



**Università Politecnica delle Marche**  
**Dipartimento scienze della vita e dell'ambiente**

**corso di laurea**  
**scienze biologiche**

**TERAPIE BASATE SULL'RNA PER AMPLIFICARE L'ESPRESSIONE GENICA**

**RNA-BASED THERAPEUTICS TO AMPLIFY GENE EXPRESSION**

Tesi di Laurea di:

Elena Donzellini

Docente Referente:

Chiar.mo Prof.:

Anna La Teana

Sessione Autunnale Ottobre 2024

Anno accademico: 2023/2024

# Nuove terapie ed uso dei ncRNA

Terapie basate sull'interazione proteina-proteina

Ma per le malattie causate da un'insufficiente espressione genica?

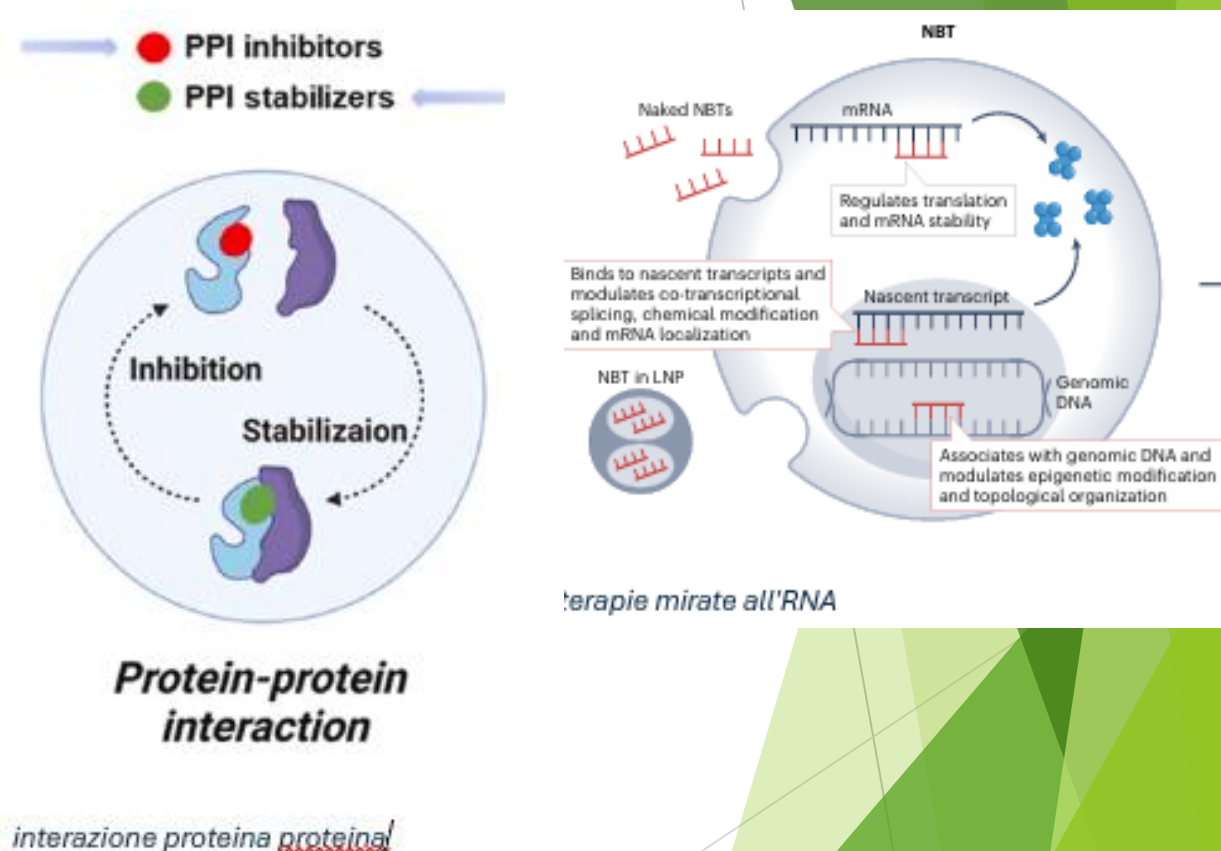
ncRNA

Nuove terapie basate sugli acidi nucleici

lncRNA:

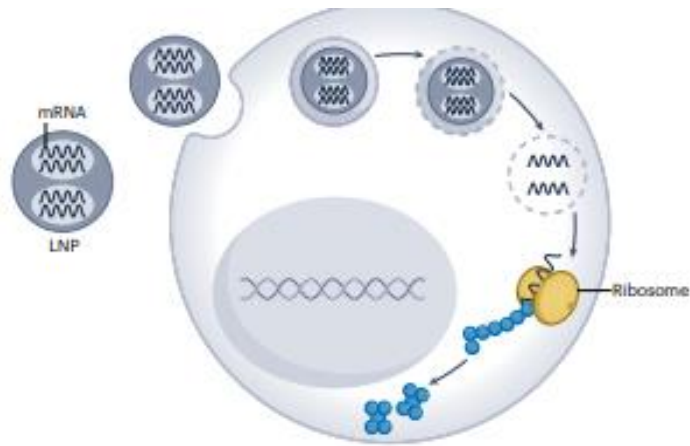
- ▶ lincRNA
- ▶ NAT

Sviluppo di terapie basate sugli acidi nucleici (NBT) e il loro effetti sulla sintesi proteica e sugli RNA



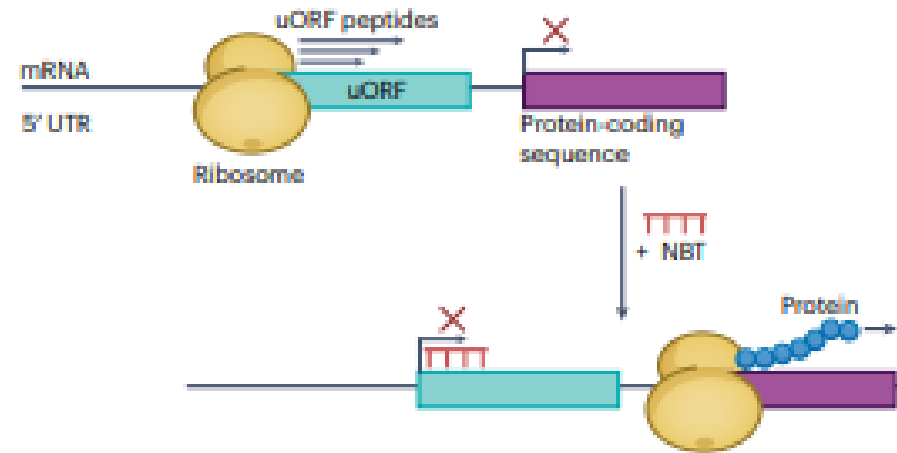
# Nucleic Acid Based Therapeutics

Gli NBT che aumentano la stabilità degli mRNA. Strategie appartenenti a questo gruppo comprendono mRNA delivery e gli NBT che usano l'attività dei NAT, pRNA, seRNA eRNA



mRNA delivery

NBT che ottimizzano la traduzione includono quelli che modulano la uORF di traduzione e i ncRNA che regolano l'inizio della traduzione e allungamento



uORF targeting NBT

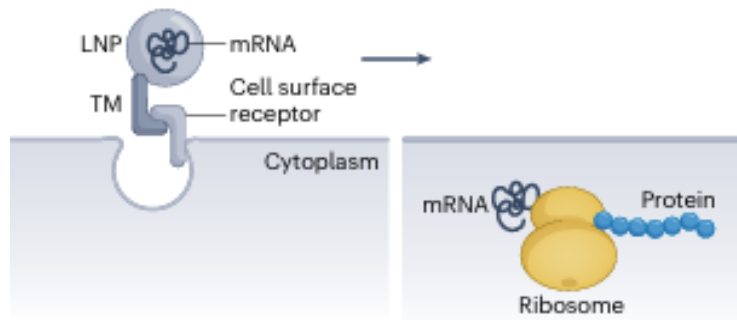
# mRNA Delivery produzione e trasporto

Un mRNA trascritto in vitro viene incapsulato in una nanoparticella lipidica, la quale viene introdotta nella cellula dove verrà tradotto.

