



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

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

***RNA non codificanti nelle malattie umane:
esempio di un approccio terapeutico per la malattia di Alzheimer***

***Non-coding RNAs in human disease:
example of a therapeutic approach for Alzheimer's disease***

Tesi di Laurea di:
Martina Cicconi

Docente Referente:
Tiziana Cacciamani

Sessione Luglio 2019
Anno Accademico 2018/2019

Sommario.

Negli ultimi anni, in seguito alla scoperta dei microRNA (miRNA), l'importanza e il coinvolgimento di queste molecole nello sviluppo ed il differenziamento cellulare normale e patologico sono stati ampiamente documentati e nuove molecole di RNA non codificanti per delle proteine (ncRNA) sono state identificate e caratterizzate. Nel seguente elaborato vengono descritte la sintesi e la funzione di diverse classi di ncRNA: microRNA (miRNA), RNA che interagiscono con proteine PIWI (piRNA), piccoli RNA nucleolari (snoRNA) e i lunghi RNA (lncRNA) non codificanti.

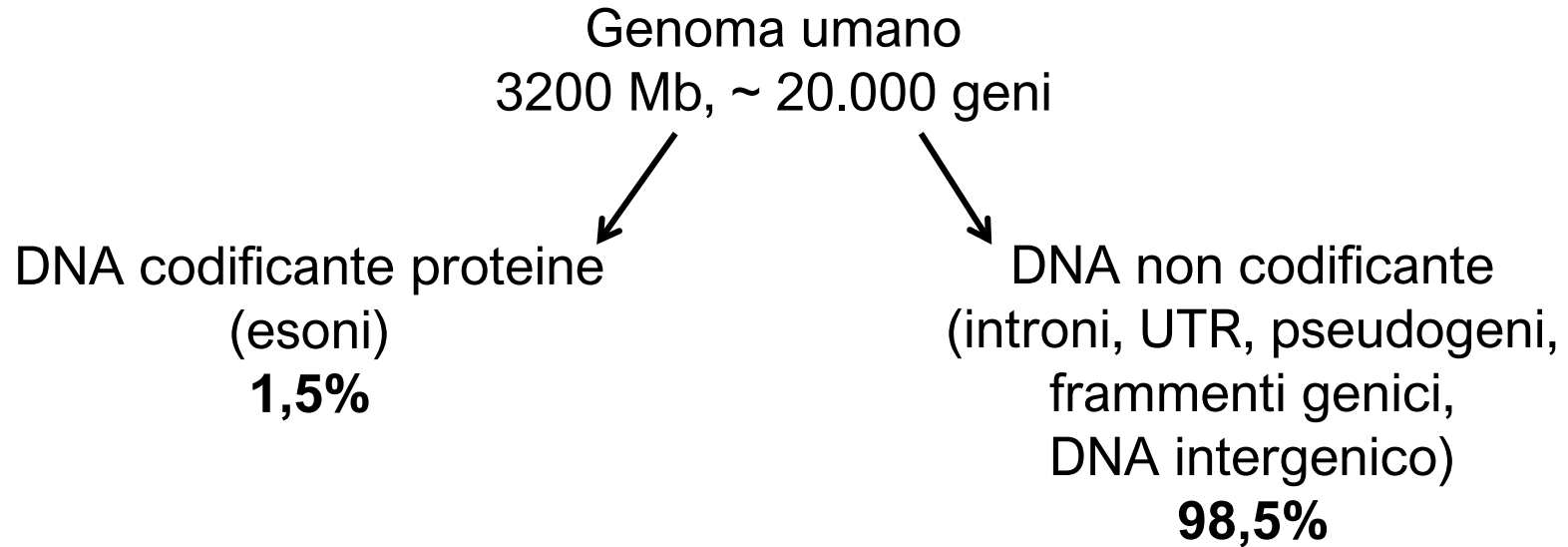
Poiché in condizioni patologiche sono state evidenziate numerose alterazioni nell'espressione di queste molecole, sono presentati degli esempi di coinvolgimento dei ncRNA in diverse patologie umane.

In particolare, vengono analizzati il ruolo dei miRNA e piRNA nel cancro e i meccanismi mediante i quali lo snoRNA HBII-52 e il lncRNA BACE1-AS prendono parte rispettivamente nella Sindrome di Prader-Willi e nel Morbo di Alzheimer.

Nel dettaglio viene approfondito un probabile approccio terapeutico per contrastare BACE1-AS, molto espresso nei pazienti affetti da AD, al fine di ridurre la produzione di peptide beta-amiloide.

Da:

- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**,861-874 (2011)
- Liu, T.; Huang, Y.; Chen, J.; Chi, H.; Yu, Z.; Wang, J.; Chen, C. Attenuated ability of BACE1 to cleave the amyloid precursor protein via silencing long noncoding RNA BACE1-AS expression. *Molecular Medicine Reports*,**10**, 1275–1281 (2014)



ncRNA (RNA non codificanti):

- microRNA: i più piccoli ncRNA (~ 22 nt)
- piRNA: RNA che interagiscono con proteine PIWI (~ 24-30 nt)
- snoRNA: piccoli RNA nucleolari (~ 60-300 nt)
- lncRNA: lunghi RNA non codificanti (> 200 nt)



Deregolati nelle malattie umane:

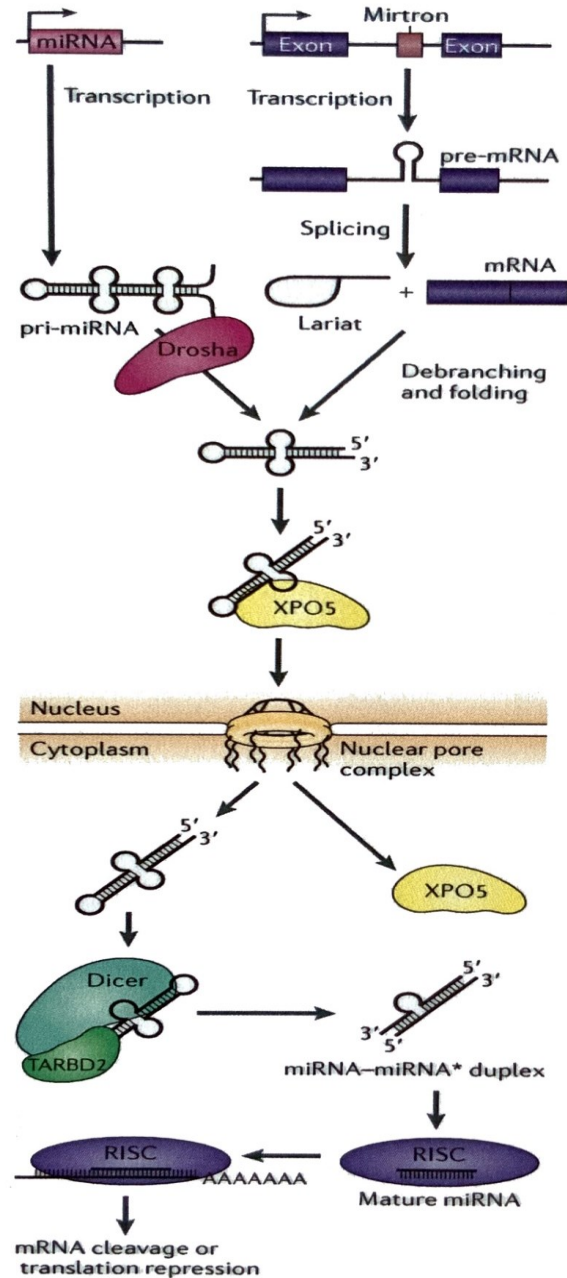
Cancro

Malattie neurologiche

Malattie da difetti dell'imprinting genomico

ed altre

Sintesi dei miRNA

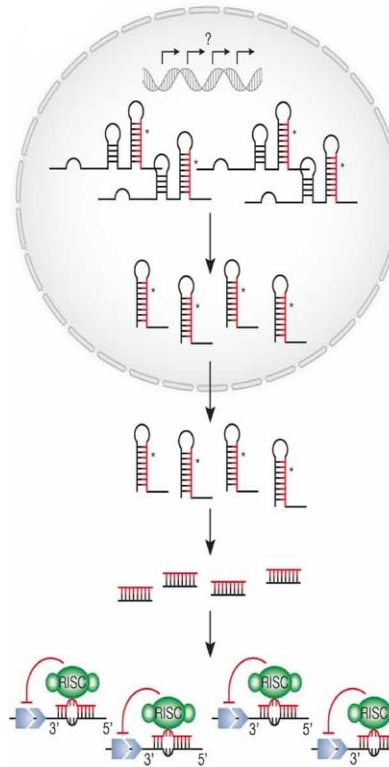


Funzione dei miRNA:
regolano negativamente
l'espressione genica a
livello post-trascrizionale

- Taglio dell'mRNA
- Inibizione della traduzione

Ruolo dei miRNA nel cancro

miRNA oncogeni



miRNA soppressori
tumoral

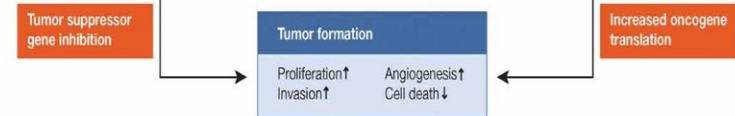
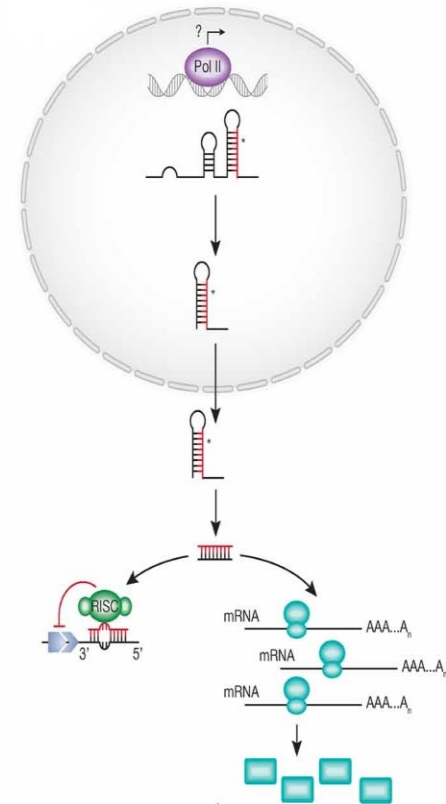
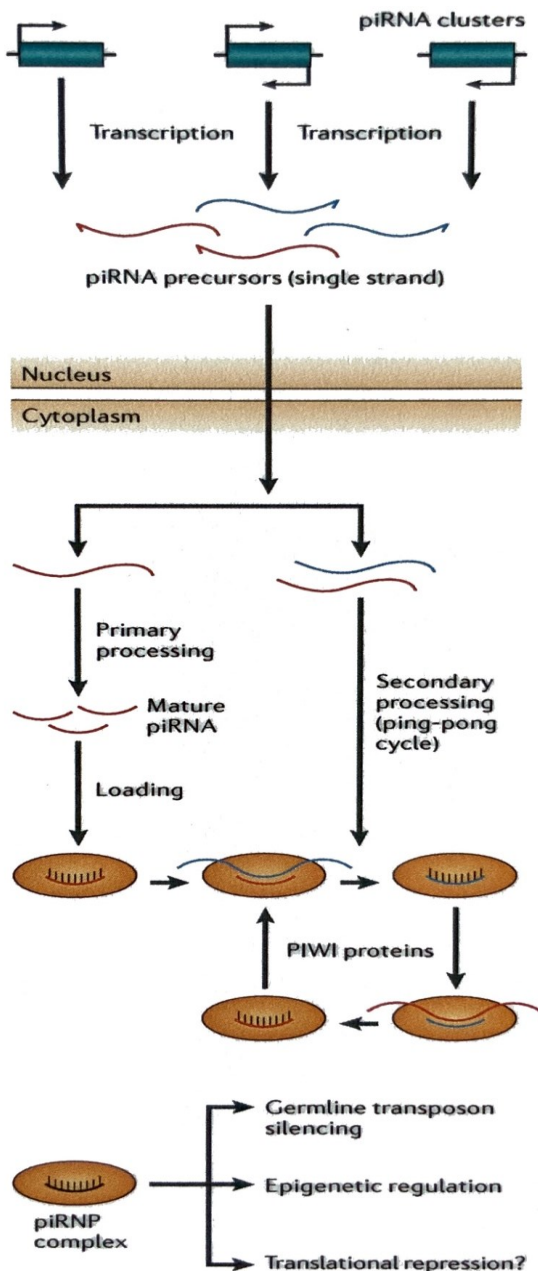


