



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

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Potenzialità terapeutiche di tRNA ingegnerizzati per la soppressione di mutazioni nonsense

Therapeutic promise of engineered tRNAs for suppression of nonsense mutations

Tesi di Laurea di:
di:

De Luna Aurora

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

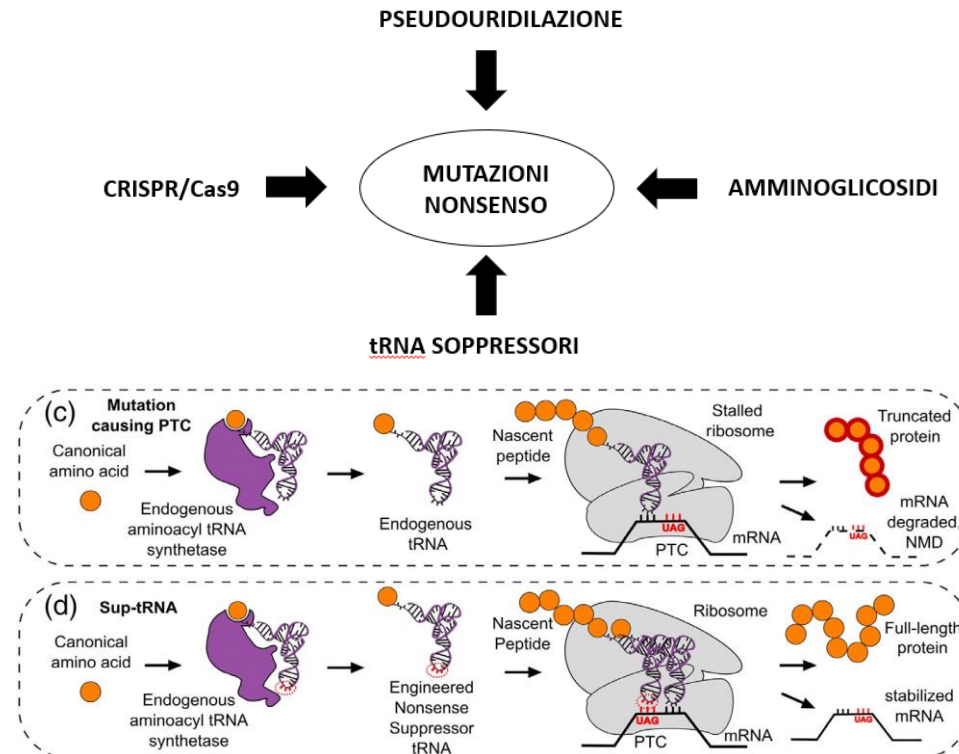
La Teana Anna

Sessione Ottobre 2021
Anno Accademico 2020/2021

INTRODUZIONE

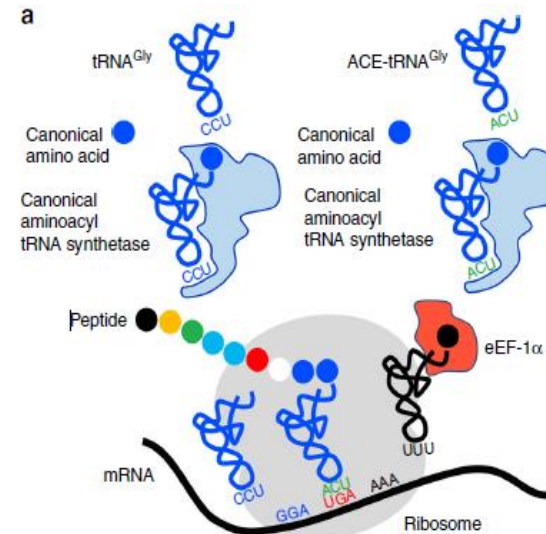
Strategie di soppressione per le mutazioni nonsense

- Le mutazioni nonsense sono la causa del 10 – 15% delle malattie genetiche ereditabili
- i sup tRNA sono tRNA con anticodoni modificati tali da poter riconoscere PTC e inserire un amminoacido specifico



