



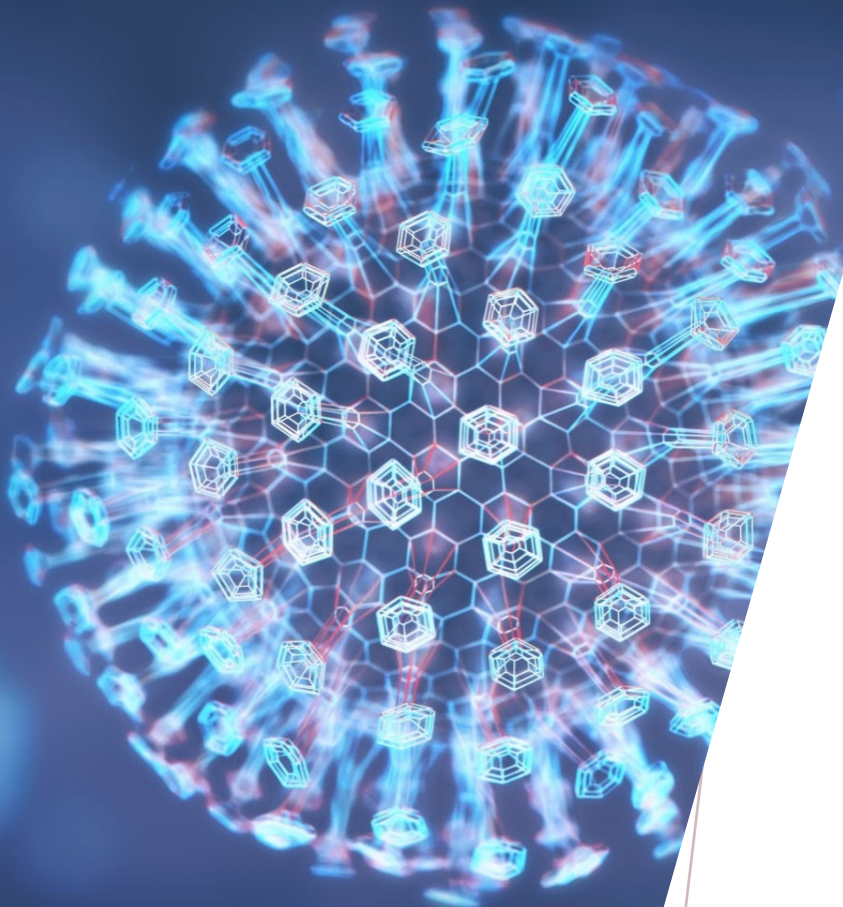
Laurea triennale in Scienze Biologiche
A.A. 2022/2023

«MECCANISMI MESSI IN ATTO DAI VIRUS
PER REGOLARE L'ESPRESSIONE GENICA»

«RNA LEVERS AND SWITCHES
CONTROLLING VIRAL GENE EXPRESSION»

Docente referente
Prof.ssa La Teana Anna

Laureanda
Marzi Nicole

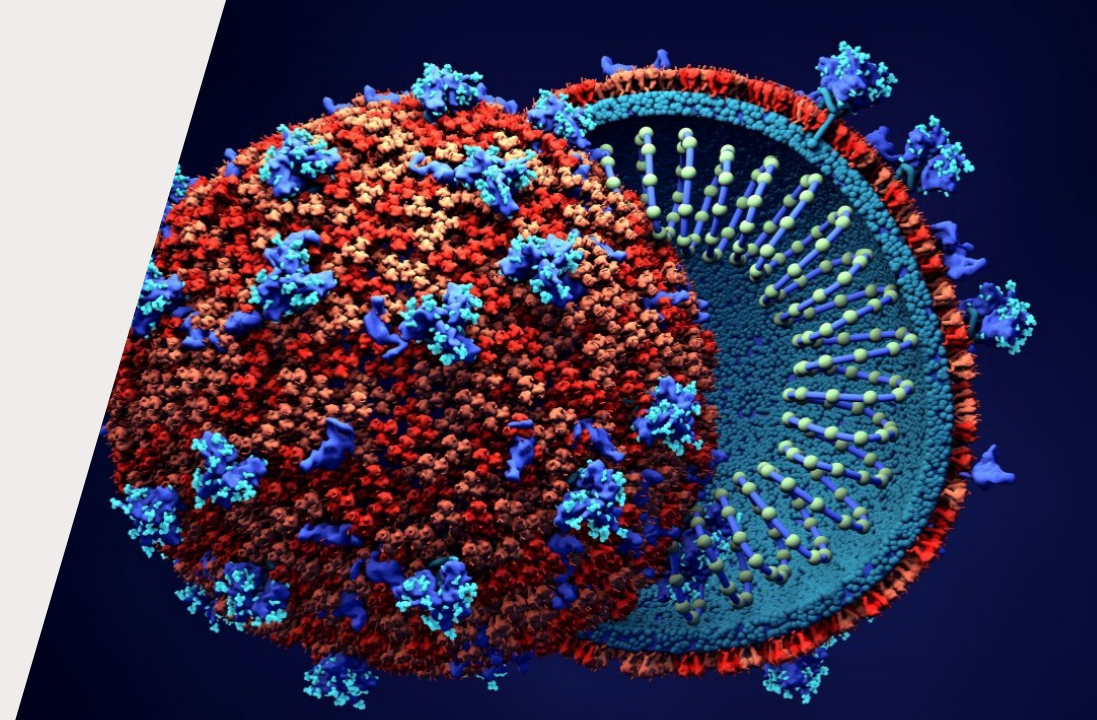


Introduzione

I virus a RNA sono patogeni diversi e abbondanti responsabili di numerose malattie umane.

Questi virus hanno sviluppato molteplici meccanismi per massimizzare le loro capacità di codifica, come lo splicing alternativo e lo slittamento dei ribosomi per produrre molte proteine diverse.