trascrizione in vitro da un plasmide o dal template di una PCR

purificazione e nano precipitazione

incorporazione nel trasportatore LNP



mRNA delivery

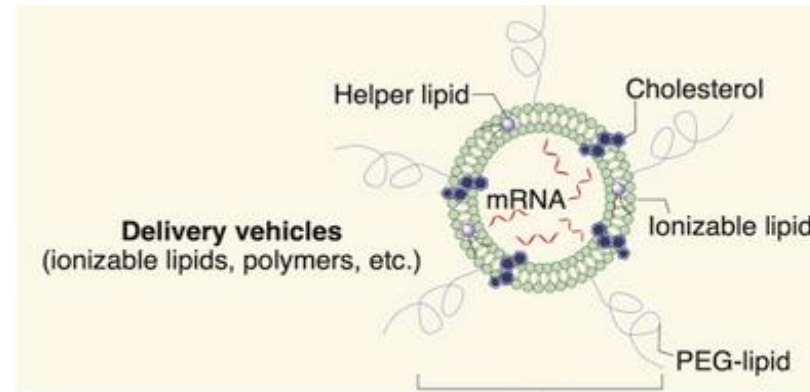
► LNP sono particelle densamente impacchettate con lipidi e acidi nucleici.

► Componenti:

Fosfolipidi

colesterolo e componenti PEG lipidici

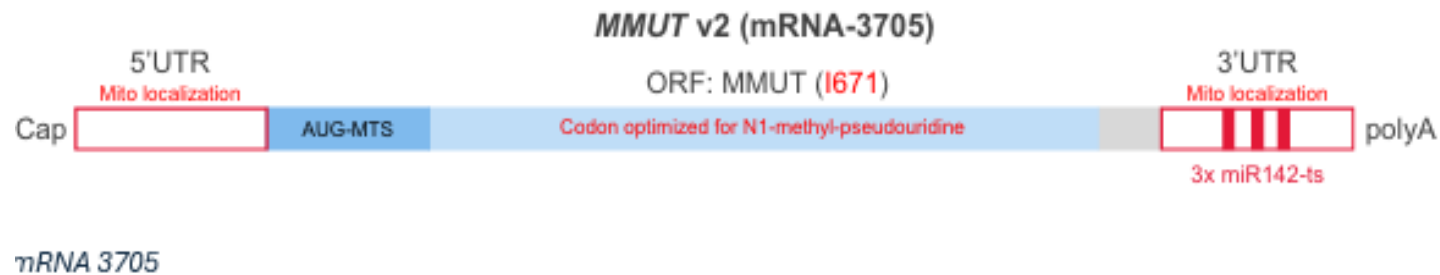
lipidi ionizzabili



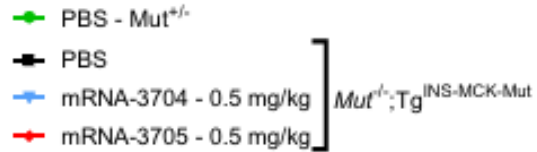
LNP

# MMA ed mRNA delivery

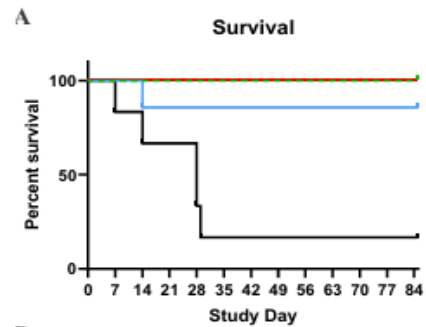
- MMA: malattia pediatrica rara causata dalla mancanza della proteina MMUT, metilmalonil CoA mutasi
- Modificazioni :
- 5' e 3' UTR
- N1pseudouridina
- Tre siti di legame per miRNA142
- Sostituzione valina in isoleucina