Foto presa da: Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 4,143-59 (2012)

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 12,861-874 (2011)

Sintesi dei piRNA

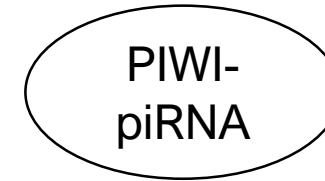


Funzione dei piRNA:

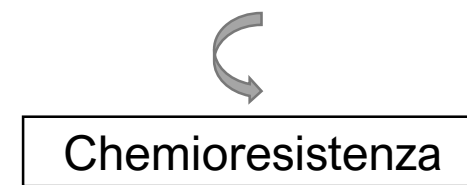
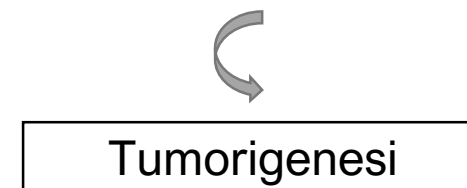
- Silenziamento elementi trasponibili nelle cellule della linea germinale
- Metilazione del DNA

Ruolo dei piRNA nelle neoplasie

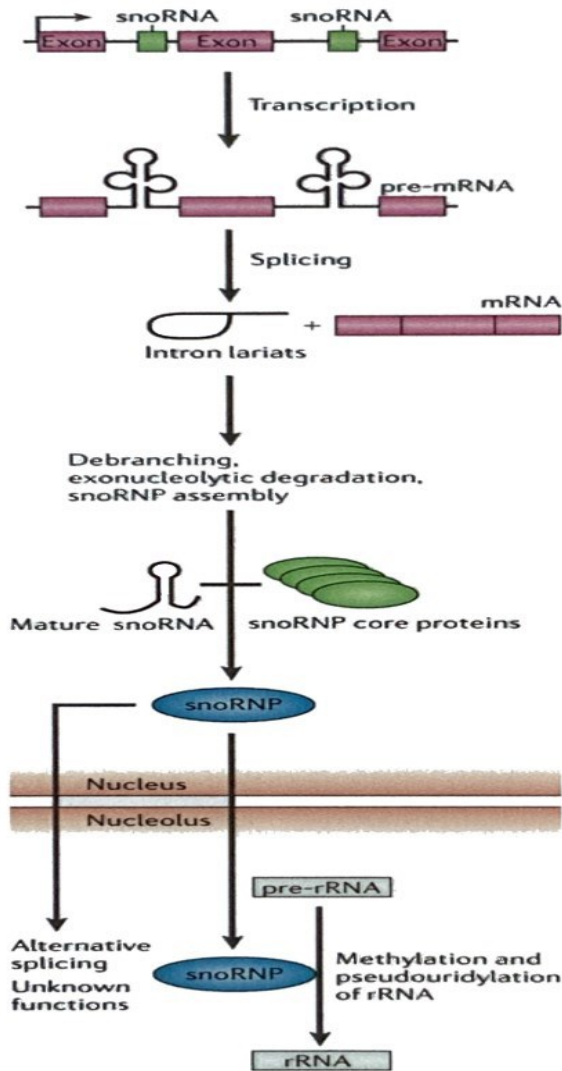
piRNP nei tumori somatici



- ✓ Mantenimento caratteristiche staminali
- ✓ Migrazione/EMT
- ✓ Proliferazione



Sintesi dei snoRNA

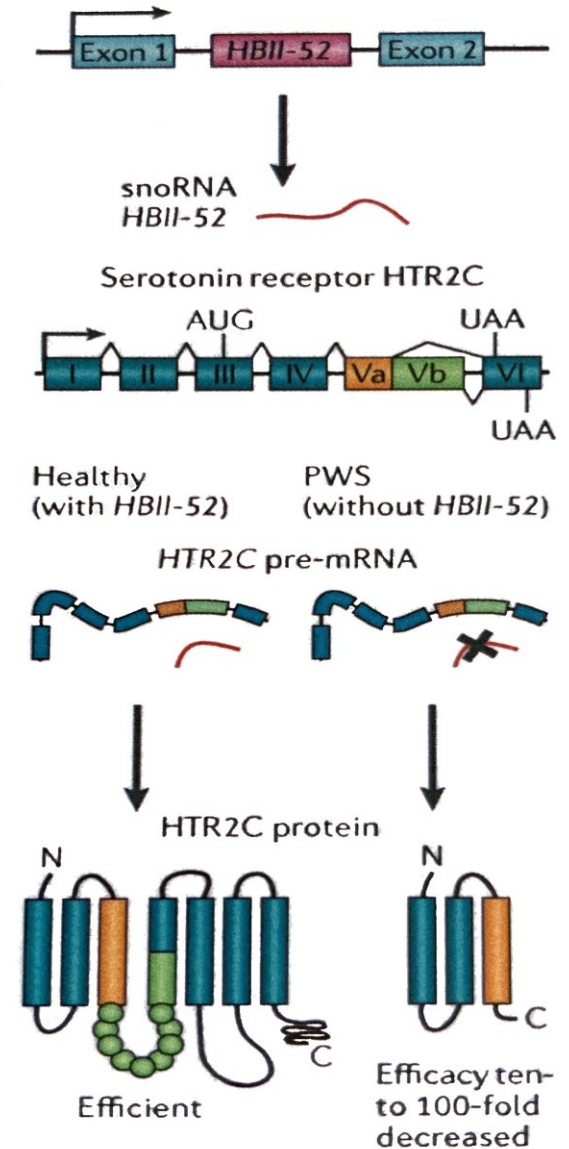


Funzione dei snoRNA:

- Processamento e modificazioni post-trascrizionali degli rRNA
- Splicing alternativo

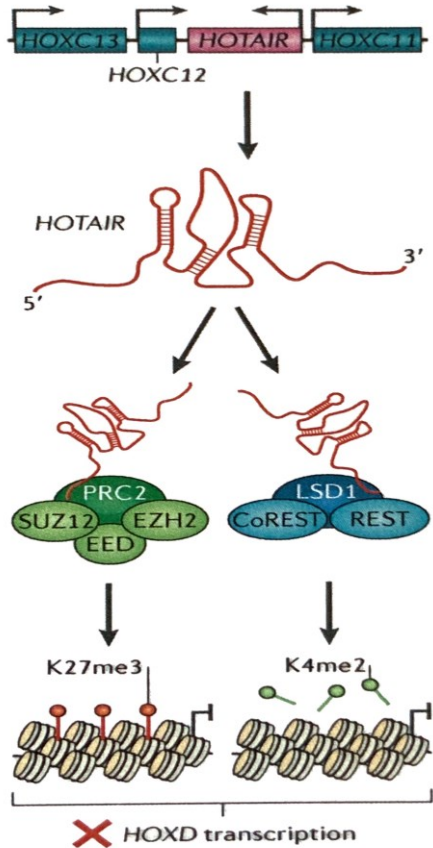
Sindrome di Prader-Willi e snoRNA HBII-52

- ✓ Microdelezione cromosoma 15 paterno (15q11-q13)
- ✓ Geni imprintati
- ✓ Alterazioni nella via della serotonina → obesità