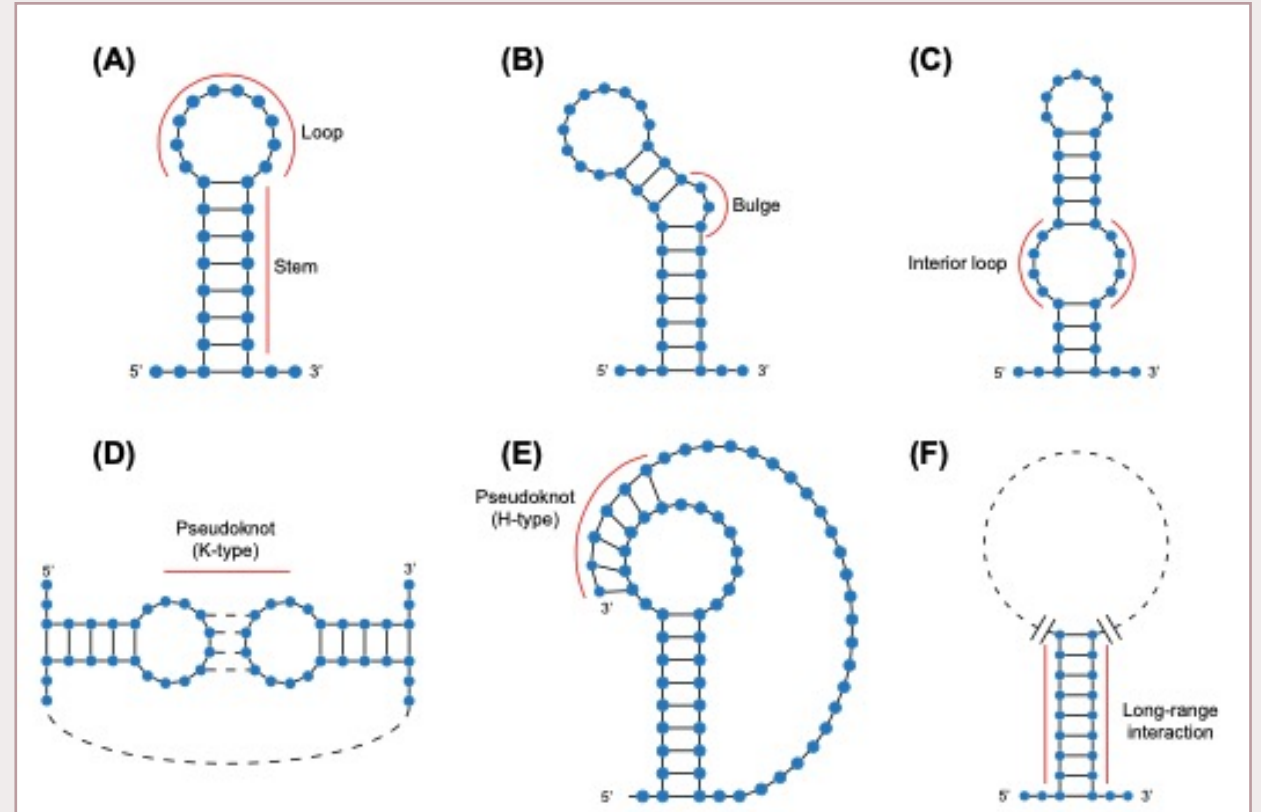
Queste soluzioni sono rese possibili dalla capacità del genoma a RNA di piegarsi in strutture tridimensionali in grado di mimare gli RNA cellulari, di dirottare proteine dell'ospite e di esporre o nascondere motivi di legame delle proteine regolatrici per controllare i processi chiave nel ciclo di vita del virus.



Motivi della struttura dell'RNA

Le molecole di RNA possono formare interazioni di accoppiamento delle basi, generando strutture secondarie e terziarie che svolgono ruoli funzionali specifici.

A causa dell'eterogeneità delle molecole degli RNA più grandi, la risoluzione delle loro strutture è complessa.