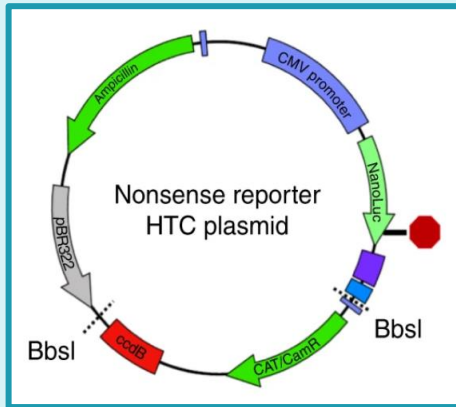
tRNA SOPPRESSORI INGEGNERIZZATI

Amino Acid		Codons	
W	Trp Tryptophan	TGG	
Y	Tyr Tyrosine	TAC TAT	
C	Cys Cysteine	TGC TGT	
E	Glu Glutamic acid	GAA GAG	
K	Lys Lysine	AAA AAG	
Q	Gln Glutamine	CAA CAG	
S	Ser Serine	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	
L	Leu Leucine	TTA TTG CTA CTC CTG CTT	
R	Arg Arginine	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	
G	Gly Glycine	GGA GGC GGG GGT	
F	Phe Phenylalanine	TTC TTT	
D	Asp Aspartic acid	GAC GAT	
H	His Histidine	CAC CAT	
N	Asn Asparagine	AAC AAT	
M	Met Methionine	ATG	
A	Ala Alanine	GCA GCC GCG GCT	
P	Pro Proline	CCA CCC CCG CCT	
T	Thr Threonine	ACA ACC ACG ACT	
V	Val Valine	GTA GTC GTG GTT	
I	Ile Isoleucine	ATA ATC ATT	
X	STP Stop codon	TAA TAG TGA	

