



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche L-13

**Malattie neurodegenerative e splicing alternativo: nuove frontiere terapeutiche  
con l'RNA**

Neurodegenerative diseases and alternative splicing: new therapeutic frontiers with  
RNA

**Relatore:**

Dott.ssa Anna La Teana

**Laureanda:**

Erica Silvestre

Anno Accademico 2023-2024

- ❖ Lo splicing venne studiato per la prima volta nel 1977
- ❖ Si è visto che lo splicing genera una moltitudine di isoforme proteiche con funzioni differenti

## Cos'è lo splicing?

**Lo splicing costitutivo** consiste in:

1. rimozione degli introni (le sequenze non codificanti) mediante due reazioni di transesterificazione mediante lo splicesoma
2. attacco degli esoni adiacenti (ossia delle sequenze codificanti)

**Lo spliceosoma** è un complesso molecolare ribonucleoproteico formato da cinque piccole particelle ribonucleoproteiche nucleari





# Lo splicing alternativo

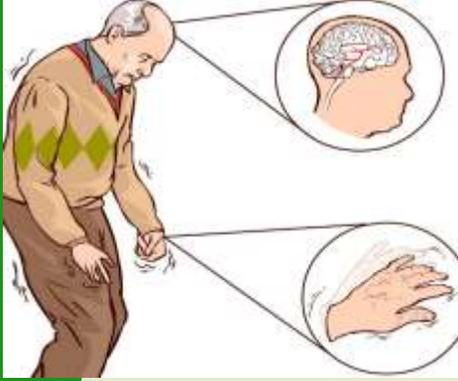
- ▶ Per splicing alternativo si intende la produzione di più trascritti maturi a partire da un unico trascritto primario, circa due terzi dei geni umani codificanti e non codificanti contengono più introni; perciò, eventi di splicing alternativo si verificano in più del 90% dei geni multi-intronici.
- ▶ Il cervello umano presenta una quantità sproporzionata di eventi di splicing alternativo rispetto ad altri tessuti ed è notevolmente conservato in gran parte delle specie.
- ▶ Gli ultimi 15 anni di ricerca scientifica hanno rivelato un ruolo cruciale nella formazione degli assoni e nella maturazione delle sinapsi nonché il suo coinvolgimento nel disturbo dello spettro autistico

- ▶ Sebbene i segnali di splicing ad azione cis siano essenziali per lo splicing costitutivo, sono coinvolti ulteriori elementi di sequenza.

Si tratta di elementi noti come **silenzianti di splicing intronico e esonico (ESS-ISS)** o **potenziatore di splicing intronico e esonico (ESE-ISE)** tali fattori vennero inizialmente divisi in due famiglie:

- ❑ Le proteine SR (serina-arginina) che solitamente facilitano l'assemblaggio dello spliceosoma
- ❑ Le HNRNP (ribonucleoproteine nucleolari eterogenee) che tipicamente inibiscono il riconoscimento dell'esone legandosi ai silenzianti di splicing

Lo splicing associato alla malattia genera trascritti troncati incapaci di funzionare normalmente ma allo stesso tempo lo splicing patologico può spostare il frame di lettura e creare isoforme soggette a decadimento dell'mRna con conseguente riduzione della funzionalità delle proteine.



# Morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa progressiva, seconda solo, per frequenza, al morbo di Alzheimer.

La malattia esordisce spesso dopo i 60 anni d'età, ma quasi il 10% dei pazienti presenta i primi sintomi prima dei 40 anni.

La malattia è dovuta a una progressiva perdita di neuroni nella sostanza nera del cervello, che è responsabile della produzione di dopamina, un importante neurotrasmettitore che regola i movimenti.