# Studio dei Topi Mut<sup>-/-</sup> Tg<sup>INS-MCK-Mut</sup>

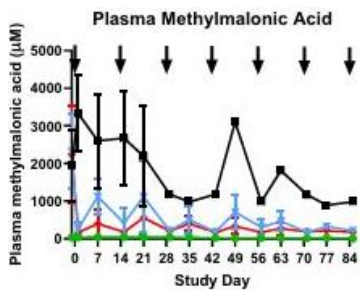


legenda



n

Sopravvivenza



concentrazione di acido metilmalonico per giorno nel plasma

▶ Studio Topi Mut<sup>-/-</sup> Tg<sup>INS-MCK-Mut</sup> durata 12 settimane

▶ Somministrazione endovenosa:

❓ mRNA3705

❓ PBS

▶ Risultati:

miglior sopravvivenza data mRNA3705 (durata per tutto lo studio)

morte dopo 29 giorni dei topi aventi ricevuto il controllo PBS

decremento del livello di acido malonico nel plasma

presenza di acido malonico in altri tessuti

concentrazioni basse di acido malonico nei topi Mut<sup>-/-</sup> Tg<sup>INS-MCK-Mut</sup> trattati con mRNA3705

La somministrazione di mRNA3705 ha reso stabili i livelli di acido malonico nei tessuti solitamente colpiti

# miRNA: regolazione dell'espressione genica e NBT

ncRNA in grado di degradare o bloccare l'attività mRNA interagendo in trans con esso e influenzandone la stabilità e traducibilità.

