



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

Corso di Laurea
Scienze biologiche

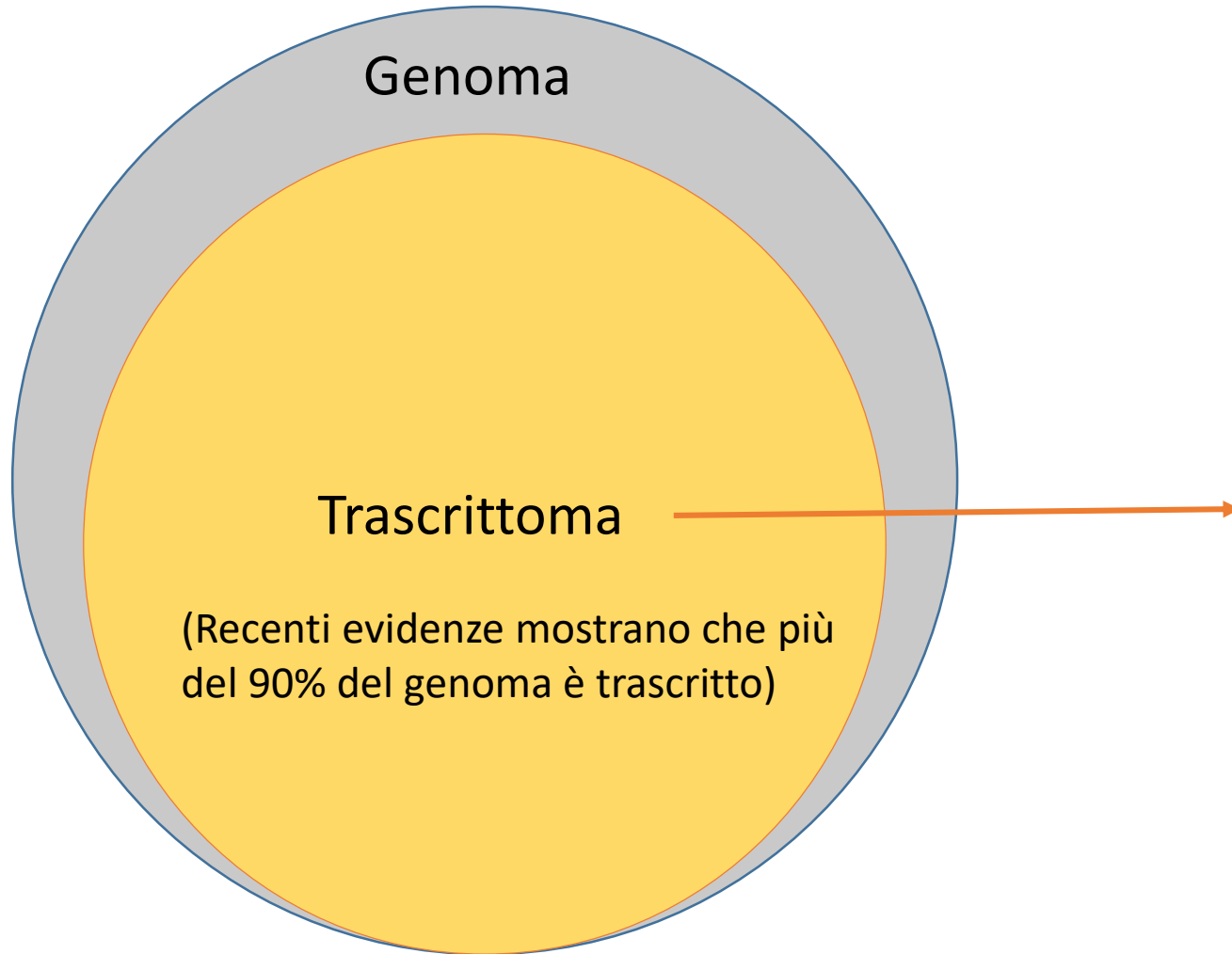
“Ruolo di RNA non codificanti nelle patologie”
“Noncoding RNAs in diseases”