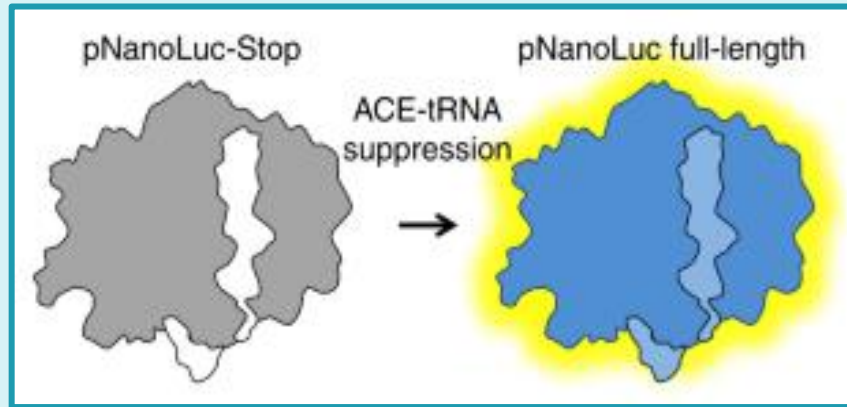


- Codoni che possono essere convertiti in codoni di stop cambiando un nucleotide

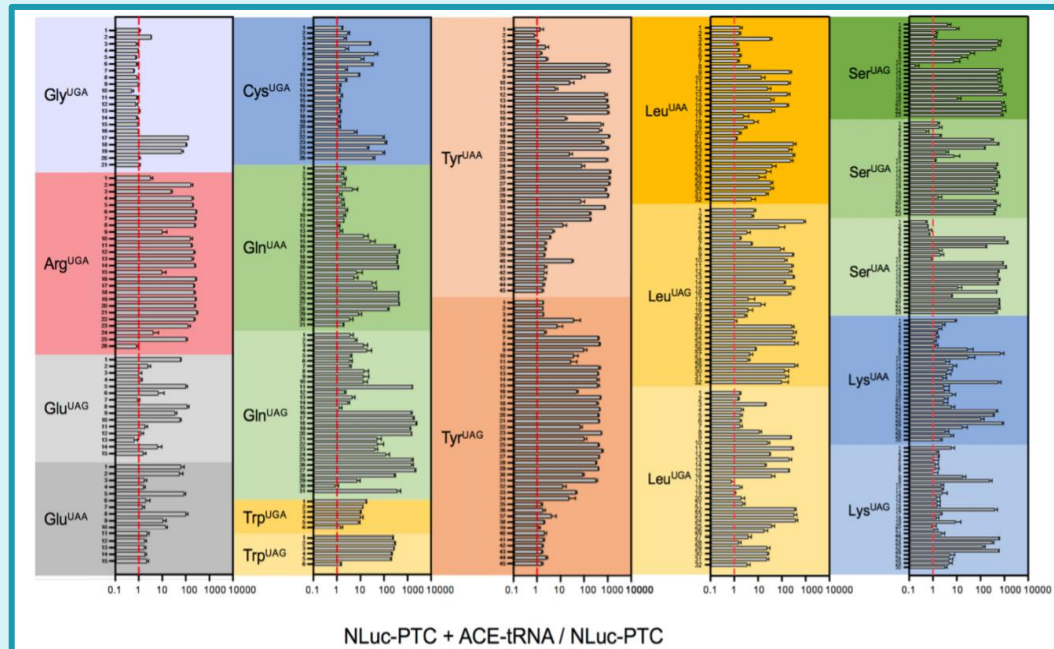
- Funzione dei tRNA soppressori



HTC plasmide per il clonaggio dei sup tRNA