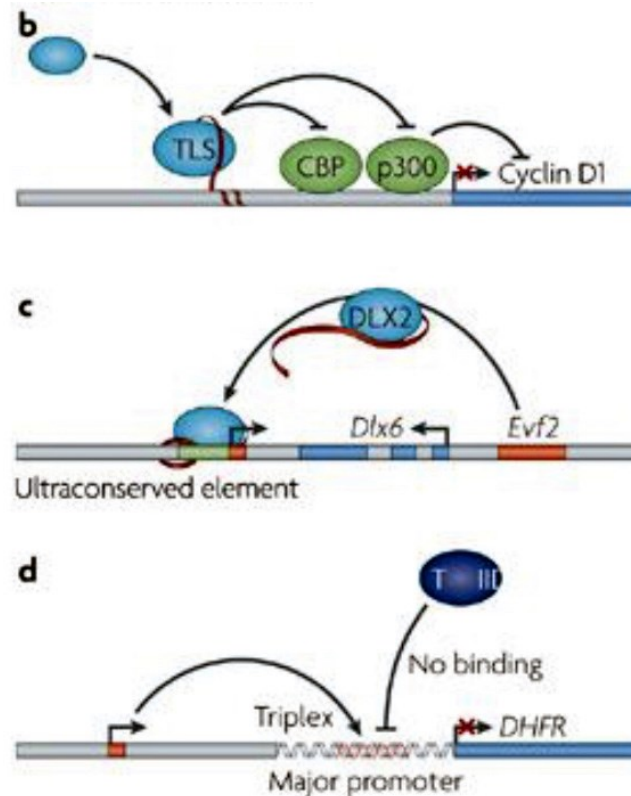


I lunghi RNA non codificanti

Modificazione della cromatina



Controllo trascrizionale



Elaborazione post-trascrizionale

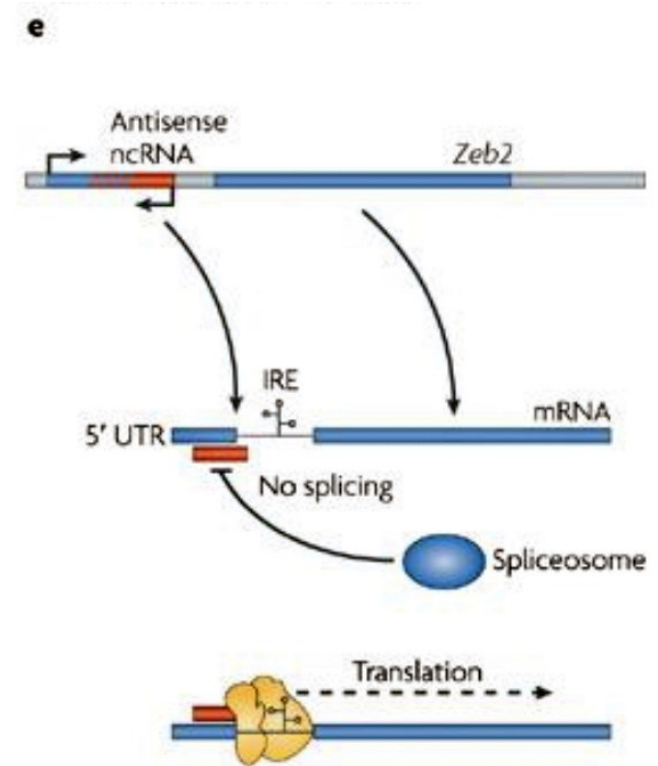


Foto presa da: Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155-159 (2009)

✓ Coinvolto nel silenziamento dell'espressione genica in numerosi loci genomici

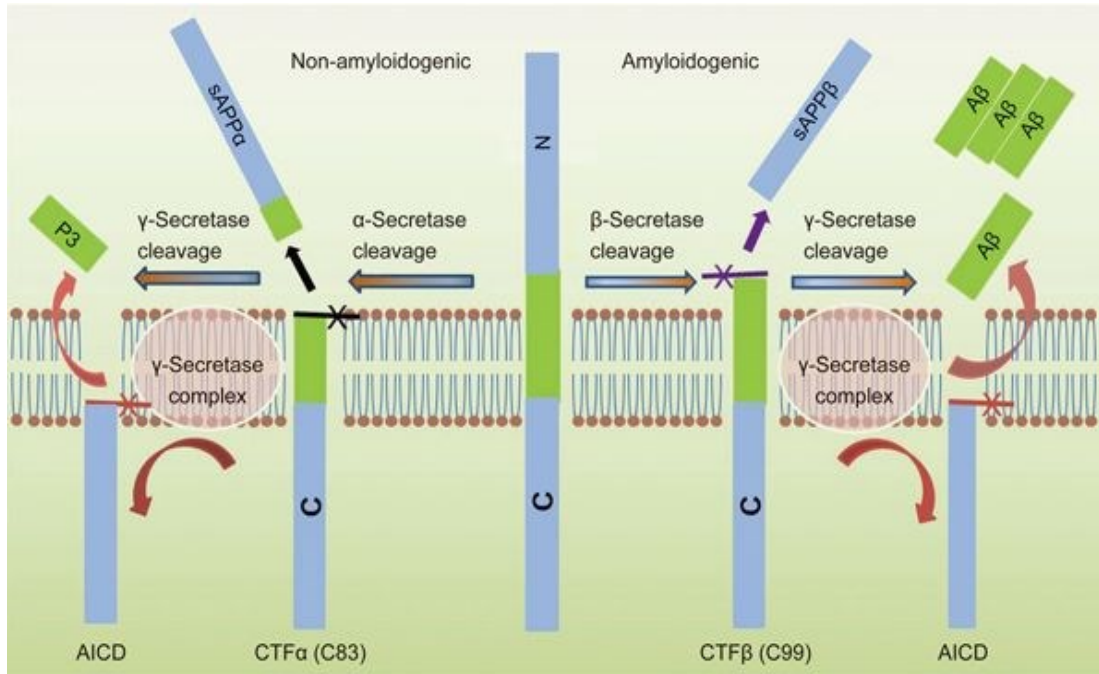
✓ Recluta i complessi di rimodellamento della cromatina PRC2 e LSD1/CoREST/REST