Tesi di Laurea di:
Diego Berionni

Docente referente Chiar.ma Prof.ssa
Anna La Teana

Sessione Autunnale Ottobre 2021
Anno accademico 2020/2021

Composizione genoma umano

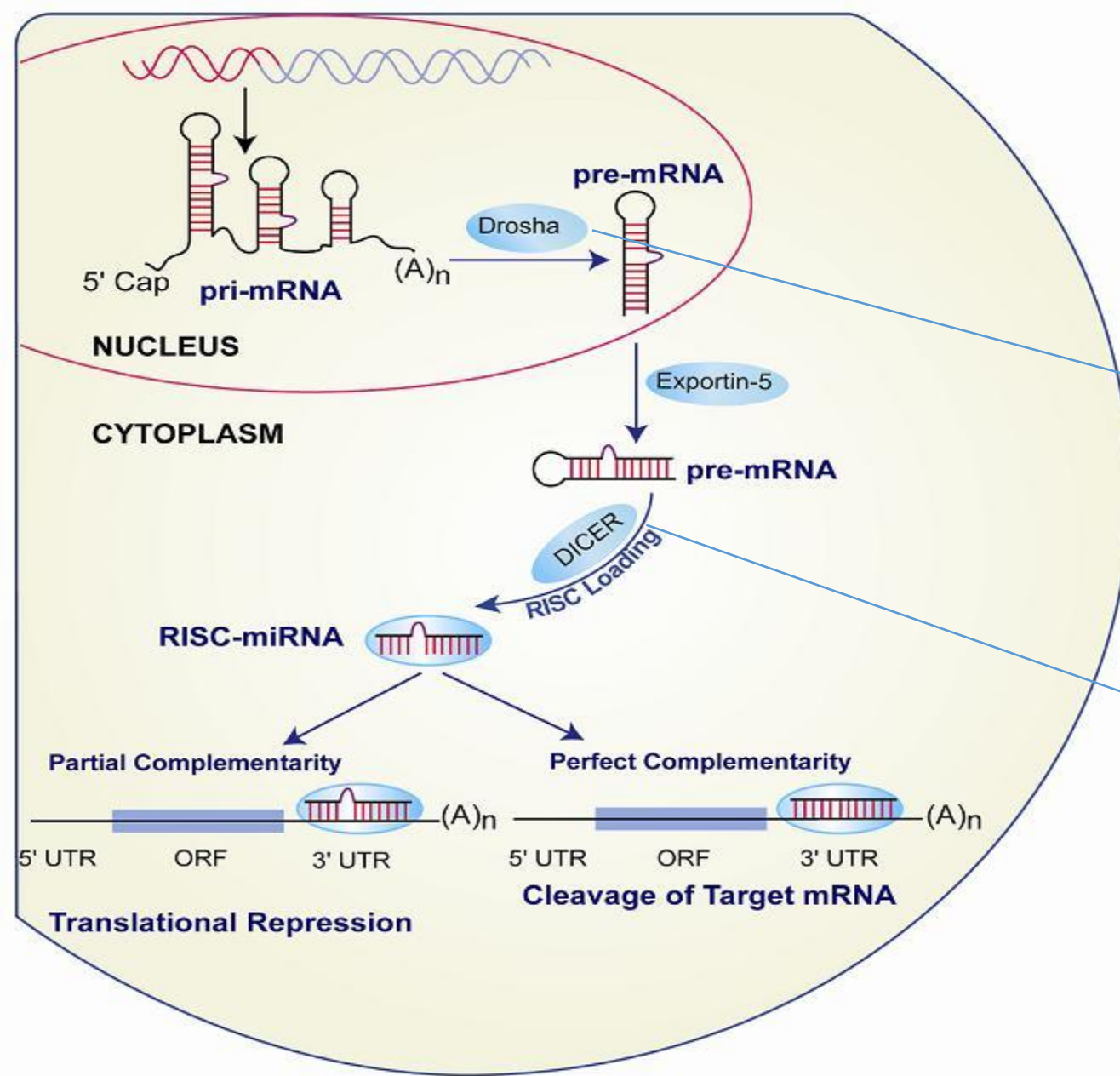


- mRNA (circa 4%, 1-2% genoma totale)
- tRNA, rRNA
- ncRNA (>80%): small (<200 nt) e long ncRNA

Tra gli small ncRNA si trovano i miRNA

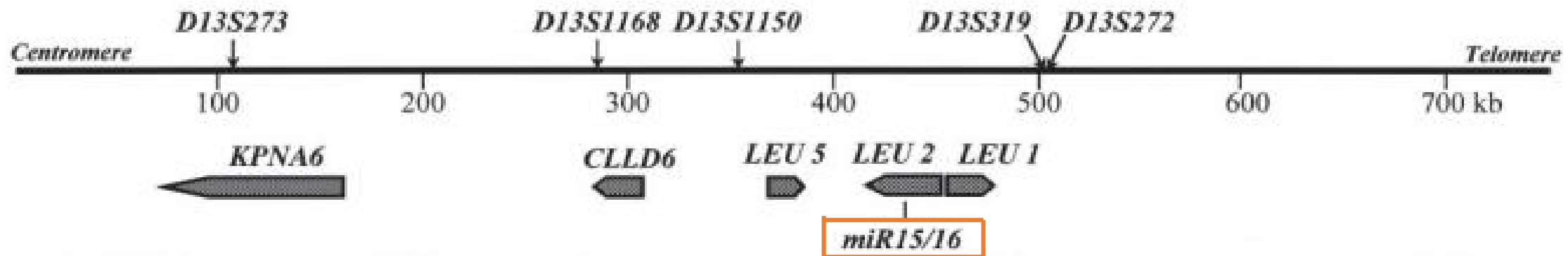
Espressione miRNA:

- RNA pol II trascrive un pri-miRNA lungo un centinaio di nucleotidi
- Taglio pri-miRNA e formazione di un tratto a doppio filamento che termina con un loop → pre-miRNA
- Trasporto nel citoplasma
- Selezione di uno dei 2 filamenti ed interazione al complesso RISC → forma cataliticamente attiva

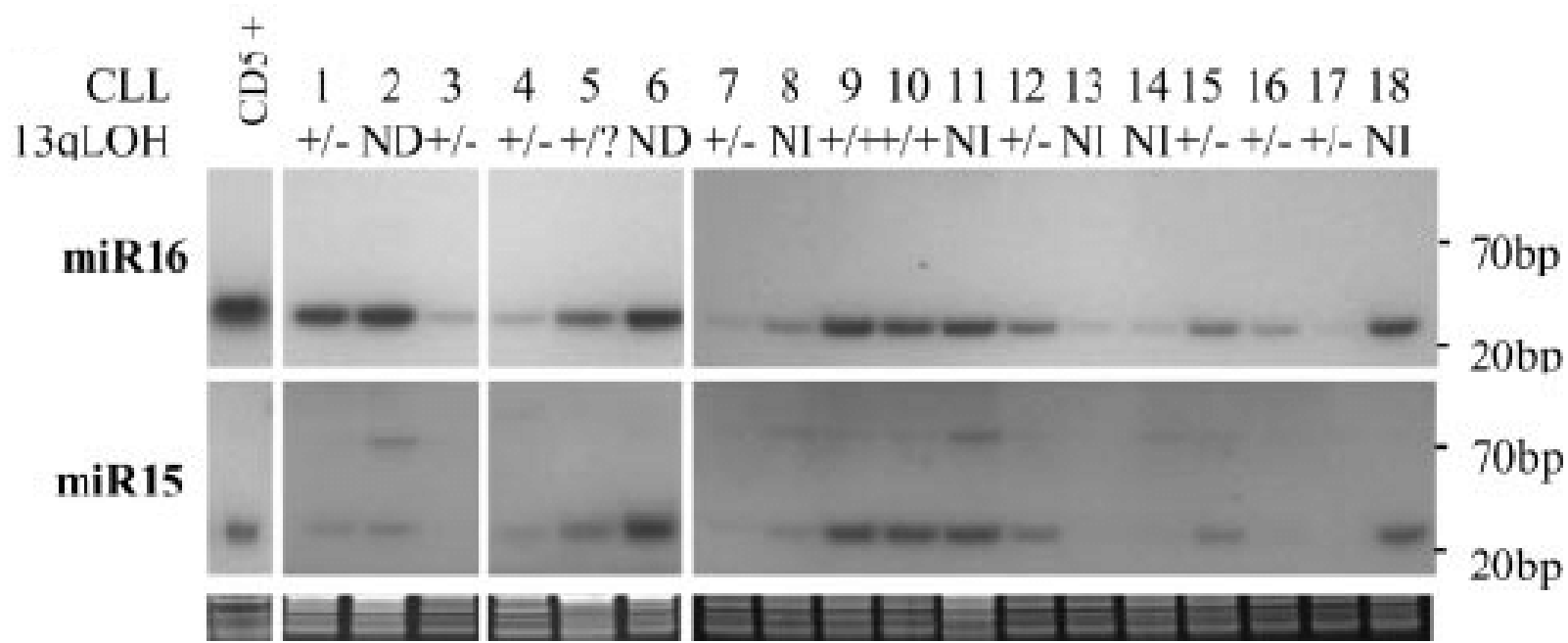


Coinvolgimento di miR-15-a e miR-16-1 nella leucemia linfatica cronica (CLL)

- In circa 68% dei pazienti affetti da CLL 2 miRNA, miR-15-a e miR-16-1, sono fortemente downregolati
- Emizigosi e/o delezioni in omozigosi della regione 13q14 sono riscontrate in più del 50% dei pazienti e costituiscono l'anomalia cromosomica più frequente, e spesso anche l'unica, in persone affette da CLL