Recupero della proteina luciferasi

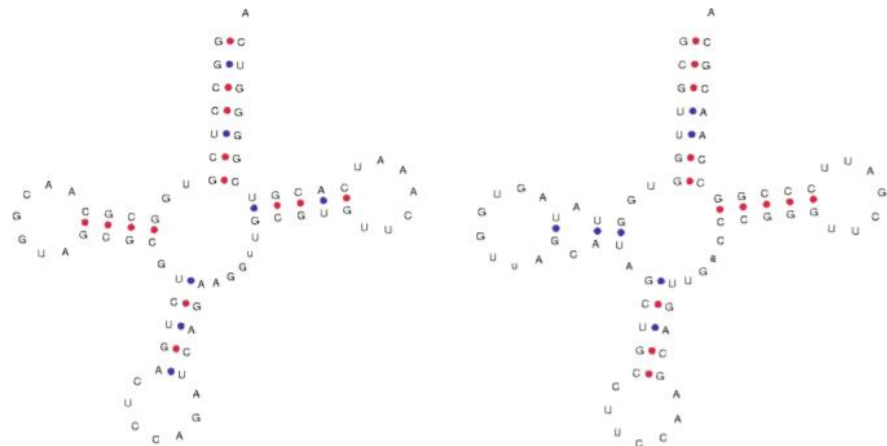


Risultati screening sup tRNA in base al segnale bioluminescente

High-throughput screening degli ACE-tRNA

ANALISI ACCURATEZZA NELLA TRADUZIONE

