H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* **16**, 3807–3816.
- Hirano A, Nakano I, Kurland L.T, Mulder D.W., Holley P.W., Saccomanno G.** (1984) Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Of Neurophatol Exp Neurol* **43**, 471-480.
- Houven van Oordt, W., Diaz-Meco M. T., Lozano J., Krainer A. R., Moscat J. and Caceres J. F.** (2000) The MKK (3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J. Cell Biol.* **149**, 307–316.
- Hua Q., He R.Q.** (2003). Tau could protect DNA double helix structure, *Biochim. Biophys. Acta* **1645** 205–211.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J. and Steitz, J.A.** (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell*, **11**, 837-843.

- Ivins K. J., Thornton P. L., Rohn T. T. and Cotman C. W.** (1999) Neuronal apoptosis induced by b-amyloid is mediated by caspase 8. *Neurobiol. Dis.* **6**, 440–449.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. e Golrllich 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.
- Jensen KB, Dredge BK, Stefani G, Zhong R, Buckanovich RJ, Okano HJ, Yang YY, Darnell RB.** (2000). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* Feb **25**:359-71.
- Kanj, S.S., Dandashi, N., El-Hed, A., Harik, H., Maalouf, M., Kozhaya, L., Mousallem, T., Tollefson, A.E., Wold, W.S., Chalfant, C.E. et al.** (2006) Ceramide regulates SR protein phosphorylation during adenoviral infection. *Virology*, **345**, 280-289.
- 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.
- Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Hagiwara, M.** (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.*, **274**, 11125-11131.
- Krieger C., Hu J. H. and Pelech S.** (2003) Aberrant protein kinases and phosphoproteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 535–541.
- Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T. and Hagiwara, M.** (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 357-364.
- Ladd AN, Charlet N, Cooper TA** (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* Feb **21**: 1285-96.
- Lai, M.C. and Tarn, W.Y.** (2004) Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.*, **279**, 31745-31749.
- Lai, M.C., Lin, R.I. and Tarn, W.Y.** (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10154-10159.
- Lai, M.C., Lin, R.I., Huang, S.Y., Tsai, C.W. and Tarn, W.Y.** (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7950-7957.
- Lamond A.I., Sleeman J.E.** (2003) Nuclear substructure and dynamics, *Curr. Biol.* **13** R825–828.
- Lamond A.I., Spector D.L.** (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles, *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* **4** 605–612.

- Lander ES et al., International Human Genome Sequencing Consortium.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- 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.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD** (1998). Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. Mar;20: 589-602
- Lin Z, Haus S, Edgerton J, Lipscombe D.** (1997). Identification of functionally distinct isoforms of the N-type Ca²⁺ channel in rat sympathetic ganglia and brain. *Neuron* 18, 153-166.
- Liu Q., Fisher, U., Wang, F. e Dreyfuss G.** (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and ist associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90, 1013-1021.
- Longman, D., Johnstone, I.L. and Cáceres, J.F.** (2003) The Ref/Aly proteins are dispensable for mRNA export and development in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 9, 881-891.
- Lynch K.W., Weiss A.** (2000). A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol. Cell. Biol.* 20 70–80.
- Maccioni R.B., Munoz J.P., Barbeito L.** (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* 32 367–381.
- MacMorris, M., Brocker, C. and Blumenthal, T.** (2003) UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 9, 847-857.
- Madhani HD, Guthrie C.** (1992) A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* 27, 803-817.
- Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H.** (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8 2804–2815.
- Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L.** (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287 1265–1269.

- Mayrand S. H., Dwen P. and Pederson T.** (1993) Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to premRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7764–7768.
- McLean P.J., Ribich S., Hyman B.T.** (2000). Subcellular localization of alpha-synuclein in primary neuronal cultures: effect of missense mutations. *J. Neural Transm., Suppl.* 53–63.
- Meister G., Buhler D., Laggerbauer B., Zobawa M., Lottspeich F., Fischer U.** (2000) Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet.* **9**, 1977-86.
- Meister G., Eggert C., Buhler D., Brahm H., Kambach C., Fischer U.** (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr. Biol.* **11**, 1990-1994.
- Meister G., Eggert C., Fischer U.** (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends in Cell. Biology* **12**, 472-478.
- Mermoud, J.E., Cohen, P. and Lamond, A.I.** (1992) Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5263-5269.
- Metheny L.J., Skuse G.R.** (1996). NF1 mRNA isoform expression in PC12 cells: modulation by extrinsic factors. *Exp. Cell. Res.* **228** 44–49.
- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G.** (1995)a. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperaturedependent nuclear protein export pathway. *Cell.* **83**, 415-422.
- Michael WM, Siomi H, Choi M, Pinol-Roma S, Nakielny S, Liu Q, Dreyfuss G.** (1995)b. Signal sequences that target nuclear import and nuclear export of pre-mRNA-binding proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **60**, 663-668.
- Misteli, T.** (1999) RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr. Biol.*, **9**, R198-200.
- Misteli, T. and Spector, D.L.** (1996) Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1559-1572.
- Misteli, T., Caceres, J.F. and Spector, D.L.** (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, **387**, 523-527.
- Mizukami K., Ishikawa M., Iwakiri M., Ikonovic M.D., Dekosky S.T., Kamma H., Asada T.** (2005). Immunohistochemical study of the hnRNP A2 and B1 in the hippocampal formations of brains with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **386** 111–115.