Geni presenti nella regione 13q14 in cui si trova gene oncosoppressore della CLL



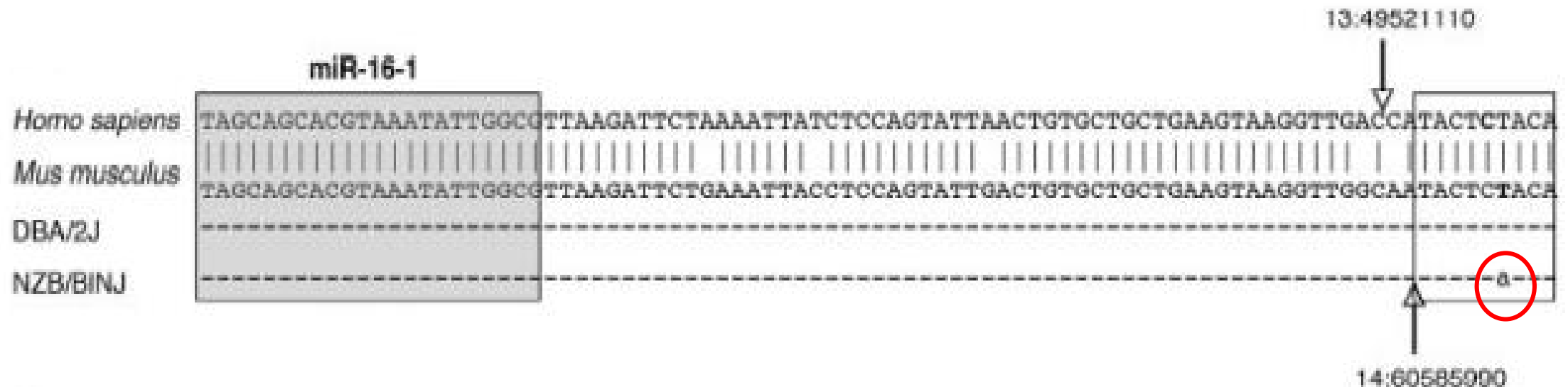
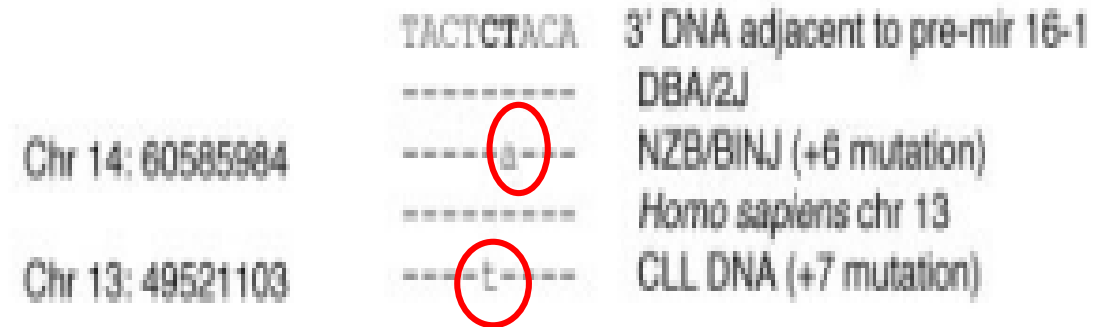
+/+ → Eterozigosi
 +/- → LOH
 -/- → Delezione in omozigosi

 NI (non informativo), ND (non fatto)

Studio di LOH prendendo in considerazione i marker D13S272 e D13S273 per determinare la possibile correlazione tra down-regolazione e delezione