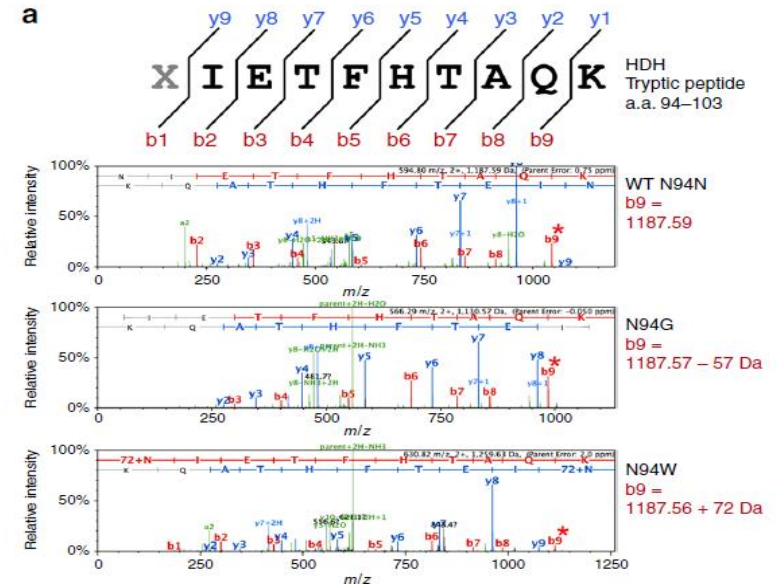
Risultati allo spettrometro di massa



Trp-chr17.trna39
UGA and UAG

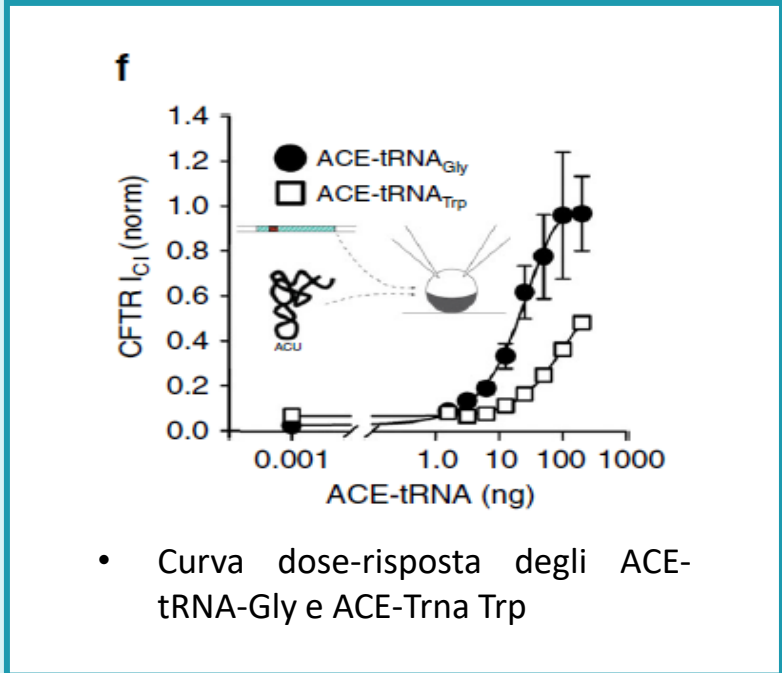
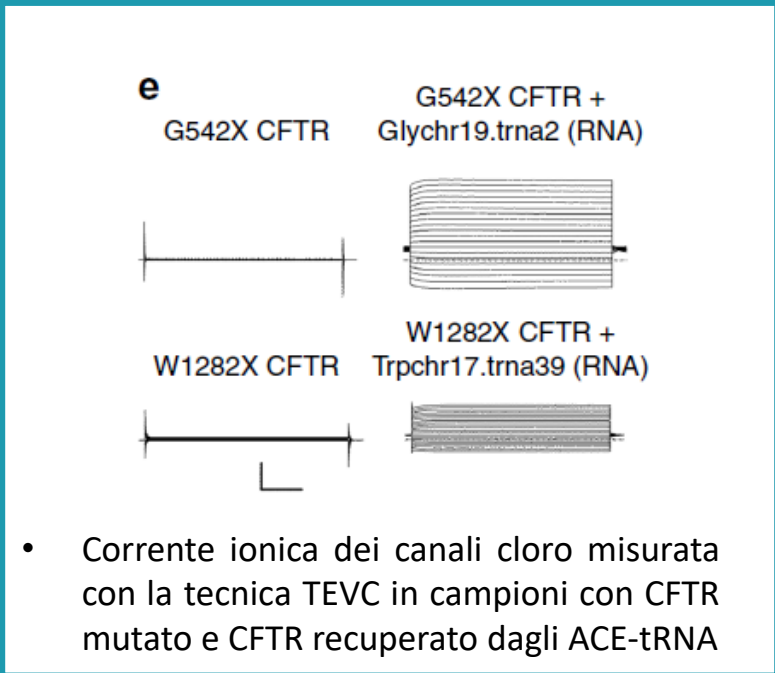
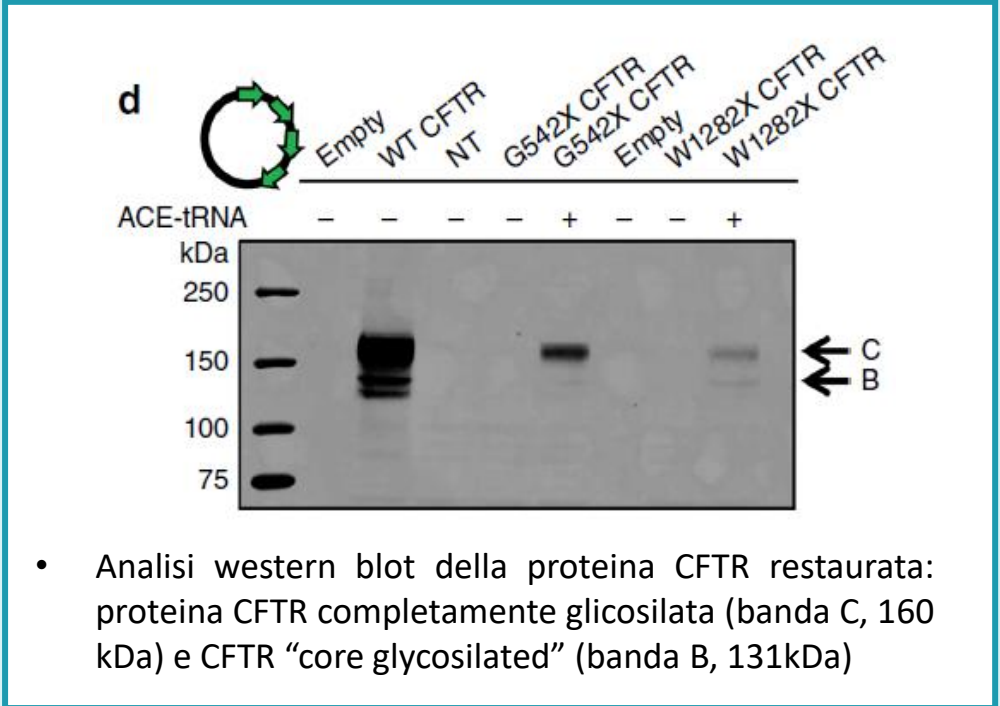
Gly-chr19.trna2
UGA