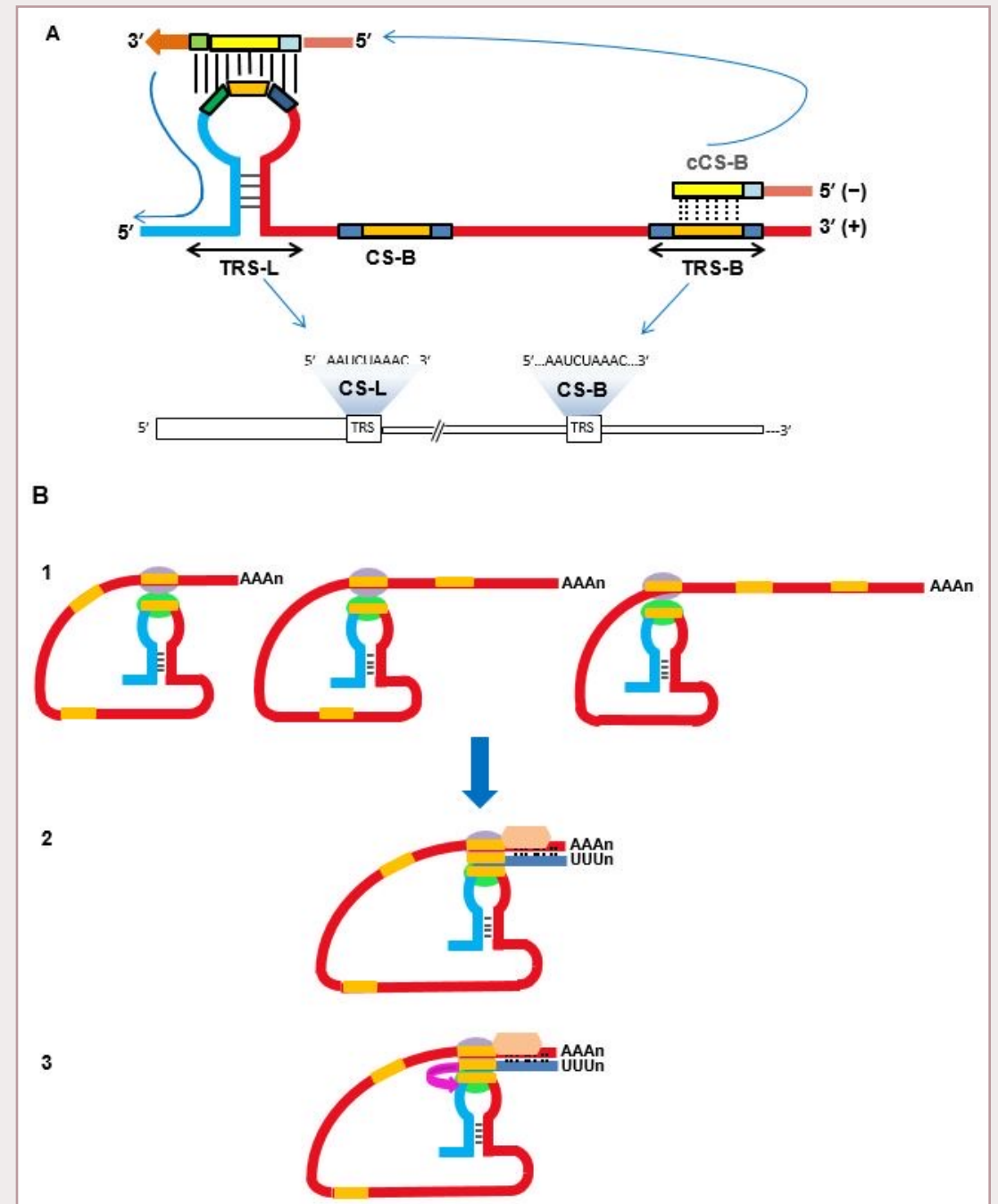


Trascrizione discontinua

La replicazione dei coronavirus coinvolge la produzione di sgRNA attraverso un processo di trascrizione discontinua, utilizzando specifiche sequenze di regolazione della trascrizione (TRS-B e TRS-L) per guidare la replicasi attraverso il genoma virale.

Meccanismo:

- Il complesso replicasi raggiunge il TRS-B all'estremità 5' dell'RNA più-senso.
- La replicasi e l'RNA meno-senso nascente si staccano e si legano all'unico TRS-L presente, saltando 20-30 kb della sequenza.
- L'RNA meno-senso viene utilizzato per la sintesi di nuovi RNA più-senso, dai quali verranno tradotte le proteine strutturali del virus.