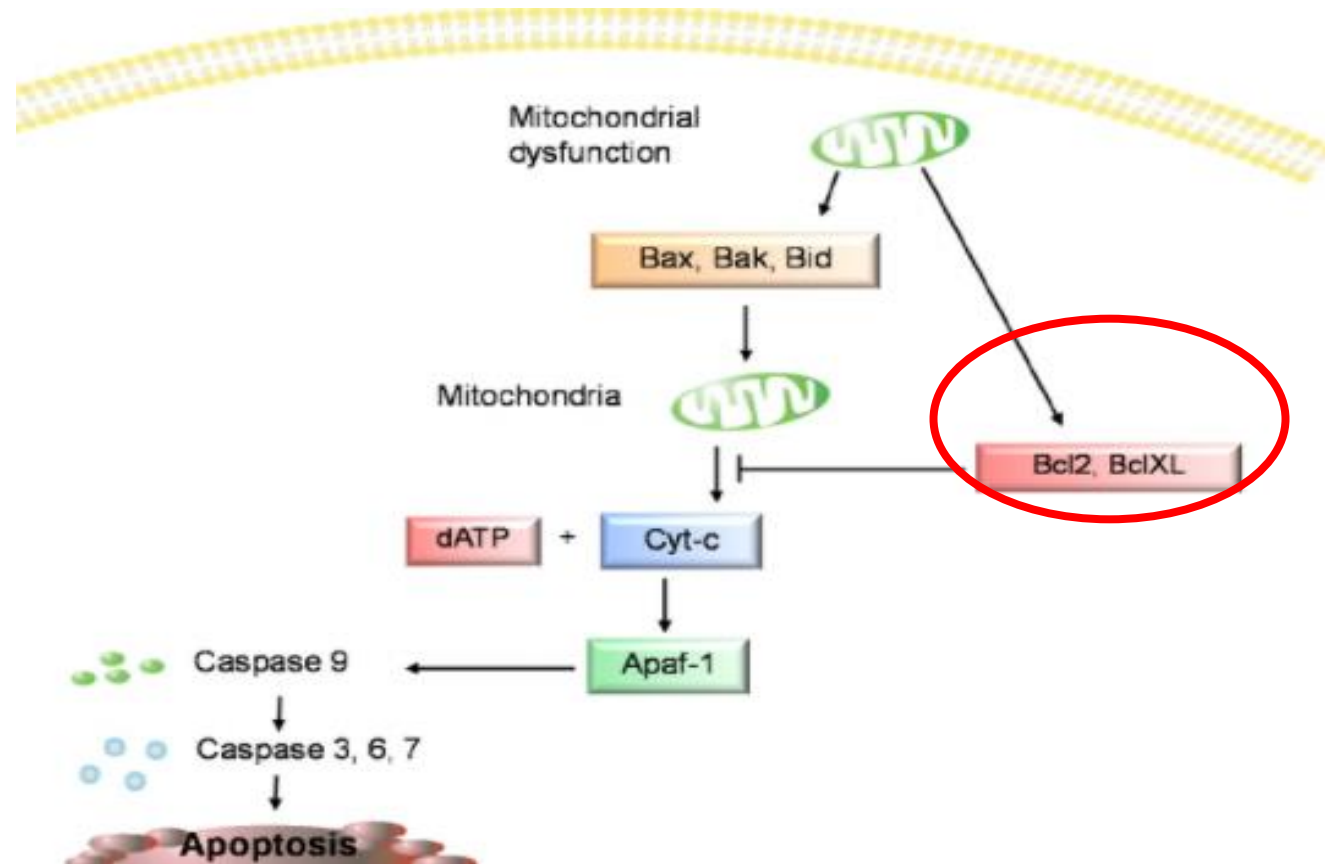
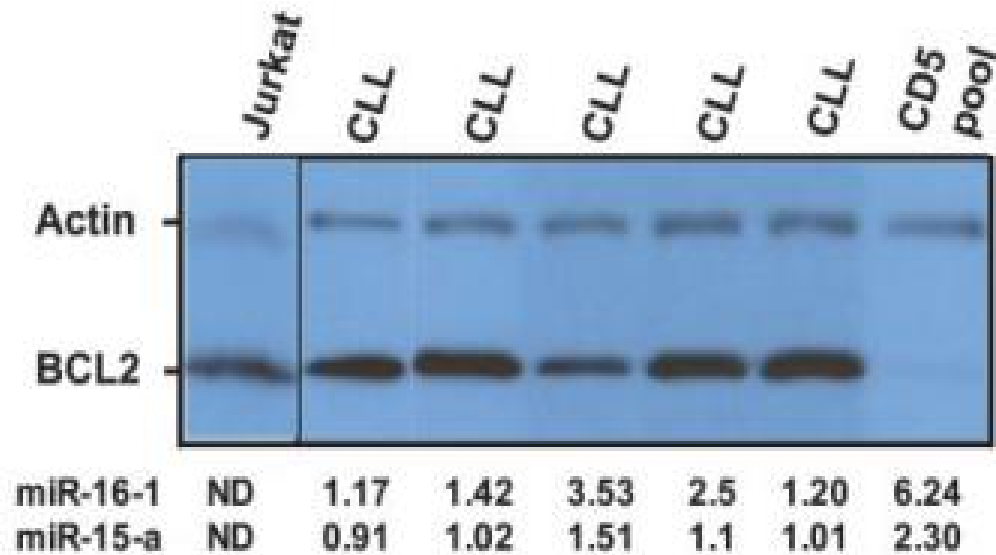
Modello NZB per lo studio della CLL umana

Studi sul NZB hanno evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme nella regione 3' del gene miR-16-1; la stessa è stata poi ritrovata anche in pazienti umani con CLL in una posizione quasi identica



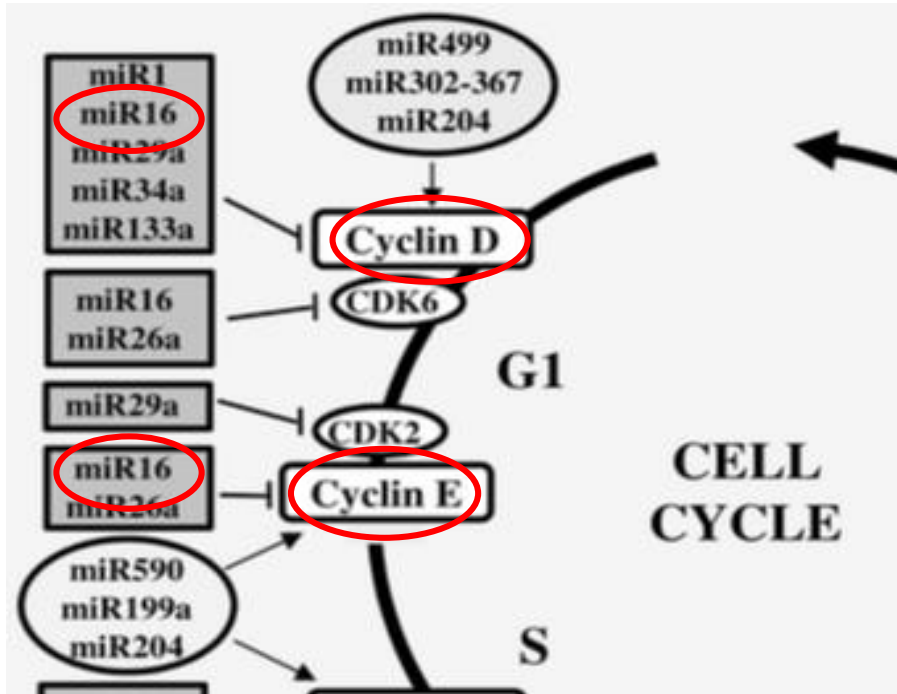
Quali sono i principali target di miR-15a e miR-16?