- ACE-tRNA utilizzati per la soppressione di HDH mutata a livello dell'asparagina 94

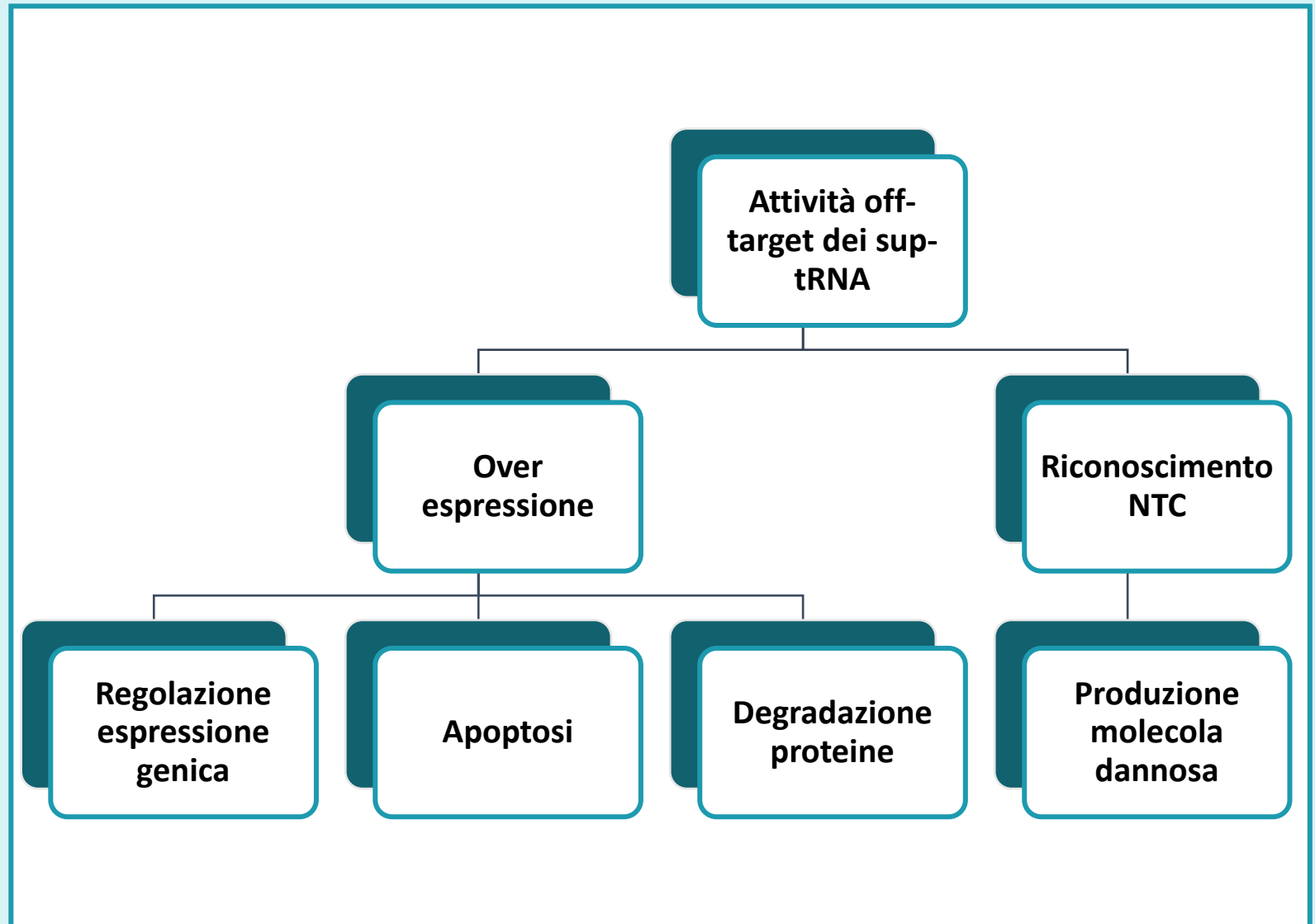


- Shift di - 57Da di HDH restaurata da Gly-ACE-tRNA rispetto alla proteina WT;
- Shift di + 72Da di HDH restaurata da Trp-ACE-tRNA rispetto alla proteina WT;