- Monani, U.R., Sendtner, M., Coover, 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.
- Münch C., Ebstein M., Seefried U., Zhu B., Stamm S., Landwehrmeyer G. B., Ludolph A. C., Schwalenstöcker B. and Meyer T.** (2002) Alternative splicing of the 5' sequences of the mouse EAAT2 glutamate transporter and expression in a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **82**, 594–603.
- Muresan Z., Muresan V.** (2004). A phosphorylated, carboxy-terminal fragment of betaamyloid precursor protein localizes to the splicing factor compartment. *Hum. Mol. Genet.* **13** 475–488.
- Murray, M.V., Kobayashi, R. and Krainer, A.R.** (1999) The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2Cgamma is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.*, **13**, 87-97.
- Nakielnny S, Dreyfuss G.** (1996) The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J Cell Biol.* **134**(6):1365-73.
- Newman AJ, Teigelkamp S, Beggs JD.** (1995) snRNA interactions at 5' and 3' splice sites monitored by photoactivated crosslinking in yeast spliceosomes. *RNA* **1**, 968-980.
- Neystat M., Lynch T., Przedborski S., Kholodilov N., Rzhetskaya M. and Burke R. E.** (1999) α -Synuclein expression in substantia nigra and cortex in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **14**, 417–422.
- Ngo J.C., Chakrabarti, S., Ding, J.H., Velazquez-Dones, A., Nolen, B., Aubol, B.E., Adams, J.A., Fu, X.D. and Ghosh, G.** (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol. Cell*, **20**, 77-89.
- Nicole S., Cifuentes Diaz C., Frugier T. and Melki J.** (2002) Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* **26**, 4–13.
- Pan Q., Bakowski M. A., Morris Q., Zhang W., Frey B. J., Hughes T. R. and Blencowe B. J.** (2005) Alternative splicing of conserved exons is frequently species-specific in human and mouse. *Trends Genet.* **21**, 73–77.
- Pardo, CA Xu Z, Borchelt DR, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW.** (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**, 954-958.
- Patel N. A., Kaneko S., Apostolatos H. S., Bae S. S., Watson J. E., Davidowitz K., Chappell D. S., Birnbaum M. J., Cheng J. Q. and Cooper D. R.** (2005) Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase C β II alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J. Biol. Chem.* **280**, 14 302–14 309.

- Pellizzoni L., Kataoka N., Charroux B., Dreyfuss G.** (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95, 615-624.
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux., B. e Dreyfuss, G.** (2001). The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol.* 11, 1079-1088.
- Pinol-Roma S, Dreyfuss G.** (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science* 253, 312-314.
- Ponting CP.** (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci.* 22, 51-52.
- Prasad, J. and Manley, J.L.** (2003) Regulation and substrate specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 4139-4149.
- Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T. and Manley, J.L.** (1999) The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6991-7000.
- Reed, R. and Magni, K.** (2001) A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat. Cell Biol.*, 3, E201-E204.
- Ricci J. E., Gottlieb R. A. and Green D. R.** (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell Biol.* 160, 65–75.
- Ricci J. E., Munoz-Pinedo C., Fitzgerald P., Bailly-Maitre B., Perkins G. A., Yadava N., Scheffler I. E., Ellisman M. H. and Green D. R.**(2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773–786.
- Robakis N.K.** (2003). An Alzheimer's disease hypothesis based on transcriptional dysregulation. *Amyloid* 10 80–85.
- Roberts G. C. and Smith C.W.** (2002) Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 375–383.
- Robertson J, Doroudchi MM, Nguyen MD, Durham HD, Strong MJ, Shaw G, Julien JP, Mushynski WE** (2003) A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. *J Cell Biol* 160:939 –949.
- Rosen DR., Siddique T., Patterson D., et al.** (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.
- Ross C.A., Poirier M.A.** (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat.Med.* 10 (Suppl) S10–S17.