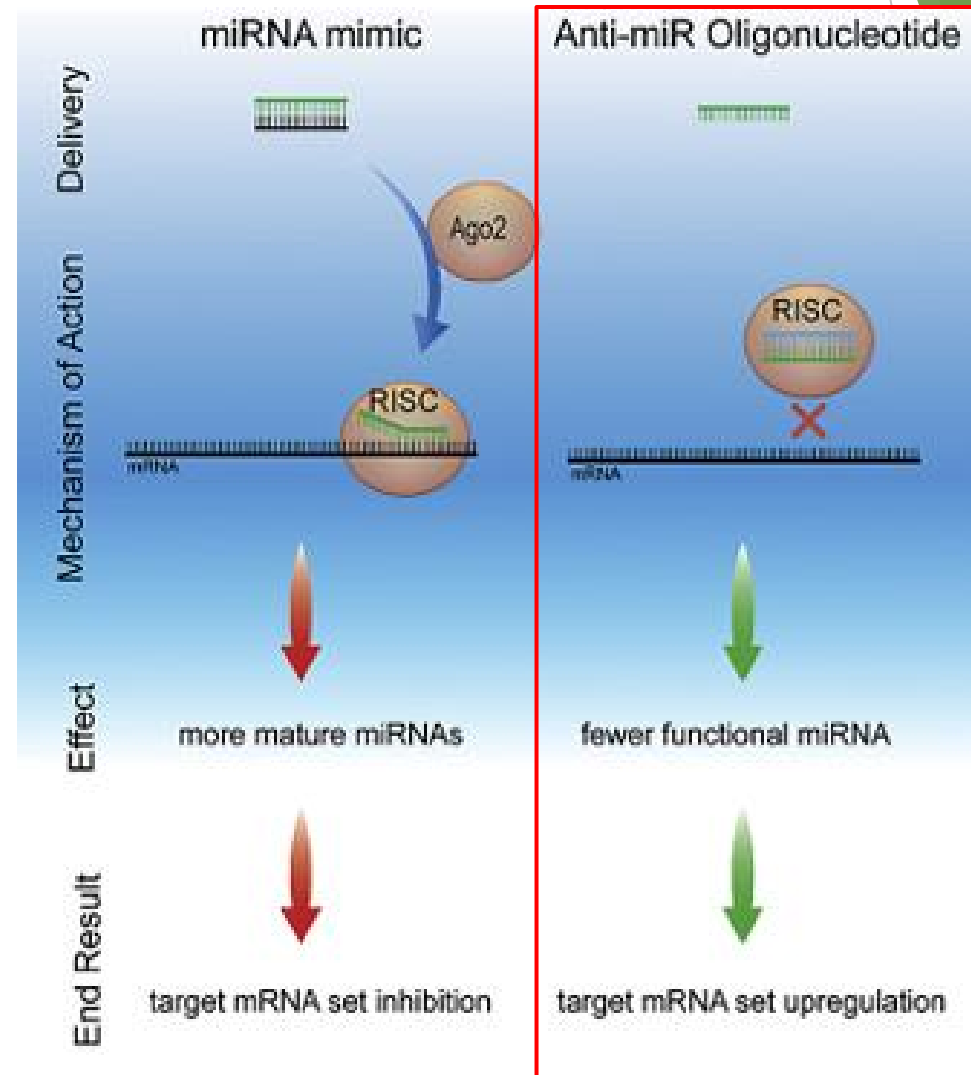
Deregolazione miRNA

↓  
Insorgenza di patologie

↓  
ASO

Promirs, amplificano l'attività del miRNA

Antagomirs, inibiscono l'attività del miRNA



*meccanismo azione di promirs e antagomirs*

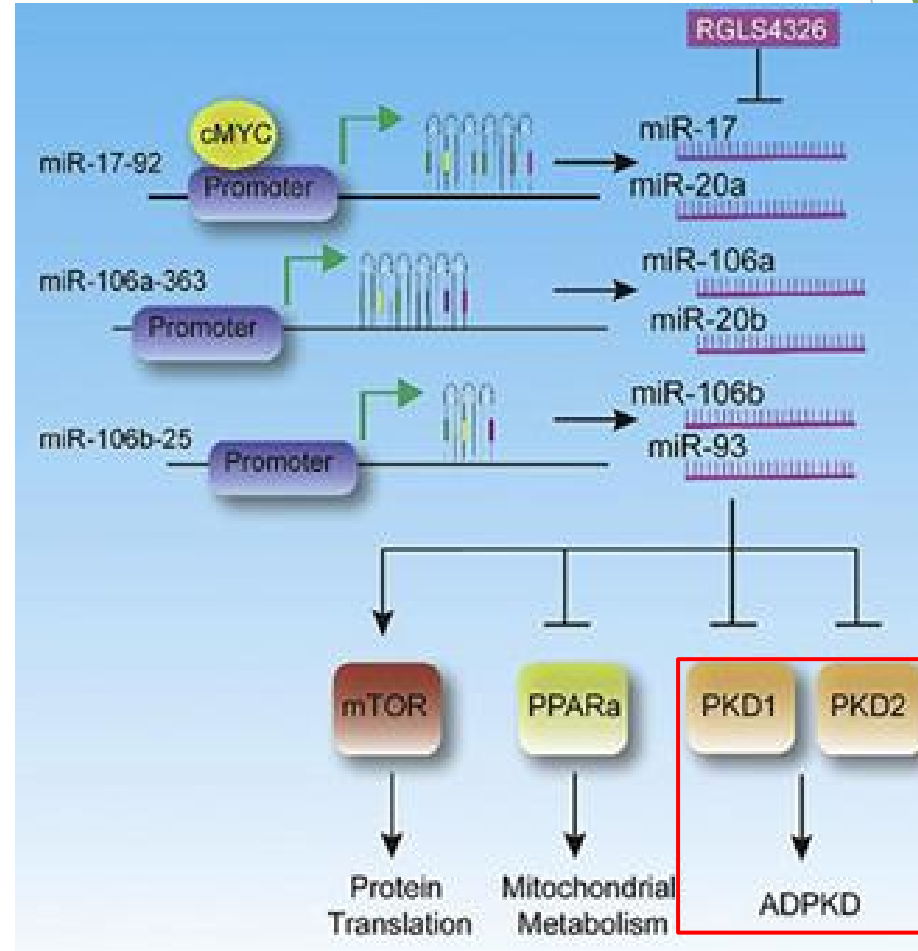
# ADPKD: ruolo miR-17 e RGLS4326

ADPK :Malattia policistica renale autosomica dominante

sovra regolazione miR-17 nell'adulto porta a ADPKD

Repressione geni *Pkd1* e *Pkd2*

RGLS4326: Anti miR-17 9 nucleotidi complementari alla regione seed



Vie di regolazione di miR-17



# RGLS4326 scoperta ed effetti

Screening dalla libreria di oligonucleotidi ed uso delle cellule HeLa e della luciferasi