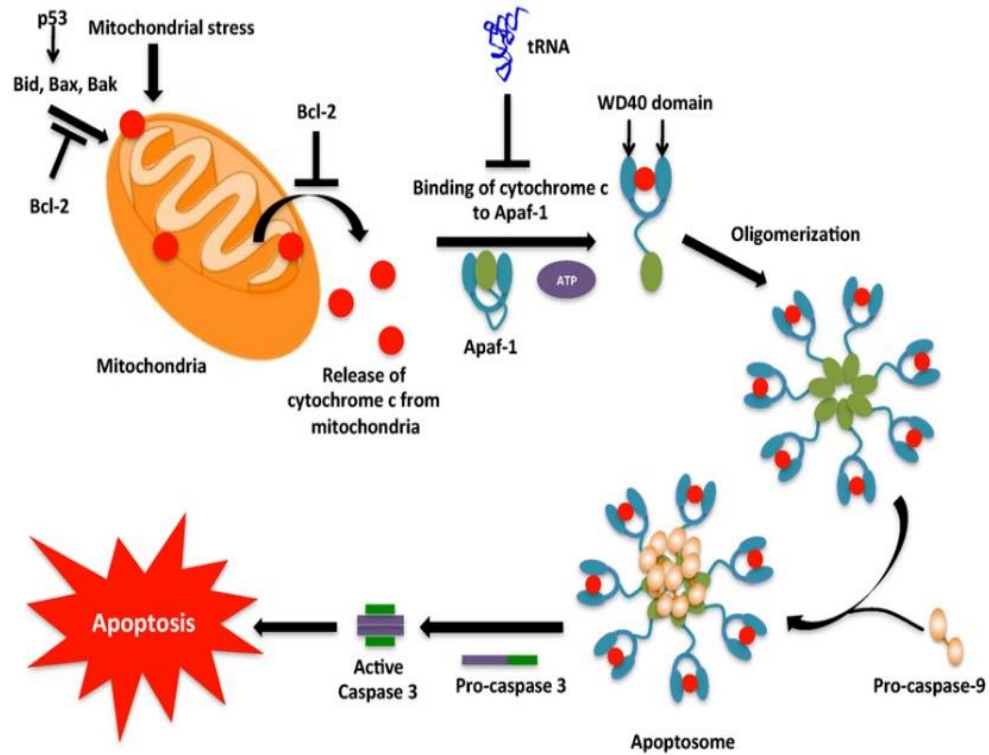
Soppressione del gene CFTR



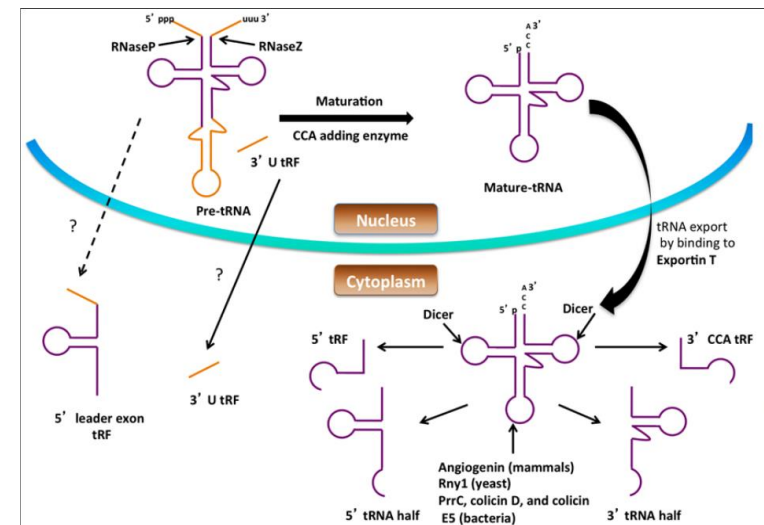
ASPETTI NEGATIVI



Over-espressione dei tRNA

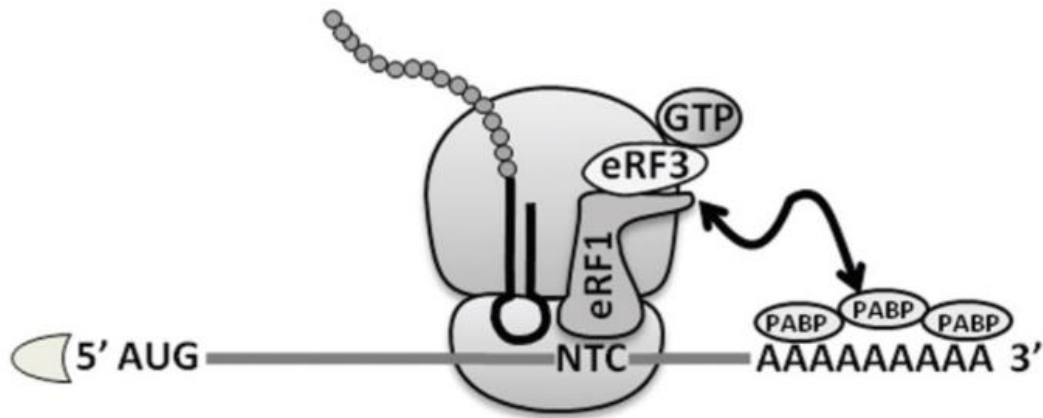


- Ruolo inibitorio dei tRNA nella via mitocondriale dell'apoptosi

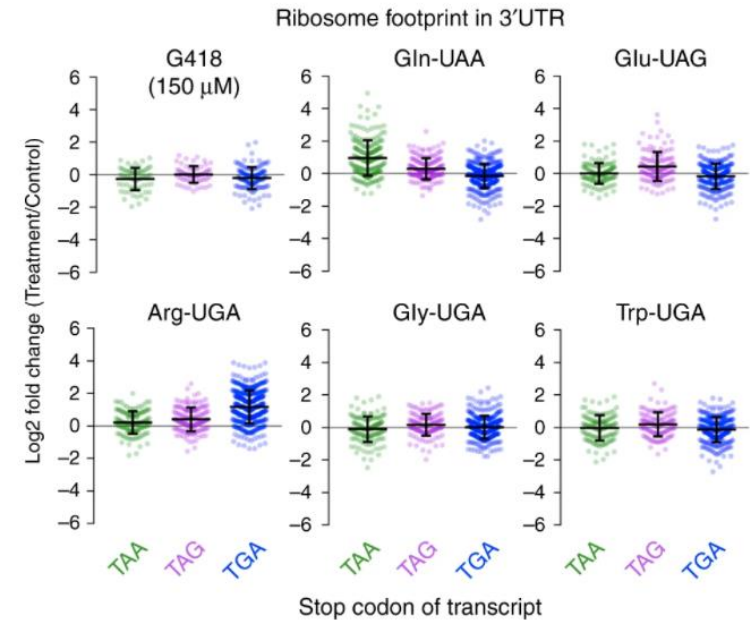


- Formazione frammenti di RNA

Lettura dei normali codoni di stop NTC



- Le PABP sono in grado di legare sia la coda di poly(A) dell'RNA messaggero che il fattore di rilascio eRF3, stimolando direttamente la terminazione della traduzione



- Rappresentazione grafica dell'analisi ribosome footprinting in 3'UTR: in ACeRNAGln-UAA e Arg-UGA si osserva un aumento della densità della regione 3'UTR

CONCLUSIONI

POTENZIALITÀ

- Fedeltà nella traduzione
- Soppressione *in vitro* e *in vivo*
- Limitata lettura dei NTC

ULTERIORI STUDI

- Valutare efficienza dei sup-tRNA in base al tipo di cellula e tessuto
- Ottimizzare il metodo di trasporto
- Valutare effetti a lungo termine

- Porter, JJ, Heil, CS, Lueck, JD. Therapeutic promise of engineered nonsense suppressor tRNAs. *WIREs RNA*. 2021; 12:e1641. <https://doi.org/10.1002/wrna.1641>
- Lueck, J.D., Yoon, J., Perales-Puchalt, A. et al. Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nat Commun* 10, 822 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08329-4>
- Catherine R. O’Riordan, Amy L. Lachapelle, John Marshall, Elizabeth A. Higgins, Seng H. Cheng, Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Glycobiology*, Volume 10, Issue 11, 1 November 2000, Pages 1225–1233, <https://doi.org/10.1093/glycob/10.11.1225>