- BCL-2



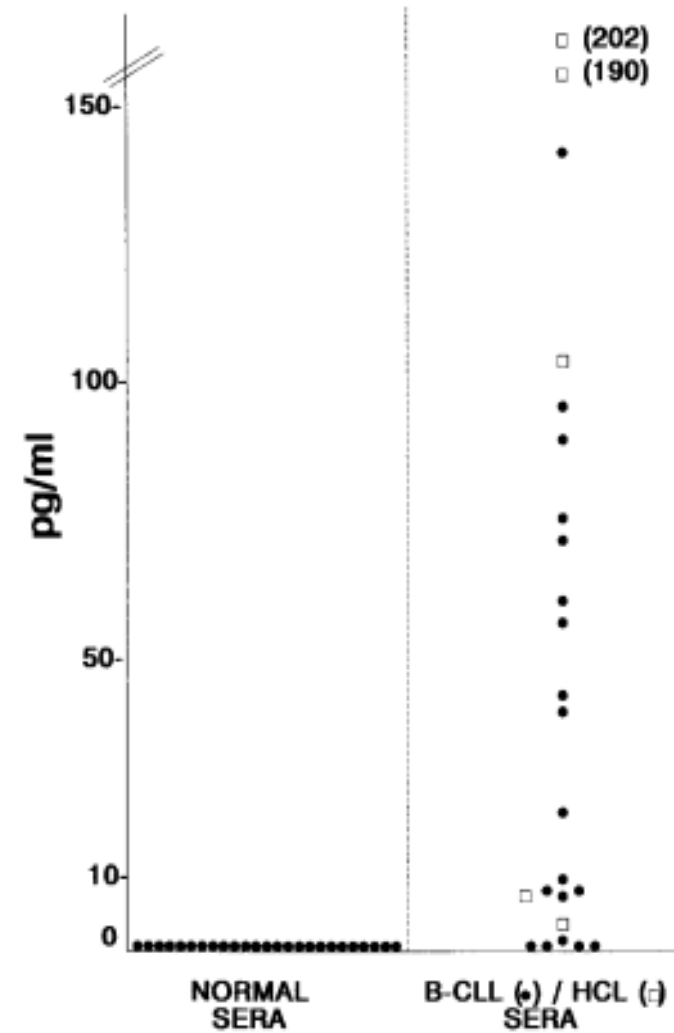
In pazienti con CLL I livelli della proteina Bcl-2 sono inversamente correlate all'espressione dei miRNA 15/16

- Ciclina D1 e ciclina E



Nei pazienti affetti da CML si osserva un aumento della concentrazione della ciclina D1, in altri tipi di tumori lo stesso si osserva per la ciclina E → iperproliferazione cellulare e mancanza dei meccanismi di controllo nella transizione G1/S