↑ livelli HOTAIR = ↑ invasività delle cellule tumorali

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**,861-874 (2011)

RNA non codificanti nelle malattie neurologiche

Nel Morbo di Alzheimer sono deregolati: miR-29, miR-146, miR-107 e BACE1-AS



BACE1-AS promuove la produzione di peptide β -amiloide

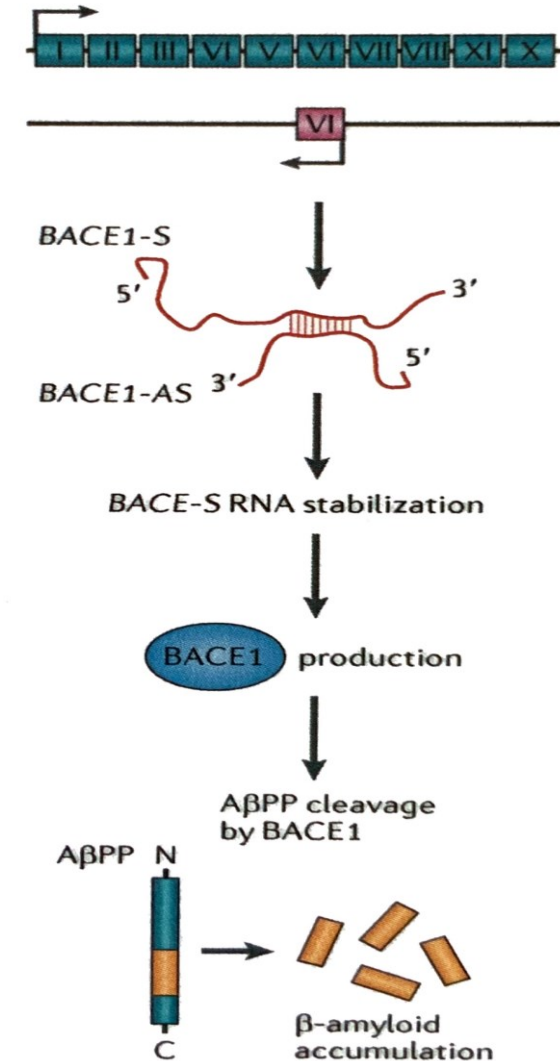


Foto presa da: Chen G., Xu T., Yan Y., Zhou Y., Jiang Y., Melcher K., Xu H. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, **38**, 1205-1235 (2017)