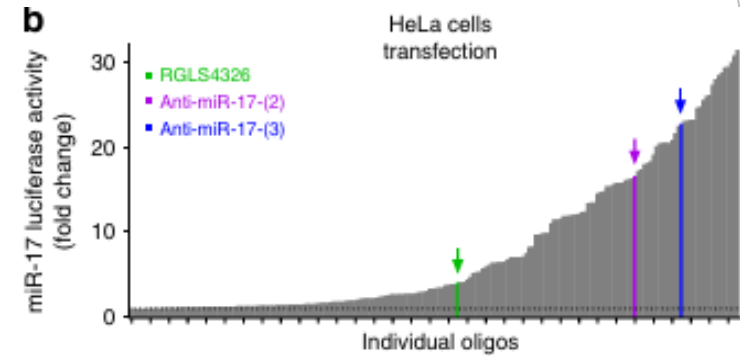
miR-17 PD-Sig

De repressione *Pkd1* e *Pkd2* nel dotto collettore

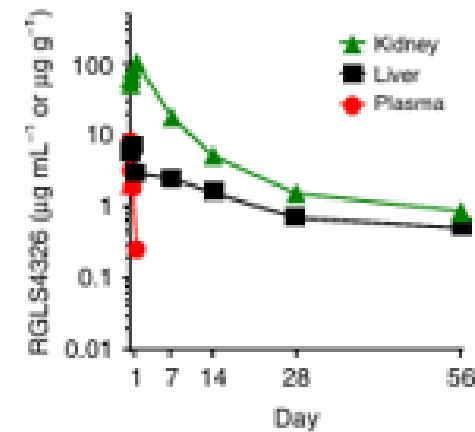
RGLS4326 test in vitro con colture cellulari umane

Espressione di PC1 e PC2

Rapido assorbimento nel plasma



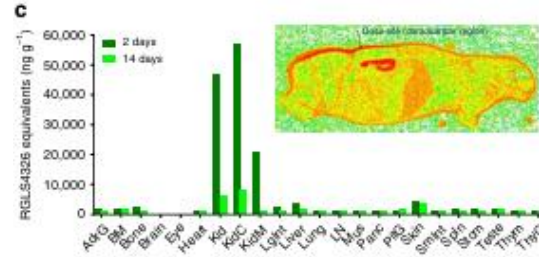
segnale luciferasi dato dai 190 nucleotidi nelle cellule HeLa