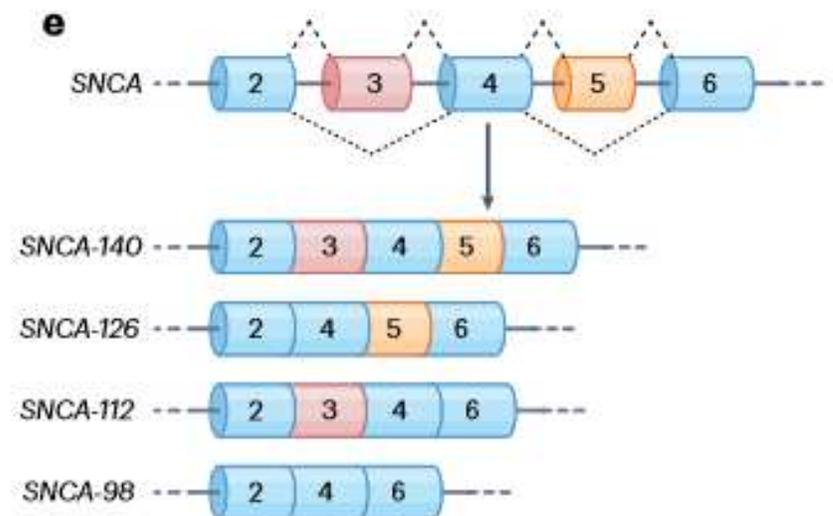
La malattia di Parkinson è stata a lungo considerata una malattia neurodegenerativa puramente idiopatica di origine sconosciuta. Il ruolo dei fattori ambientali sembra modesto e si sospetta da molto tempo un contributo genetico..

La malattia di Parkinson ha portato alla scoperta di 13 loci e

9 geni tra cui:

- SNCA
- PARKINA
- LRRK2
- DJ-1
- PINK1

E molti altri



# Difetti di splicing alternativi nella SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICAA (SLA) E DEMENZA FRONTOTEMPORALE (FTD)

- ▶ La SLA è caratterizzata dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni inferiori.
- ▶ La FTD è una forma comune di demenza a esordio precoce. I pazienti con FTD presentano una progressiva neurodegenerazione della parte frontale e temporale di lobi e cambiamenti gradualmente con deficit di linguaggio.
- ▶ La SLA-FTD indica che queste malattie non sono del tutto dissimili, si ritiene che queste condividano difetti nei geni coinvolti nell'elaborazione dell'RNA come la proteina legante il DNA TAR (TARDBP)

## Similitudini

Prove della sovrapposizione genetica tra SLA e FTD sono emerse nel 2011, quando è stata riscontrata una grande espansione della ripetizione dell'esanucleotide GGGGCC all'interno del gene C9ORF72