- TNF-alfa

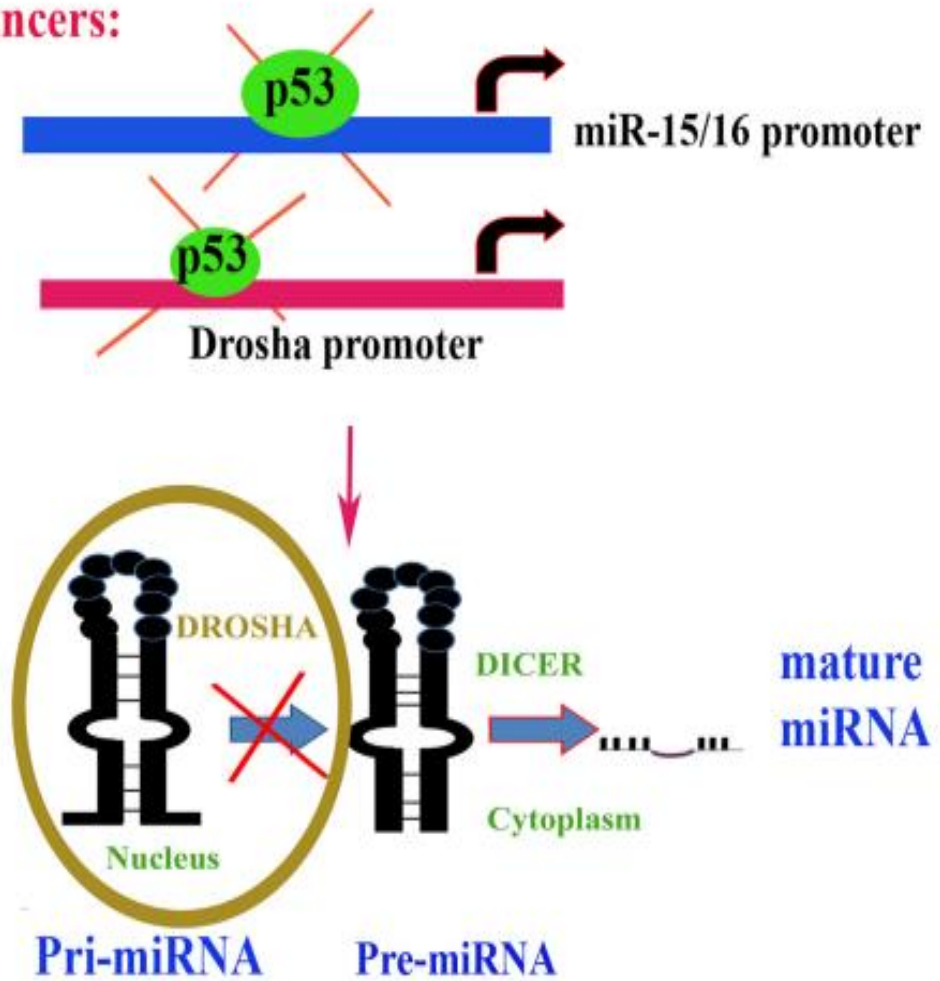


Concentrazione TNF-alfa nel siero sanguigno

- P53

L'espressione di P53 e miR15/16 è autoregolata da un meccanismo di feedback positivo → negli affetti da CLL ci sono bassi livelli anche di p53, sono quindi inibite espressione e maturazione di miRNA15/16

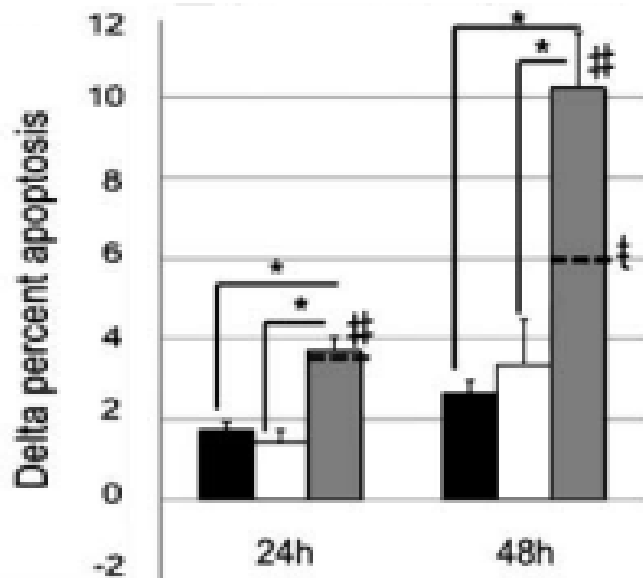
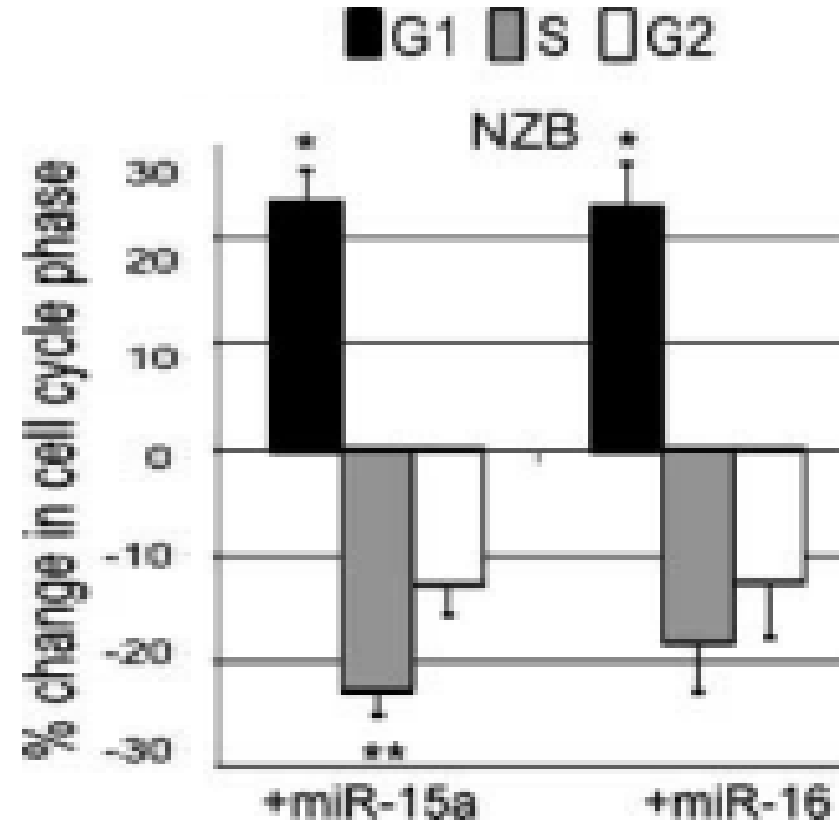
In CLL cancers:



Possibile approccio terapeutico

In NZB l'aggiunta di miRNA esogeno porta alla restaurazione di livelli della ciclina D1 simili a quelli di cellule normali → blocco cellule in G1

L'aggiunta di miRNA esogeno porta anche ad una maggiore sensibilità delle cellule tumorali verso farmaci che promuovono l'apoptosi come la nutlina e la genisteina



- Nero: differenza percentuale di apoptosi tra cellule trattate con genisteina e non
- Bianco: differenza percentuale di apoptosi tra cellule con aggiunta di miRNA-16 e con un analogo di controllo negativo
- Grigio: differenza percentuale di apoptosi tra cellule trattate con genisteina + miRNA-16 e genisteina + controllo negativo

RIASSUNTO

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante scoperte abbastanza recentemente nel 1993. Vengono trascritti come molecole di dsRNA, nella loro forma cataliticamente attiva sono però molecole ssRNA. Sono elementi molto importanti nei processi di regolazione dell'espressione genica, che interagiscono appaiandosi a specifici mRNA bersaglio. Mutazioni a carico di tali sequenze possono quindi avere grosse conseguenze fenotipiche ed è stato osservato il coinvolgimento di miRNA aberranti nell'induzione di diversi tipi di patologie umane. I primi di cui è stato osservato un coinvolgimento in tal senso sono 2 miRNA, miR-15-a e miR-16-1, collocati nell'uomo a livello della regione 13q14, la cui downregolazione, dovuta in realtà ad una delezione, è alla base dello sviluppo della leucemia linfatica cronica (CLL). In condizioni fisiologiche questi 2 miRNA si comportano come degli oncosoppressori andando a regolare l'espressione di geni che invece diventano degli oncogeni in mancanza di tale meccanismo di controllo. Tra i target principali di miR-15-a e miR-16-1 ci sono BCL-2 che viene overespresso bloccando la finalizzazione della via apoptotica intrinseca, cicline di transizione G1->S (D1, E) che vengono anch'esse overesprese portando all'iperproliferazione dei cloni tumorali, diversi esponenti della superfamiglia TNF/TNFR tra cui TNF-alfa che viene espresso costitutivamente, P53 che viene invece downregolato con un meccanismo a feedback positivo. Studi condotti sul modello del topo NZB hanno evidenziato come l'aggiunta di miRNA esogeno ripristini livelli fisiologici della ciclina D1 ed aumenti allo stesso tempo la sensibilità delle cellule nei confronti di farmaci che inducono l'apoptosi, questi rappresentano oggi importanti basi di partenza per lo sviluppo di terapie.

BIBLIOGRAFIA

- “Noncoding RNAs in disease”, Evangelia Lekka and Jonathan Hall, Department of Chemistry and Applied Biosciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, Switzerland
- “Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia”, Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K et al.
- “miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2”, Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M et al.
- “Correcting miR-15a/16 genetic defect in New Zealand Black mouse model of CLL enhances drug sensitivity”, Salerno E, Scaglione BJ, Coffman FD, Brown BD, Baccarini A, Fernandes H, Marti G and Raveche ES
- “Functions and epigenetic aspects of miR-15/16: Possible future cancer therapeutics”, M. Janaki Ramaiah, School of Chemical and Biotechnology, SASTRA deemed University, Tirumalaisamudram, Thanjavur 613401, India
- “Role of microRNAs in regulation of the TNF/TNFR gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia”, Swati Srivastava M.D., Gregory J. Tsongalis Ph.D., Prabhjot Kaur M.D., Department of Pathology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, NH, USA Department of Pathology, Dartmouth Hitchcock Medical Center, Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH 03756, USA
- “Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells: A Possible Regulatory Role of TNF in the Progression of the Disease”, Robert Foa, Massimo Massaia, Silvia Cardona, Anna Gillio Tos, Alberto Bianchi, Carmela Attisano, Anna Guarini, Paola Francia di Celle, and Maria Teresa Fierro