Condizioni normali

Condizioni patologiche

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**,861-874 (2011)

ncRNA: nuovi bersagli terapeutici

Prospettive future:

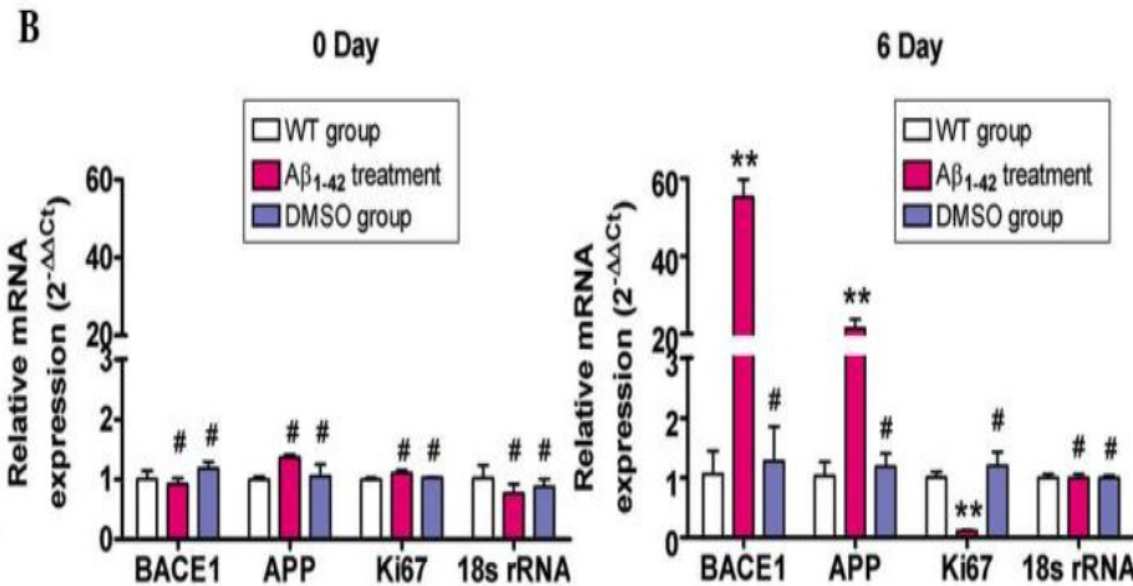
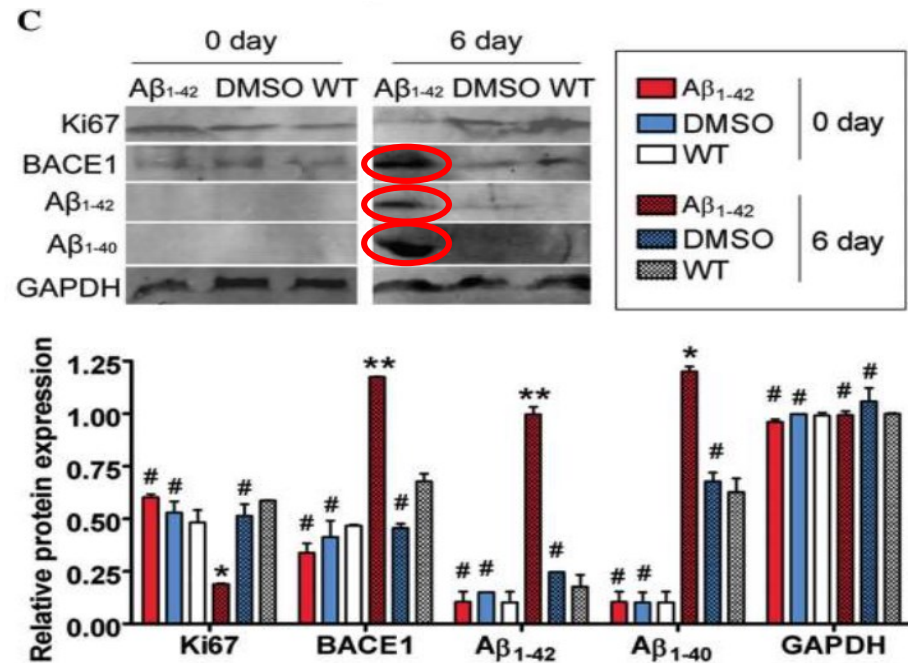
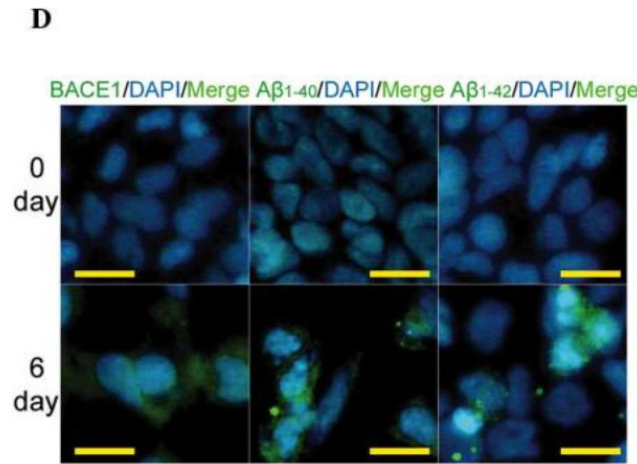
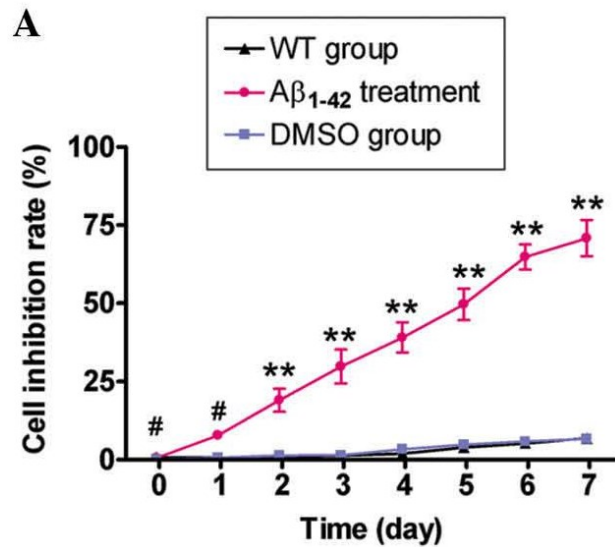
- Identificare tutti i ncRNA prodotti dal genoma umano
- Determinare i meccanismi attraverso i quali esercitano i loro effetti patologici
- Sviluppare nuovi approcci terapeutici