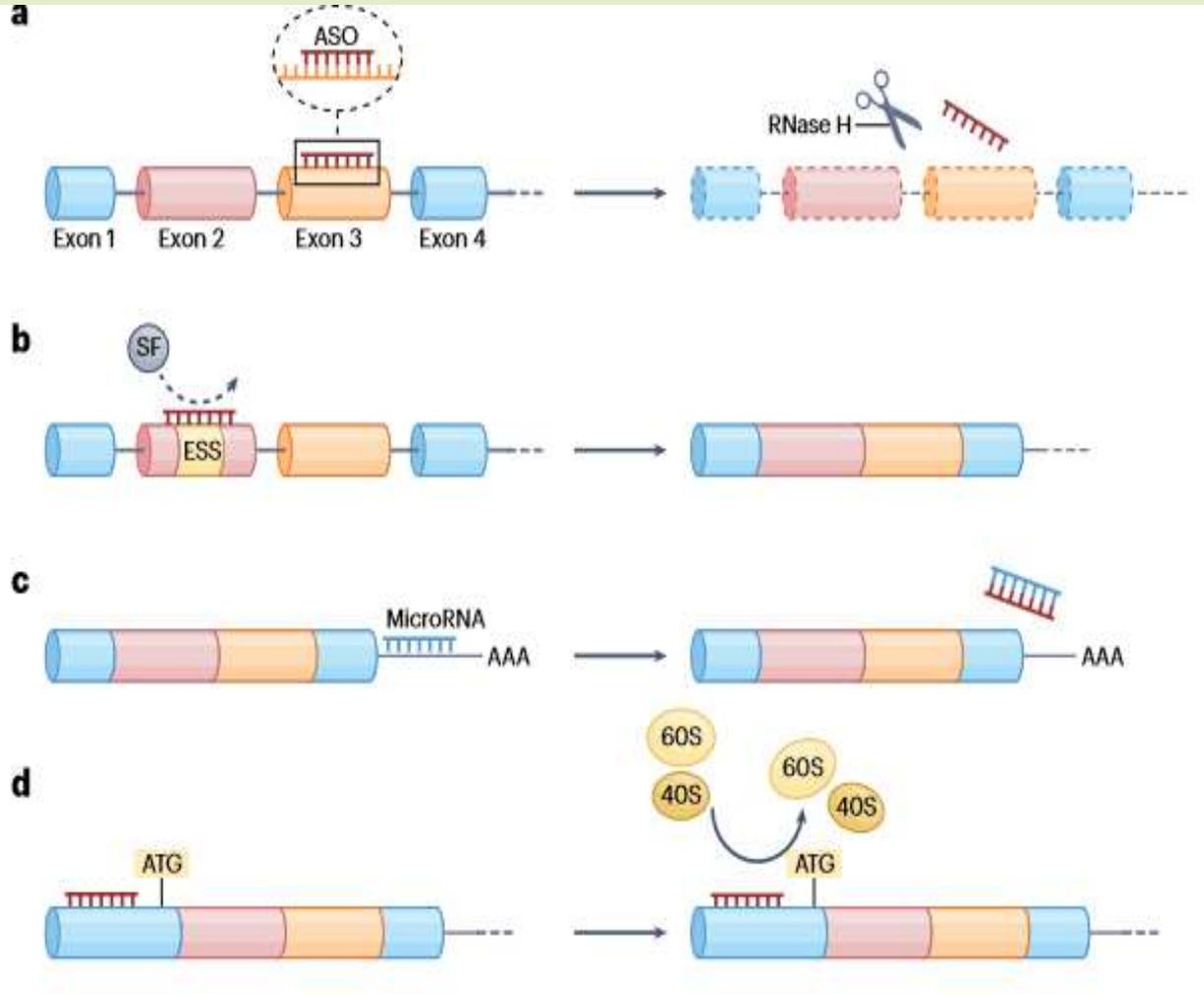
# ASO

## nelle malattie neurodegenerative

Gli ASO terapeutici sono brevi oligonucleotidi di 12-30 pb:

- Brevi molecole a singolo filamento chimicamente modificate
- complementari ad una specifica sequenza di mRNA con la quale si appaiano

# Meccanismi d'azione



- ▶ Degradano selettivamente l'isoforma mediante il reclutamento di RNasi H1
- ▶ Possono inibire specifici eventi di splicing legandosi a potenziatori di splicing esonici o intronici e inibire uno dei due oppure entrambi
- ▶ Gli ASO progettati per legarsi ai microRNA possono inibire cambiamenti mediati dai microRNA nell'espressione genica.
- ▶ ASO possono inibire la traduzione degli mRNA legandosi alle sequenze vicino il codone d'inizio inibendo così l'assemblaggio di tutto il macchinario di traduzione come le subunità ribosomiali

# TERAPIA CON ASO IN PAZIENTI AFFETTI DA ATROFIA MUSCOLARE SPINALE (SMA)

La causa di questa malattia deriva da una significativa riduzione dell'espressione della proteina di sopravvivenza dei motoneuroni (SMN). Nell'uomo due geni praticamente omologhi, l'SMN1 e l'SMN2, codificano per una proteina SMN identica

**Le persone affette da SMA subiscono:**

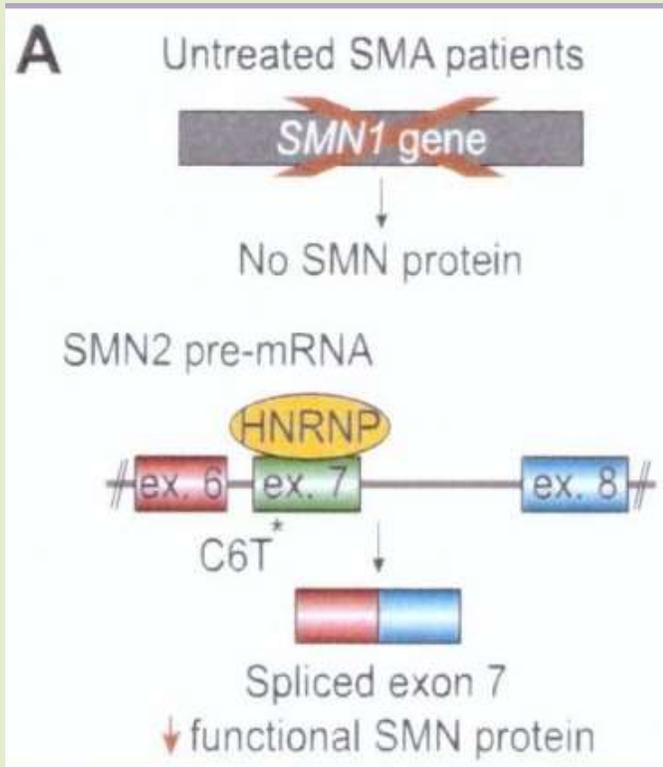
- la perdita del gene omozigote SMN1
- la mutazione di una citosina in timina in posizione 6 all'interno dell'esone 7 nel gene SMN2