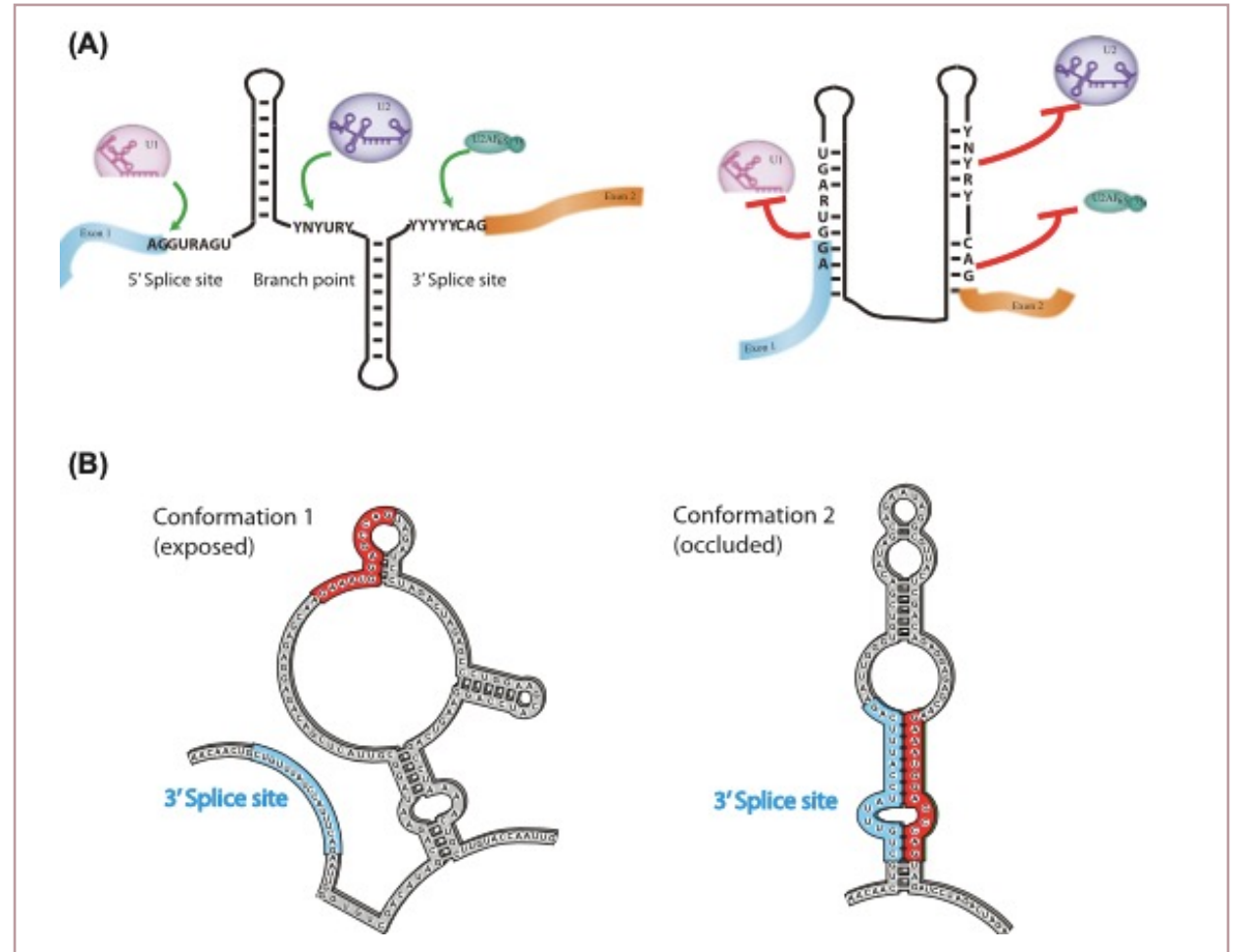


Splicing alternativo

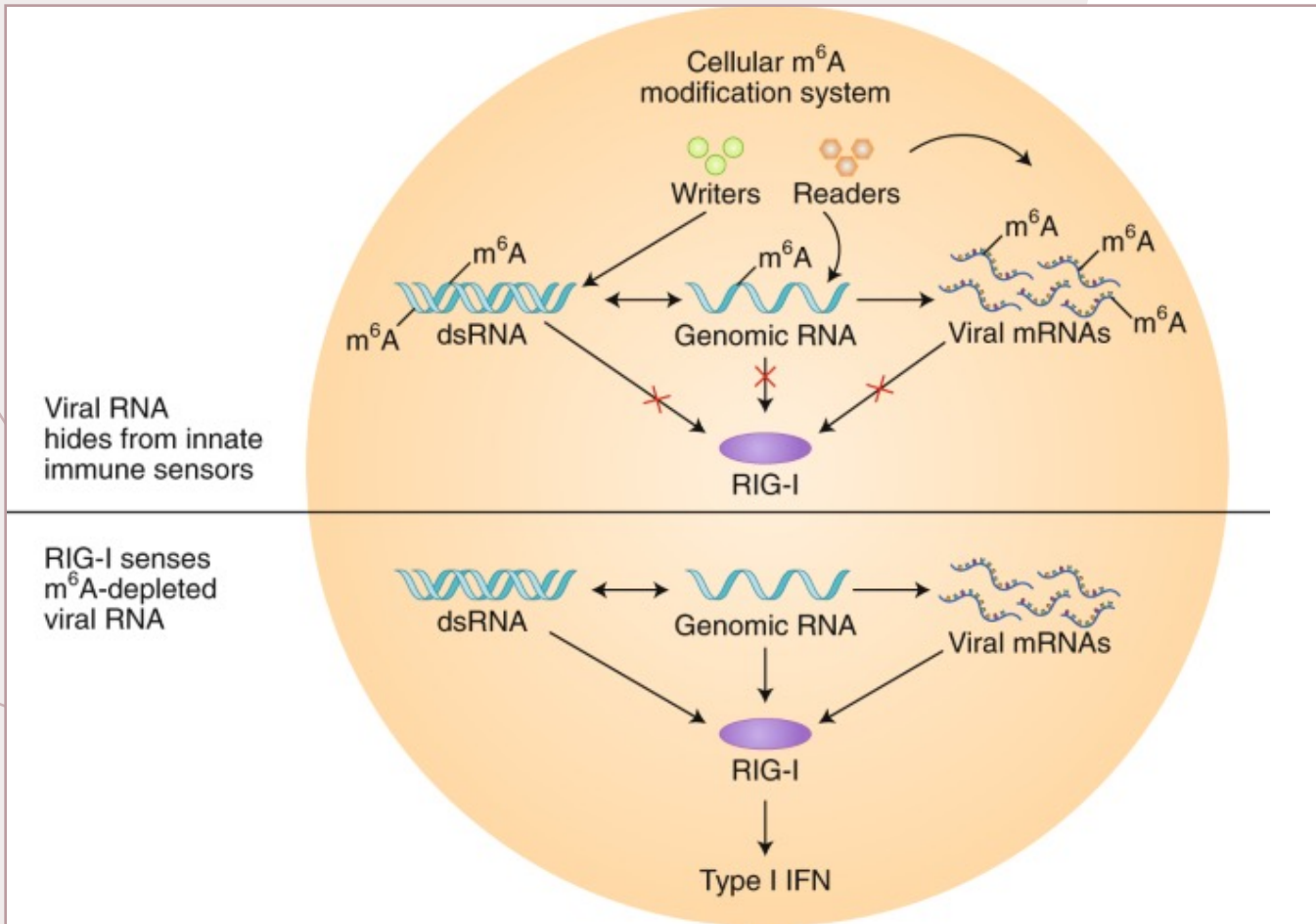
I virus a RNA che entrano nel nucleo dell'ospite possono utilizzare il processo di splicing alternativo per esprimere molteplici trascritti da una sequenza genomica, regolando così l'espressione genica.

Lo splicing è mediato da siti di splicing, riconosciuti dalle piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP), come U1 e U2/U2AF.

La capacità di attivare o inibire lo splicing dipende dall'accessibilità dei siti di splicing, che può essere influenzata dalla formazione di strutture dell'RNA.