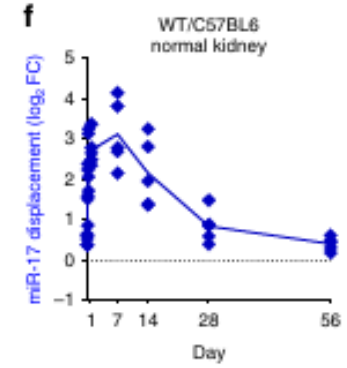
uptake nel rene di RGLS4326

# RGLS4326 effetti

Assorbimento nei reni e nel fegato



Assorbimento negli organi di RGLS4326



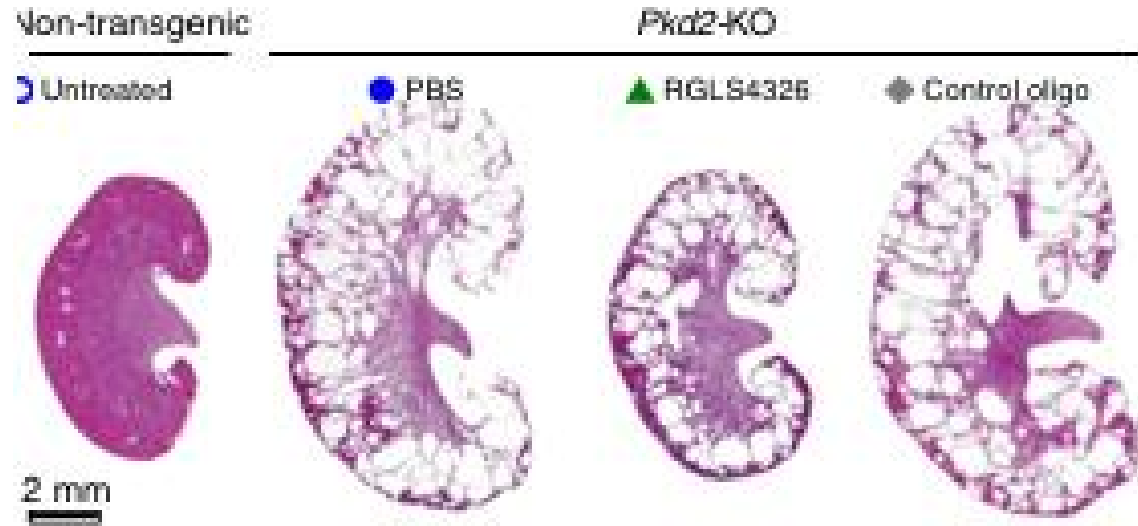
Distacco miR-17 dal polisoma

Distacco di miR-17 dal polisoma grazie a RGLS4326

somministrazione di PBS, RGLS4326 o gli oligonucleotidi di controllo ai topi Pkd2-KO

diminuzione del rapporto peso rene/peso organo data da RGLS4326

Assenza di effetti collaterali



Confronto dei rapporti KW/BW

# Vantaggi e svantaggi delle terapie mirate agli RNA

## Vantaggi

- Elevata specificità del target
- Alta tolleranza
- Emivita prolungata
- Stabilità conferita da modificazioni chimiche e da particelle sintetiche

## Svantaggi

- Incapacità di attraversare BEE e mucosa intestinale
- Farmacodinamica e farmacocinetica
- Off-target

Gli NBT rappresentano una grande promessa per il futuro

# Riassunto Esteso

La scoperta del ruolo dei ncRNA ha portato ad una svolta nel mondo della ricerca, permettendo di sviluppare terapie che possono agire sull'attività dei diversi RNA endogeni, modulando la trascrizione e la traduzione. Sono state sviluppate diverse strategie tra cui quelle focalizzate sull'incremento della stabilità e la quantità di mRNA nella cellula e quelle specializzate nell'ottimizzare la traduzione. In tecniche, come ad esempio nell'mRNA delivery si sono sviluppati carrier lipidici che permettono l'ingresso cellulare senza l'attivazione della risposta immunitaria mantenendo l'mRNA stabile, come visto nella MMA. I miRNA, oltre ad essere dei regolatori endogeni dell'espressione genica, sono anche dei target per alcune terapie. Per esempio possono subire delle modificazioni causate dalla presenza di antagomir o promirs, oligonucleotidi sintetici che hanno il ruolo di reprimere o amplificare la loro funzione, come accade nella terapia per la ADPKD. In generale queste terapie basate sugli acidi nucleici hanno dato risultati incoraggianti.

# Fonti (bibliografia e sitografia)

- **Biologia Molecolare** (Francesco Amaldi, Piero Benedetti)
- **The functions of natural antisense transcripts** (Megan Wight and Andreas Werner)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284957/>
- **Amplifying gene expression with RNA-targeted therapeutics** (Olga Khorkova, Et.Al)
- **mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases**  
<https://www.nature.com/articles/s41392-022-01007-w>
- **Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/>
- **Improved therapeutic efficacy in two mouse models of methylmalonic acidemia (MMA) using a second-generation mRNA therapy** (Kimberly A. Coughlan Et.Al)
- **Modulation of Polycystic Kidney Disease by non-coding RNAs** (Harini Ramalingam, Et. Al)
- **Discovery and preclinical evaluation of anti-miR-17 oligonucleotide RGLS4326 for the treatment of polycystic kidney disease** (Edmund C. Lee, Et.Al)