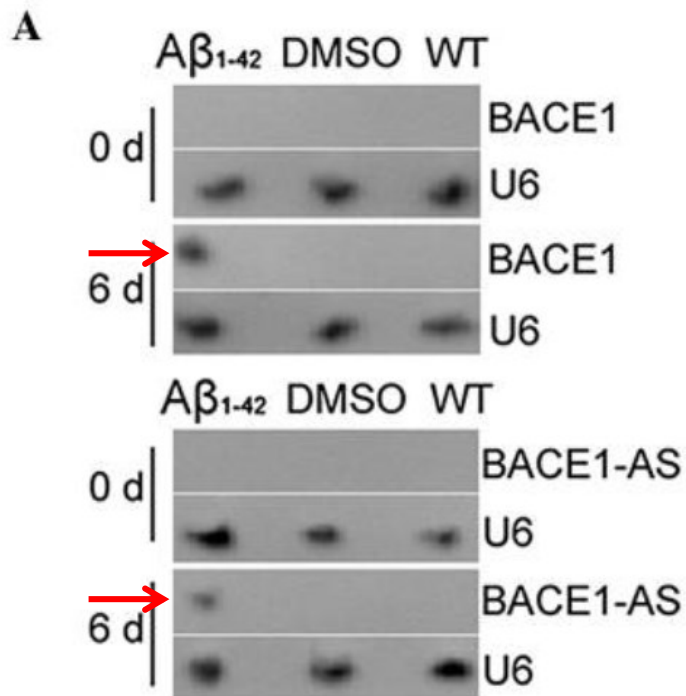
Vediamo un esempio di approccio terapeutico...

E se BACE1-AS venisse silenziato?

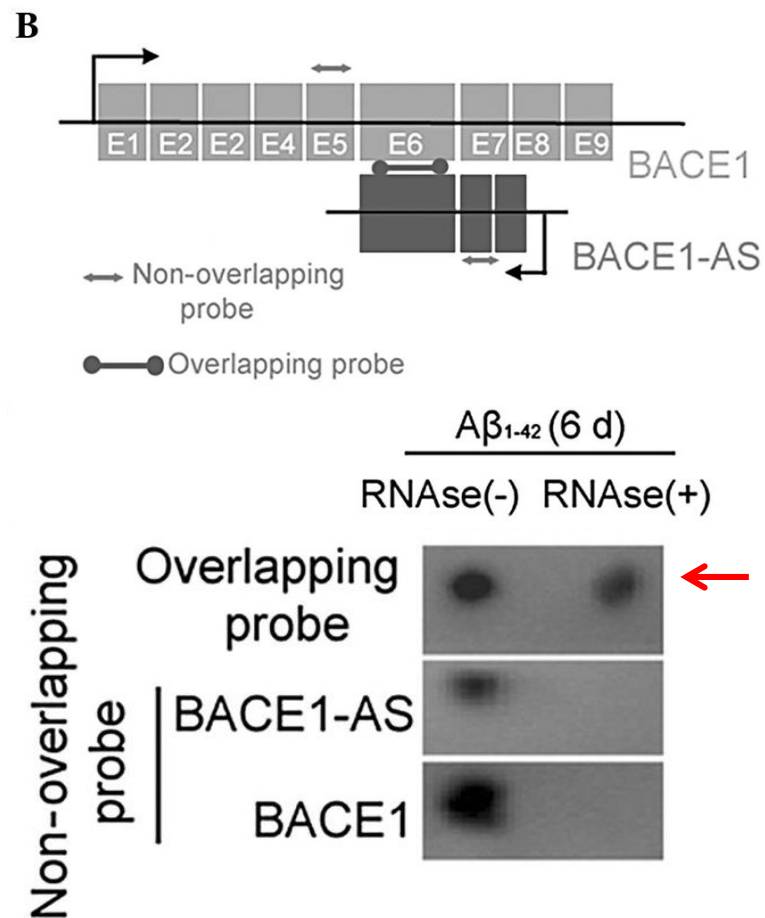
Aggregati di A β_{1-42} sintetici sono aggiunti alle colture di linee cellulari SH-SY5Y.

I dati indicano che i peptidi A β esogeni inibiscono la proliferazione delle cellule SH-SY5Y in coltura e inducono l'espressione di fattori correlati all'AD e la formazione di placche senili.