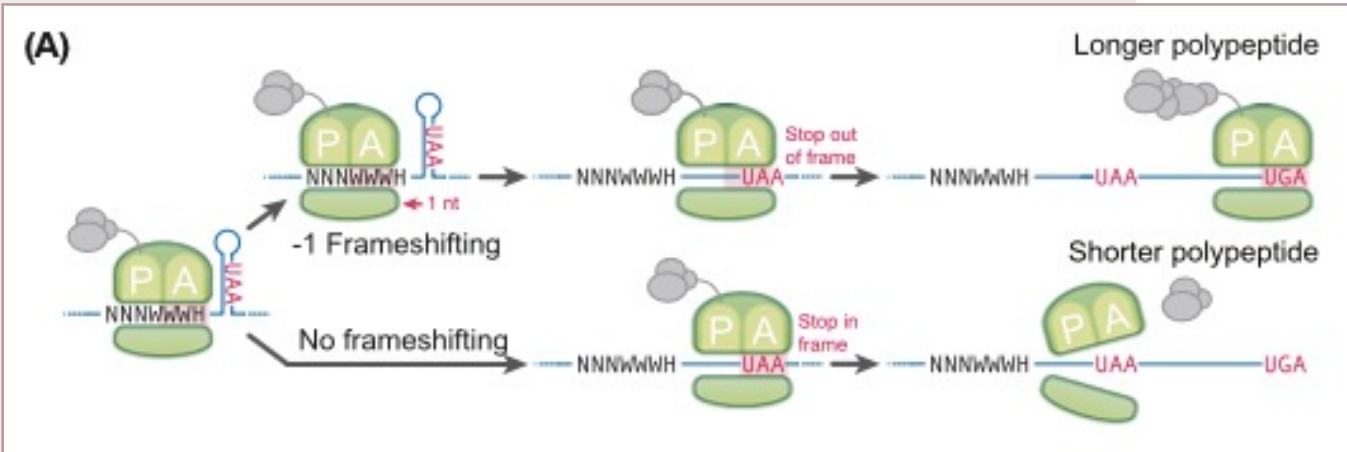


Modificazioni post-trascrizionali dell'RNA



È stato evidenziato che cellule infette da VSVS (virus della stomatite vescicolare) presentavano maggior numero di modifiche m⁶A (N6-metiladenosina) e che, di conseguenza, il recettore RLR E RIG-I dell'immunità innata mostravano minore affinità per gli RNA virali con tali modifiche.

Recenti studi hanno implicato inoltre proteine liganti l'RNA che leggono modifiche dell'RNA. Tra queste troviamo il lettore m⁶A YTHDF associato agli RNA m⁶A modificati di HCV e HBV.



Programmed Ribosomal Frameshifting

Il PRF nei virus a RNA è un meccanismo cruciale per la regolazione della traduzione e l'espressione di proteine virali essenziali.

Tale processo ha implicazioni significative nella biologia virale e rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico.

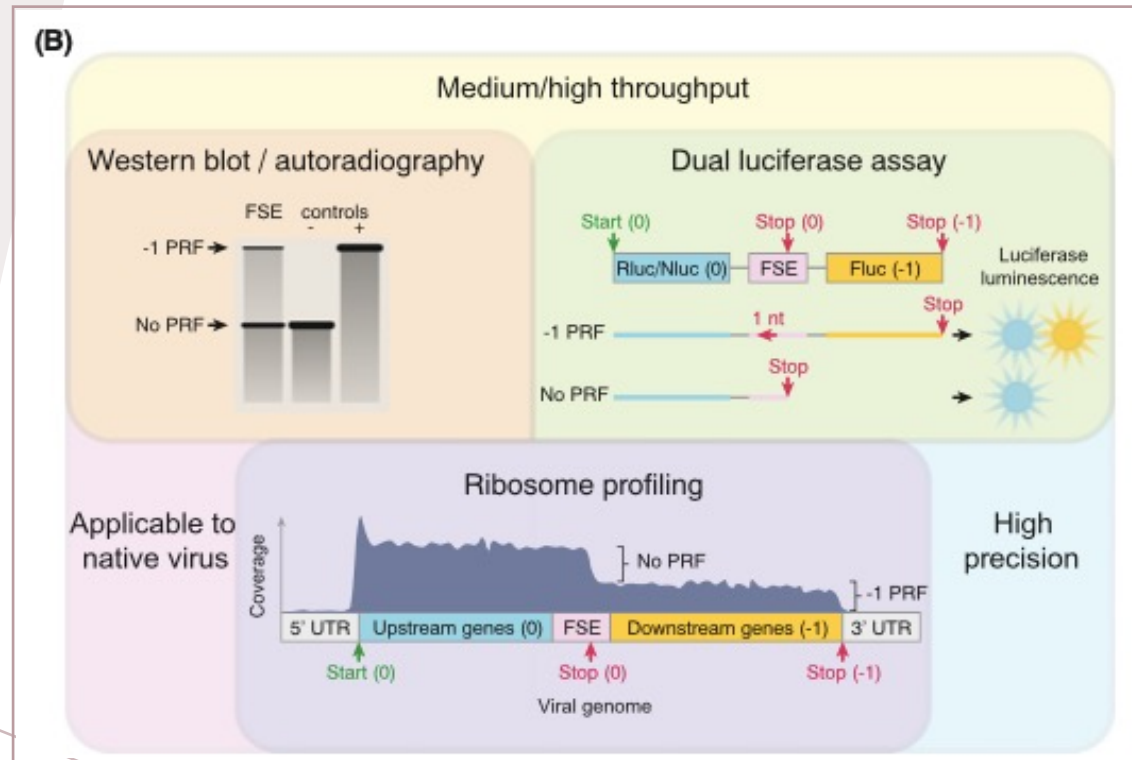
Metodi per misurare l'efficienza del PRF

Utilizzando reporter artificiali:

- Elettroforesi proteica seguita da autoradiografia o western blotting
- Saggi della doppia luciferasi
- Saggi di fluorescenza

Su cellule infette da virus:

- «Ribosome profiling»