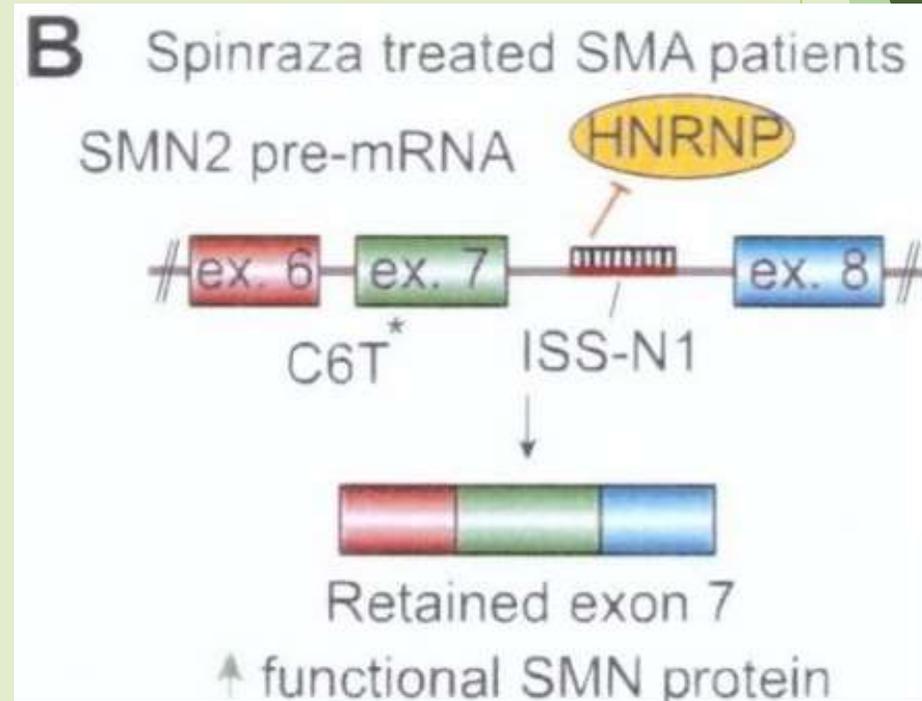
# SPINRAZA

si lega alle sequenza complementare ISS-n1 NELL'INTRONE 7

Pazienti affetti da SMA non trattati



Pazienti affetti da SMA trattati



BLOCCO DI HNRP  
MANCATA RIMOZIONE DELL'ESONE 7  
PROTEINA SMN FUNZIONALE

# Conclusioni

Alla fine di questo studio si può affermare che lo splicing alternativo è il risultato di più meccanismi che cooperano all'unisono. Lo sviluppo di nuove tecnologie, unito allo studio dei processi di regolazione dello splicing alternativo e ad una maggior consapevolezza delle strutture secondarie e terziarie dell' RNA, fa sperare nell'identificazione di nuove molecole in grado di legarsi direttamente all'RNA con il fine di "riparare" un processo di splicing alternativo anomalo

# Riassunto

Lo splicing alternativo del pre-mRNA è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica, che avviene durante il processo di trascrizione o dopo di questo, attraverso il quale vengono sintetizzati diversi trascritti maturi di mRNA da un unico gene. Le mutazioni genetiche che influenzano lo splicing sono causa di numerose malattie.

Fortunatamente la conoscenza sempre più approfondita della regolazione del processo di splicing ha permesso lo sviluppo di approcci terapeutici che vanno a correggere eventuali anomalie indotte da tali mutazioni genetiche. In questo elaborato è stata introdotta la malattia del Parkinson e le similitudini tra due malattie neurodegenerative quali SLA-FTD. Inoltre è stato introdotto uno studio che si avvale di oligonucleotidi quali ASO e gli eventuali meccanismi d'azione e infine sono stati analizzati approcci terapeutici con il farmaco Spinraza.

# Bibliografia

- ▶ Testo : alternative splicing in neurodegenerative disease and the promise of Rna therapies edit by David Nikom and Sika Zheng
- ▶ “Biologia molecolare del gene” di James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P.Bell, Alexander Gann, Michael Levine e Richard Losick, settimiana edizione, casa editrice Zanichelli.
- ▶ Immagini:“Biologia molecolare del gene” di James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P.Bell, Alexander Gann, Michael Levine e Richard Losick, settimiana edizione, casa editrice Zanichelli