- 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.
- Rowland LP.** (1998) Diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis . *J Neurol Sci* **160**, 6-24.
- Sacco-Bubulya, P. and Spector, D.L.** (2002) Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.*, **156**, 425-436.
- Sanford, J.R., Ellis, J.D., Cazalla, D. and Cáceres, J.F.** (2005) Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15042-15047.
- Sato N., Hori O., Yamaguchi A. et al.** (1999) A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J. Neurochem.***72**, 2498–2505.
- Segura Aguilar J. and Kostrzewa R. M.** (2004) Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox. Res.* **6**, 615–630.
- Sergeant N., Sablonniere B., Schraen-Maschke S., Ghestem A., Muraige C.A., Wattez A., Vermersch P., Delacourte A.** (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **10** 2143–2155.
- Shen, H. and Green, M.R.** (2006) RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev.*, **20**, 1755-1765.
- Sherer T. B., Betarbet R. and Greenamyre J. T.** (2002) Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist* **8**, 192–197.
- Shin, C. and Manley, J.L.** (2002) The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell*, **111**, 407-417.
- Siddique T.** (1991) Molecular genetics of familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* **56**, 227-231.
- Smith M. J., Sharples R. A., Evin G. et al.** (2004) Expression of truncated presenilin 2 splice variant in Alzheimer's disease, bipolar disorder, and schizophrenia brain cortex. *Mol. Brain Res.* **127**, 128–135.
- Stamm S, Zhang MQ, Marr TG, Helfman DM** (1994). A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. *Nucleic Acid Res.* **22**, 1515-1526.
- Stutz, F. and Izaurralde, E.** (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.*, **13**, 319-327.

- Tazi, J., Kornstadt, U., Rossi, F., Jeanteur, P., Cathala, G., Brunel, C. and Lührmann, R.** (1993) Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature*, **363**, 283-286.
- Tomiyama M., Rodriguez-Puertas R., Cortes R., Pazos A., Palacios J. M. and Mengod G.** (2002) Flip and flop splice variants of AMPA receptor subunits in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis. *Synapse* **45**, 245–249.
- Troy C. M., Rabacchi S. A., Friedman W. J., Frappier T. F., Brown K. and Shelanski M. L.** (2000) Caspase 2 mediates neuronal cell death induced by b-amyloid. *J. Neurosci.* **20**, 1386–1392.
- Varani G, Nagai K.** (1998). RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **27**, 407-445.
- Velazquez-Dones, A., Hagopian, J.C., Ma, C.T., Zhong, X.Y., Zhou, H., Ghosh, G., Fu, X.D. and Adams, J.A.** (2005) Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *J. Biol. Chem.*, **280**, 41761-41768.
- Walke D. W. and Morgan J. I.** (2000) A comparison of the expression and properties of Apaf-1 and Apaf-1L. *Brain Res.* **886**, 73–81.
- Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X.D.** (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **140**, 737-750.
- Wollerton MC, Gooding C, Robinson F, Brown EC, Jackson RJ, Smith CW.** (2001). Differential alternative splicing activity of isoforms of polypyrimidine tract binding protein (PTB). *RNA* **7**: 819-32.
- Woulfe J.M.,** (2007) Abnormalities of the nucleus and nuclear inclusions in neurodegenerative disease: a work in progress. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33** 2–42.
- Xiao SH, Manley JL.** (1998). Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**, 6359-6367.
- Xie J, Black DL** (2001) A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization induced alternative splicing of ion channels. *Nature* **410**, 936-939.
- Xie J., Lee J. A., Kress T. L., Mowry K. L. and Black D. L.** (2003) Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8776–8781.
- Yang L., Sugama S., Mischak R. P., Kiaei M., Bizat N., Brouillet E., Joh T. H. and Beal M. F.** (2004) A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* **17**, 250–259.

Yu YT, Maroney PA, Nilsen TW. (1993) Functional reconstitution of U6 snRNA in nematode cis- and trans-splicing: U6 can serve as both a branch acceptor and a 5' exon. *Cell* 75, 1049-1059.

Yun, C.Y. and Fu, X.D. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **150**, 707-718.

Yun, C.Y., Velazquez-Dones, A.L., Lyman, S.K. and Fu, X.D. (2003) Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J. Biol*

Zhu, J. and Krainer, A.R. (2000) Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev.*, **14**, 3166-3178.

Zimber A., Nguyen Q.D., Gespach C. (2004) Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell. Signal.* **16** 1085–1104.