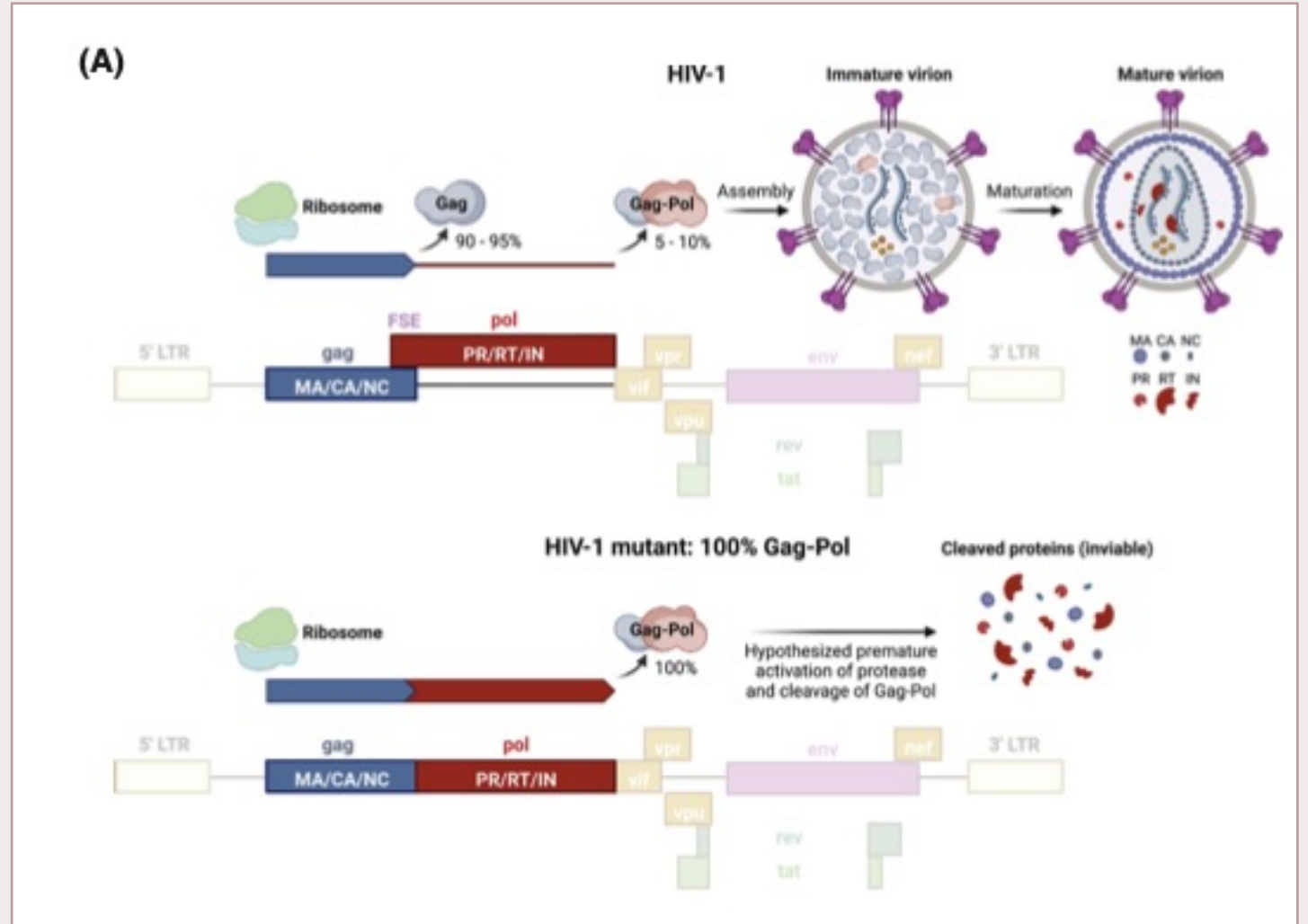


La probabilità di un ribosoma di slittare spontaneamente è molto bassa, ma può essere aumentata fino all'80% da un elemento stimolante il frameshift (FSE). Utilizzando un PRF un ribosoma può portare alla traduzione di due polipeptidi differenti.

Nella maggior parte dei FSE virali noti, i ribosomi slittano indietro di 1 nt (PRF-1).

Nei retrovirus come HIV-1, il PRF-1 porta alla produzione della proteina Gag-Pol, che contiene enzimi come la trascrittasi inversa (RT).

È inoltre fondamentale per la generazione di virioni.