- Schimmel, P. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 45–58 (2018)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Raina, M., & Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in Genetics*, 5, 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00171>
- Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., et al. (2010). tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol. Cell* 37, 668–678. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.023
- Maciej Dabrowski et al. (2015) Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes – The impact of RNA sequence, *RNA Biology*, 12:9, 950-958, DOI: 10.1080/15476286.2015.1068497

RIASSUNTO

Le mutazioni nonsense sono la causa del 10 – 15% delle malattie genetiche ereditabili, come la fibrosi cistica, la distrofia muscolare di Duchenne etc. Trovare una terapia genica porterebbe ad un grande progresso nel campo biomedico. Una delle possibili strategie nel sopprimere le mutazioni nonsense è l'utilizzo dei sup tRNA: sono tRNA con anticodoni modificati tali da poter riconoscere codoni di stop e inserire un amminoacido specifico in questo punto, inibendo la terminazione prematura.

Questa molecola ingegnerizzata è stata analizzata sotto vari aspetti per: (I) identificare i sup tRNA che hanno un'attività di soppressione soddisfacente; (II) verificare l'inserimento corretto degli AA a livello dei PTC; (III) esaminare la lettura dei naturali codoni di stop; (IV) testare la soppressione del gene CFTR mutato.

Nonostante i buoni risultati ottenuti da queste analisi, molti aspetti devono essere studiati per rendere questa tecnologia una terapia funzionale e sicura, come capire gli effetti tossici legati ad un'over-espressione dei tRNA, valutare il tasso di soppressione in base al tipo di cellula e tessuto e progettare una via di somministrazione ottimale.