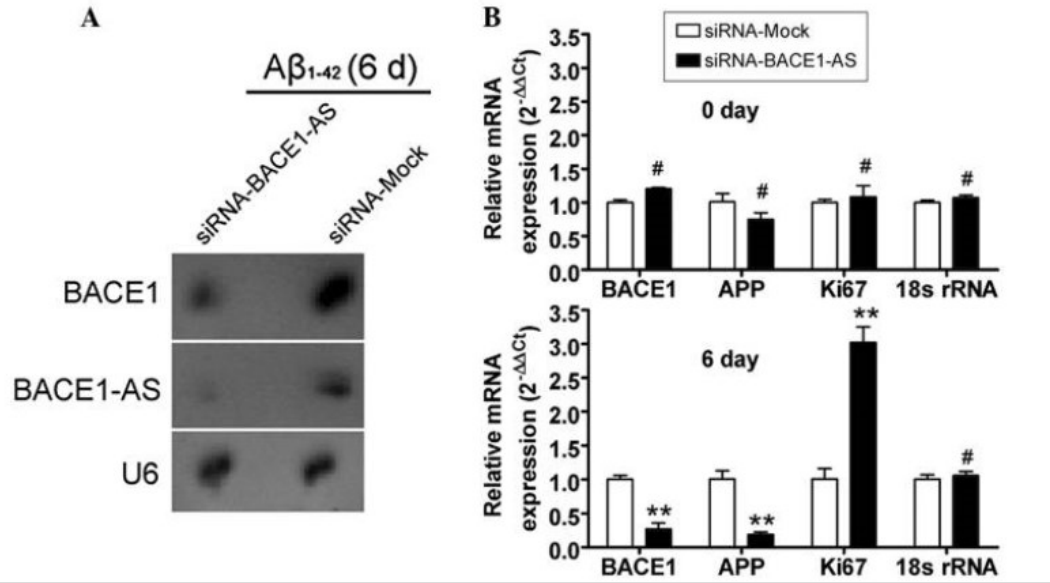


Il peptide $A\beta_{1-42}$ esogeno induce l'espressione di BACE1 e del lncRNA BACE1-AS.



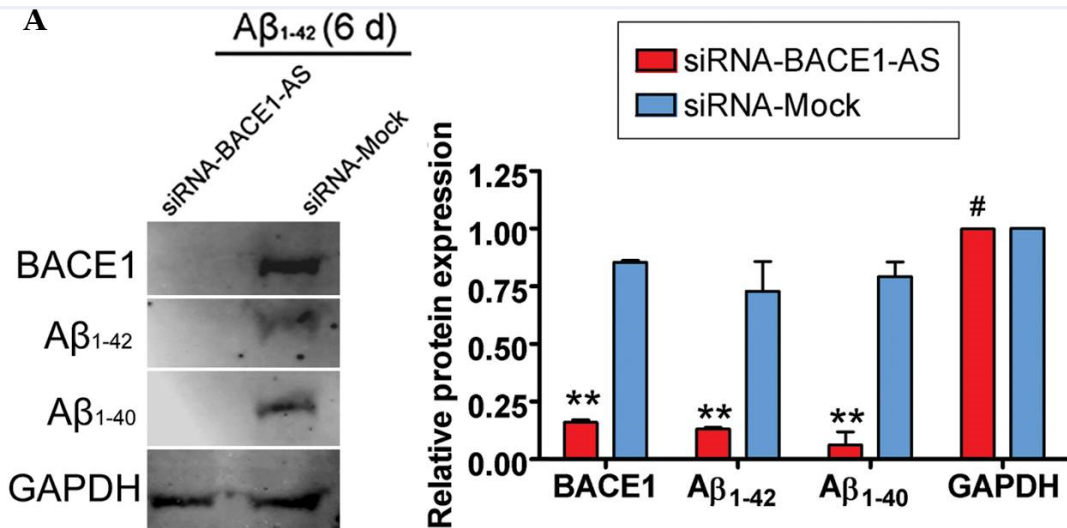
Il lncRNA BACE1-AS forma RNA duplex con l'mRNA BACE1 e aumenta la stabilità di quest'ultimo.

Silenziamento indotto da siRNA del lncRNA BACE1-AS.



Le cellule in coltura trattate con peptide $A\beta$ esogeno sono transfettate con un vettore in grado di esprimere un siRNA che si appaia con il lncRNA BACE1-AS, silenziandolo.

- BACE1-AS viene degradato e i suoi livelli diminuiscono
- Diminuiscono i livelli dell'mRNA BACE1 non essendo più stabilizzato da BACE1-AS



- L'espressione dell'enzima BACE1 e dei peptidi $A\beta_{1-42}$ e $A\beta_{1-40}$ è significativamente ridotta

La stabilità dell'mRNA BACE1 è strettamente associata all'espressione del lncRNA BACE1-AS.

Grazie per l'attenzione!

BIBLIOGRAFIA:

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**,861-874 (2011)
DOI: 10.7038/nrg3074

Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine* **4**,143–59(2012) DOI: 10.1002/emmm.201100209

Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics* **10**, 155-159 (2009) DOI: 10.1038/nrg2521.

Chen G., Xu T., Yan Y., Zhou Y., Jiang Y., Melcher K., Xu H. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, **38**, 1205-1235 (2017) DOI: 10.1038/aps.2017.2

Liu, T.; Huang, Y.; Chen, J.; Chi, H.; Yu, Z.; Wang, J.; Chen, C. Attenuated ability of BACE1 to cleave the amyloid precursor protein via silencing long noncoding RNA BACE1-AS expression. *Molecular Medicine Reports*, **10**, 1275–1281 (2014) DOI: 10.3892/mmr.2014.2351