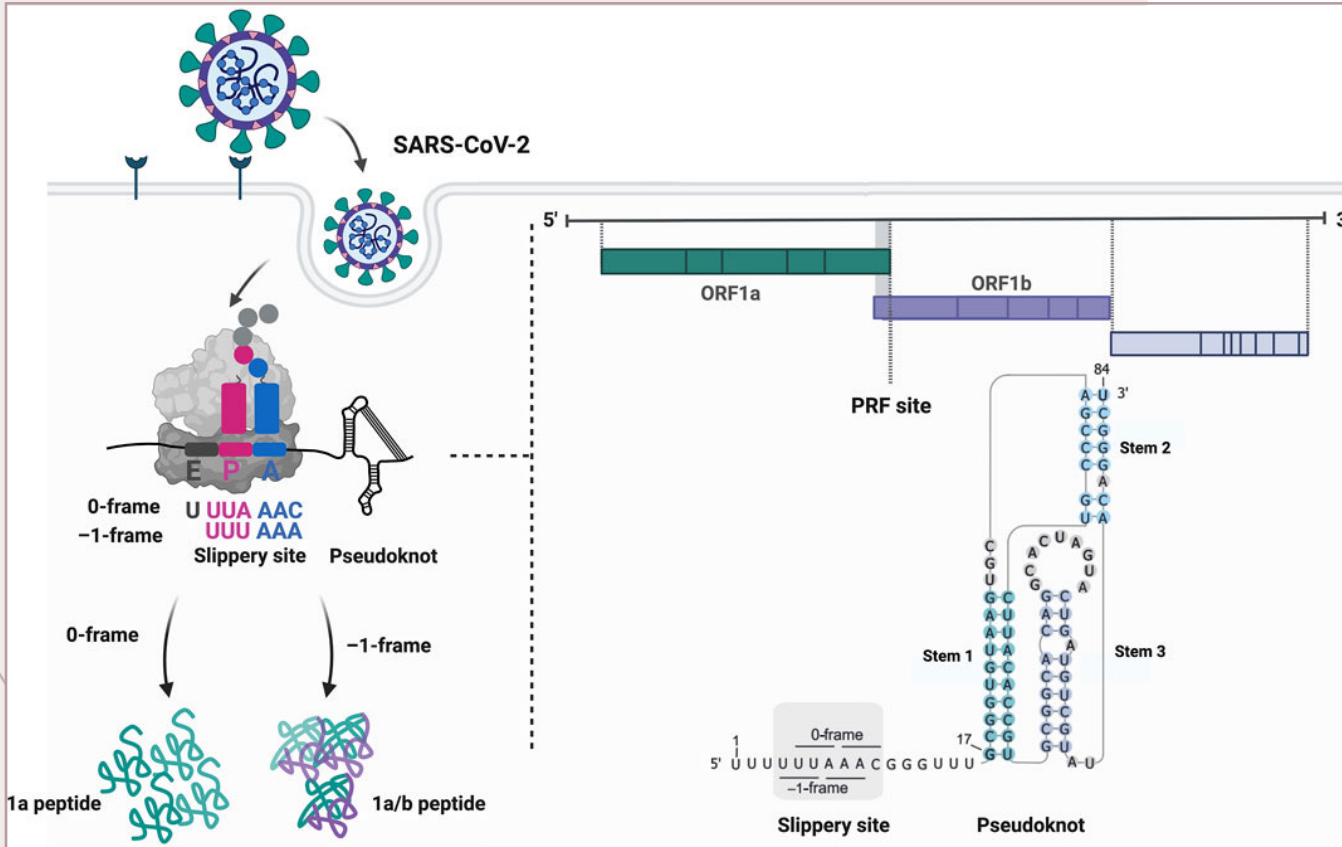
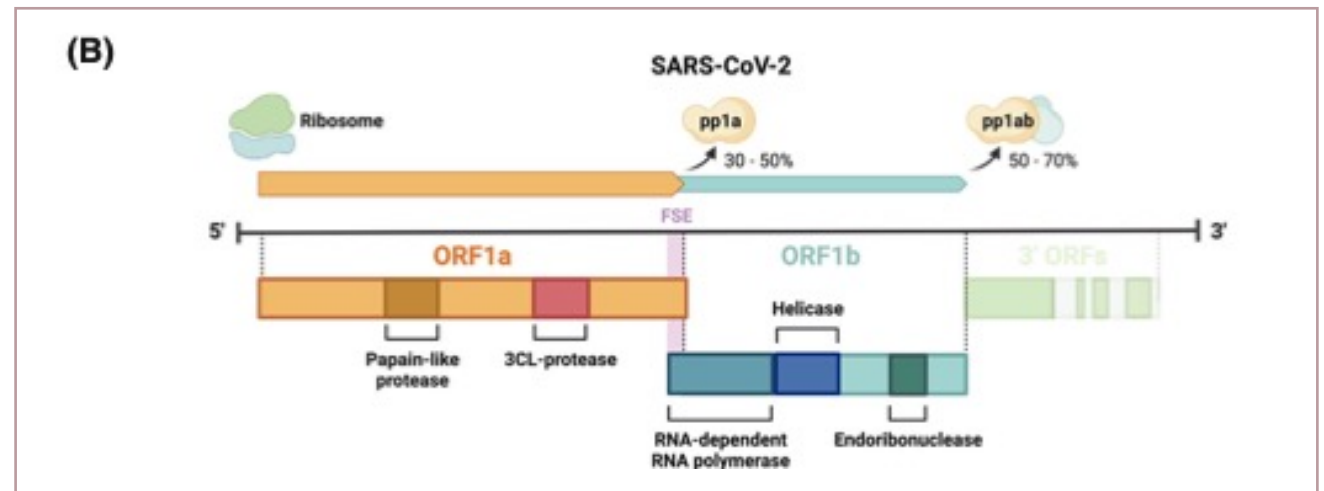


Immagine presa da "Thinking Outside the Frame: Impacting Genomes Capacity by Programmed Ribosomal Frameshifting" Ricarda J. Riegger and Neva Caliskan

Prevedibilmente impedire il PRF ha attenuato la replicazione del coronavirus, rimane però poco chiaro perché sarebbero svantaggiati dall'esprimere ORF1b tanto quanto ORF1a, a differenza dei retrovirus pol e gag.

Ogni coronavirus codifica proteine non strutturali in ORF1a e ORF1b.

Alla fine di ORF1a alcuni ribosomi vengono diretti in ORF1b (frame-1) da un FSE.



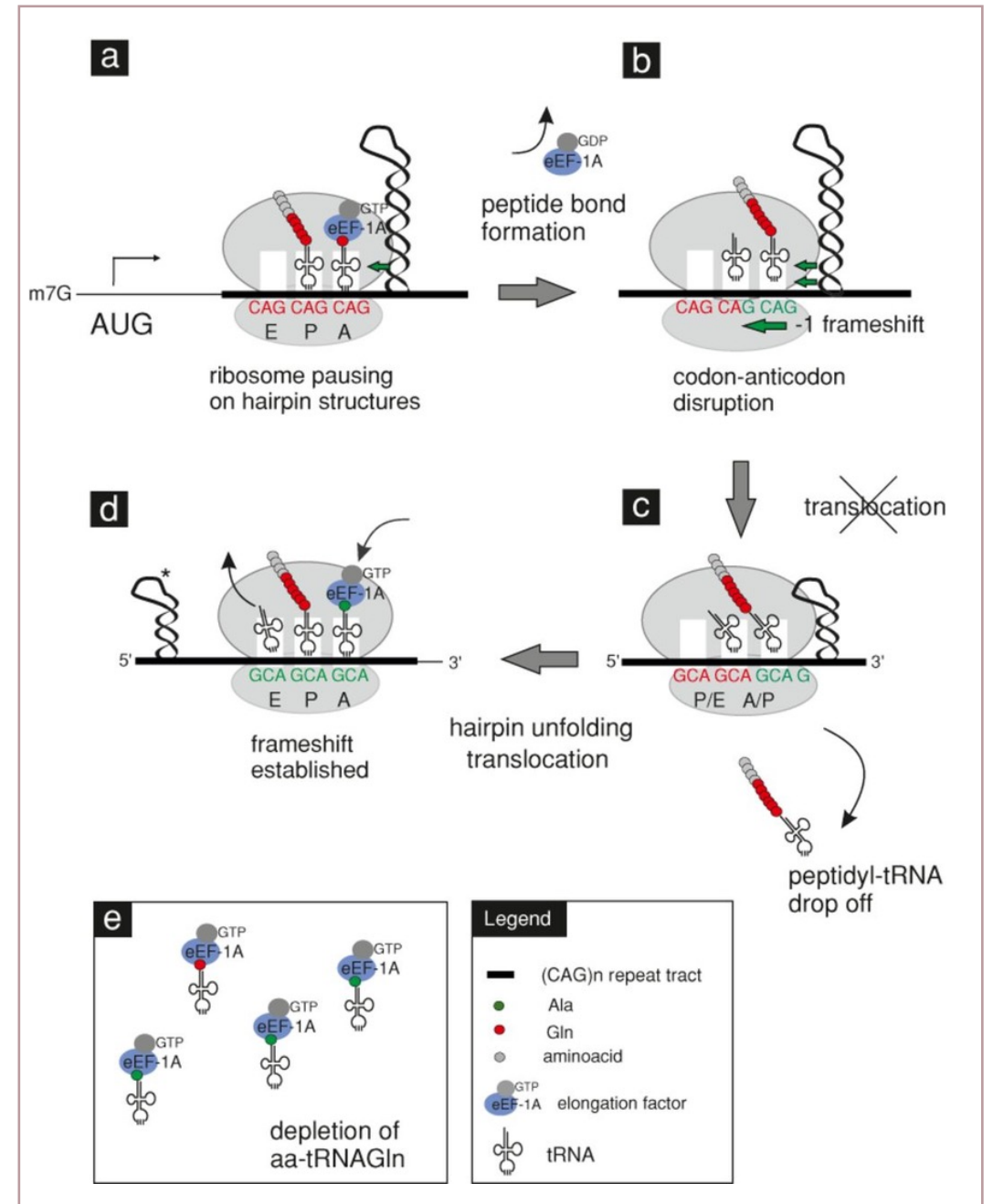
Il PRF coinvolge il blocco del ribosoma, lo slittamento e le modifiche strutturali dell'mRNA.

Durante la traduzione, il ribosoma, incontrando un sito "scivoloso" sull'mRNA, si blocca a causa di un ostacolo a valle, tipicamente una struttura dell'RNA.

L'mRNA entra nel canale di ingresso del ribosoma, bloccando la traslocazione e il ribosoma uno stato ruotato non canonico.

FSE stimola il ribosoma durante la traslocazione, durante questo processo, il tRNA nel sito A è spinto nel sito P da eEF2, ma una struttura ostacolante impedisce al suo anticodone di seguirlo completamente.

Questa traslocazione parziale causa la piegatura del tRNA, facendo retrocedere di 1 nt il codone nel sito A.



Terapie antivirali mirate

Poiché molte strutture dell'RNA sono importanti per l'espressione genica virale, le terapie mirate all'RNA virale sono un campo promettente ma finora poco studiato.

Terapie mirate SARS-CoV

Sono state individuate piccole molecole mirate all'inibizione del PRF come MTDB, covidcil-19 e merafloxicina

Oltre a queste sono stati individuati oligonucleotidi antisenso (ASO) a nucleico acido chiuso (LNA) mirati a SL1 nell'UTR 5' di tutti gli RNA.

Terapie mirate IAV

La progettazione di ASO mirati a PSL2 ha prodotto risultati promettenti verso una terapia antinfluenzale 'universale'.

Fase di somministrazione	Percentuale di sopravvivenza
Profilattica (1-14 gg prima dell'infezione)	100%
Post-infezione (3 giorni dopo l'infezione)	65% - 100%

Terapie antivirali mirate HCV

Per il trattamento dell'epatite C sono stati individuati due inibitori, sofosbuvir e velpatasvir, che bloccano l'azione di due proteine essenziali per la moltiplicazione del virus.

Sofosbuvir → inibisce polimerasi NS5BRNA-dipendente, essenziale per la replicazione virale

Velpatasvir → inibisce la proteina NS5A essenziale sia per la replicazione sia per l'assemblaggio dei virioni HCV.

Categoria Pazienti	Numero di pazienti	Percentuale di Risultato Negativo a 12 settimane
Adulti con fegato funzionante	1.035	98%
Adulti con cirrosi di classe B	87	84%
Bambini (età > 6 anni)	173	94%
Bambini (età 3-5 anni)	41	83%

Conclusioni

Sono state analizzate le scoperte sulle strutture dell'RNA virale, il loro ruolo nella regolazione genica e il loro potenziale come bersagli terapeutici.

Gli avanzamenti nei metodi di studio hanno permesso una migliore comprensione delle strutture dell'RNA nelle cellule viventi. La ricerca su SARS-CoV-2 ha rivelato come le strutture dell'RNA influenzino la traduzione dell'ospite e stimolino l'elusione ribosomica, e come disturbando esse si possa sopprimere la replicazione virale.

Poiché le strutture dell'RNA giocano ruoli così diversi e integrali nel ciclo di vita virale, studi futuri forniranno una migliore comprensione di come i virus dirottino le cellule ospiti e consentiranno nuove classi di terapie antivirali mirate a strutture di RNA cruciali.

Bibliografia

“RNA levers and switches controlling viral gene expression”

Matthew F. Allan Amir Brivanlou,¹ and Silvi Rouskin

Sitografia

- https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/epclusa-epar-medicine-overview_it.pdf
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/epclusa-epar-product-information_it.pdf