

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE  
Corso di laurea in Scienze Biologiche



# Splicing alternativo e long non coding RNAs: il ruolo di Malat1 nella tumorigenesi e il possibile utilizzo terapeutico degli oligonucleotidi antisenso

Alternative splicing and long non coding RNAs: the role of Malat1 in tumor progression and the possible therapeutic use of antisense oligonucleotides

Tesi di Laurea di:  
ALESSIA SARACINI

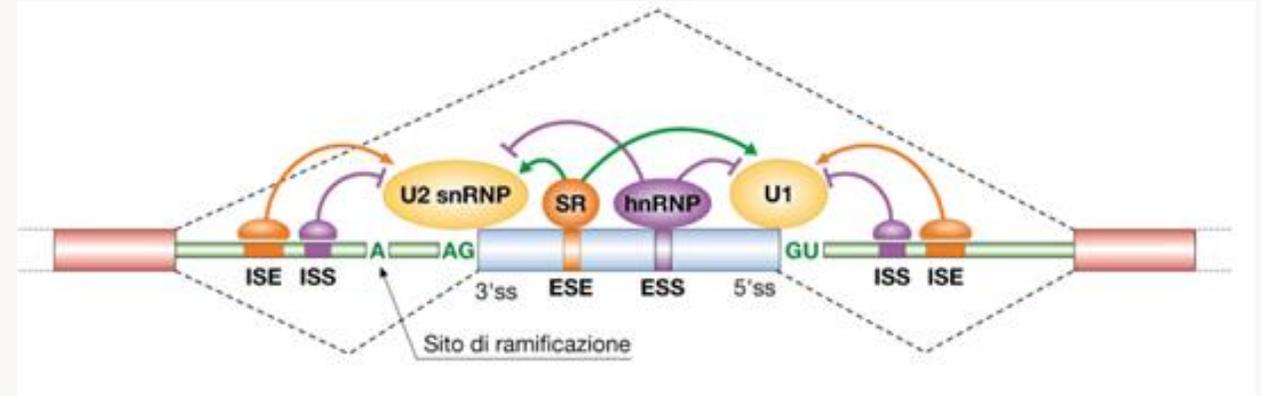
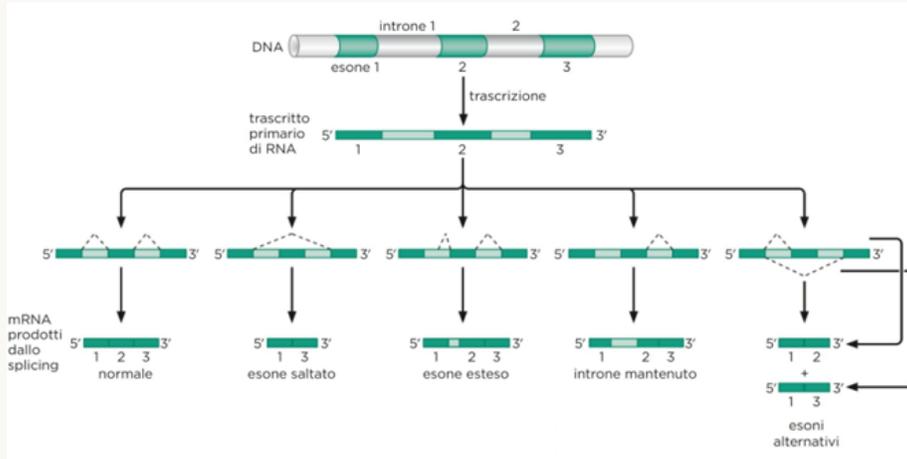
Sessione di luglio  
Anno accademico  
2023/2024

Docente Referente:  
Prof.ssa ANNA LA TEANA

# Introduzione allo splicing alternativo

Amaldi et al., Biologia molecolare. Casa editrice Ambrosiana

A partire da un unico gene si ottengono diversi RNA messaggeri maturi:



È regolato da:

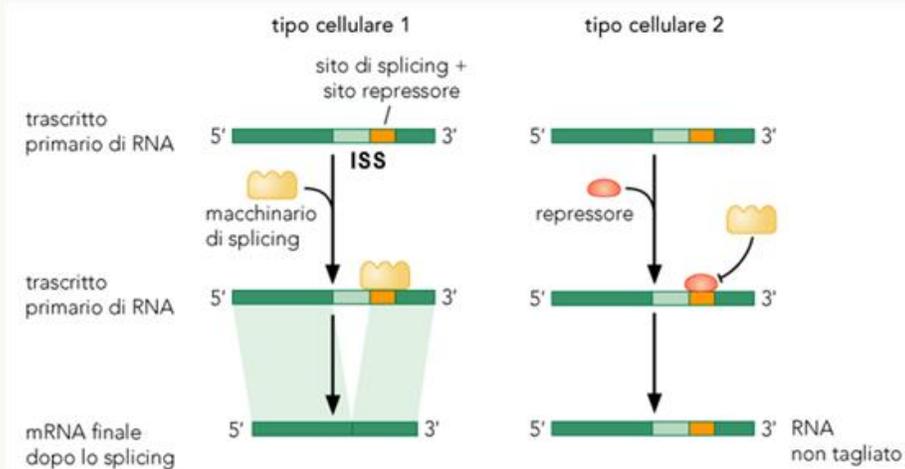
elementi in cis

- ESE
- ISE
- ESS
- ISS

elementi in trans = fattori di splicing (SFs);

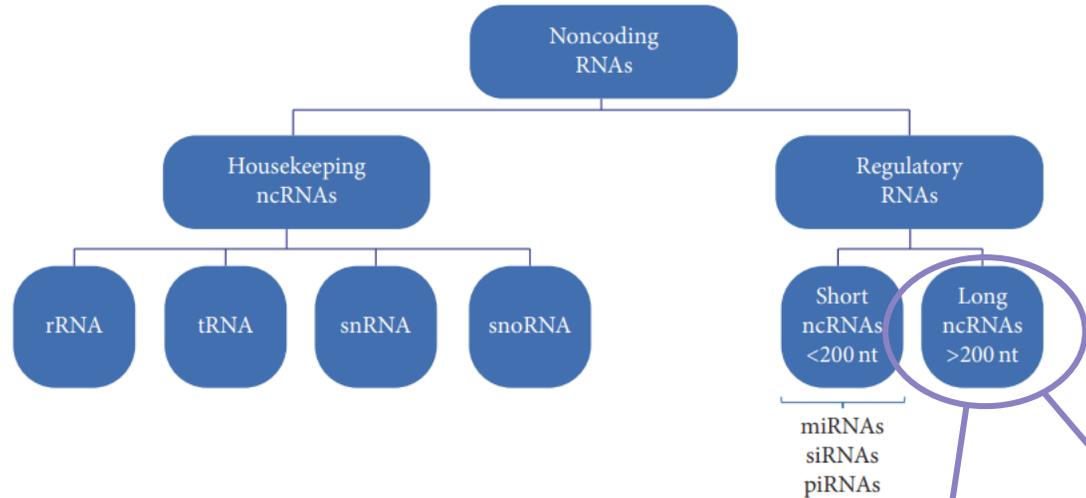
- 2 principali famiglie:
- SR proteins
  - HnRNPs

La disregolazione dello splicing alternativo è associata a numerose malattie umane, incluso il cancro.



# I long non coding RNAs

> 90% geni umani → RNA che non codificano per proteine



## Caratteristiche generali



## Localizzazione nel genoma

- DNA intergenico
- introni
- 3'-UTR
- pseudogeni
- porzioni di ORF

I lncRNAs regolano l'espressione genica ad ogni livello e hanno un ruolo importante in numerosi processi cellulari

# Come i long non coding RNAs regolano il processo di splicing alternativo

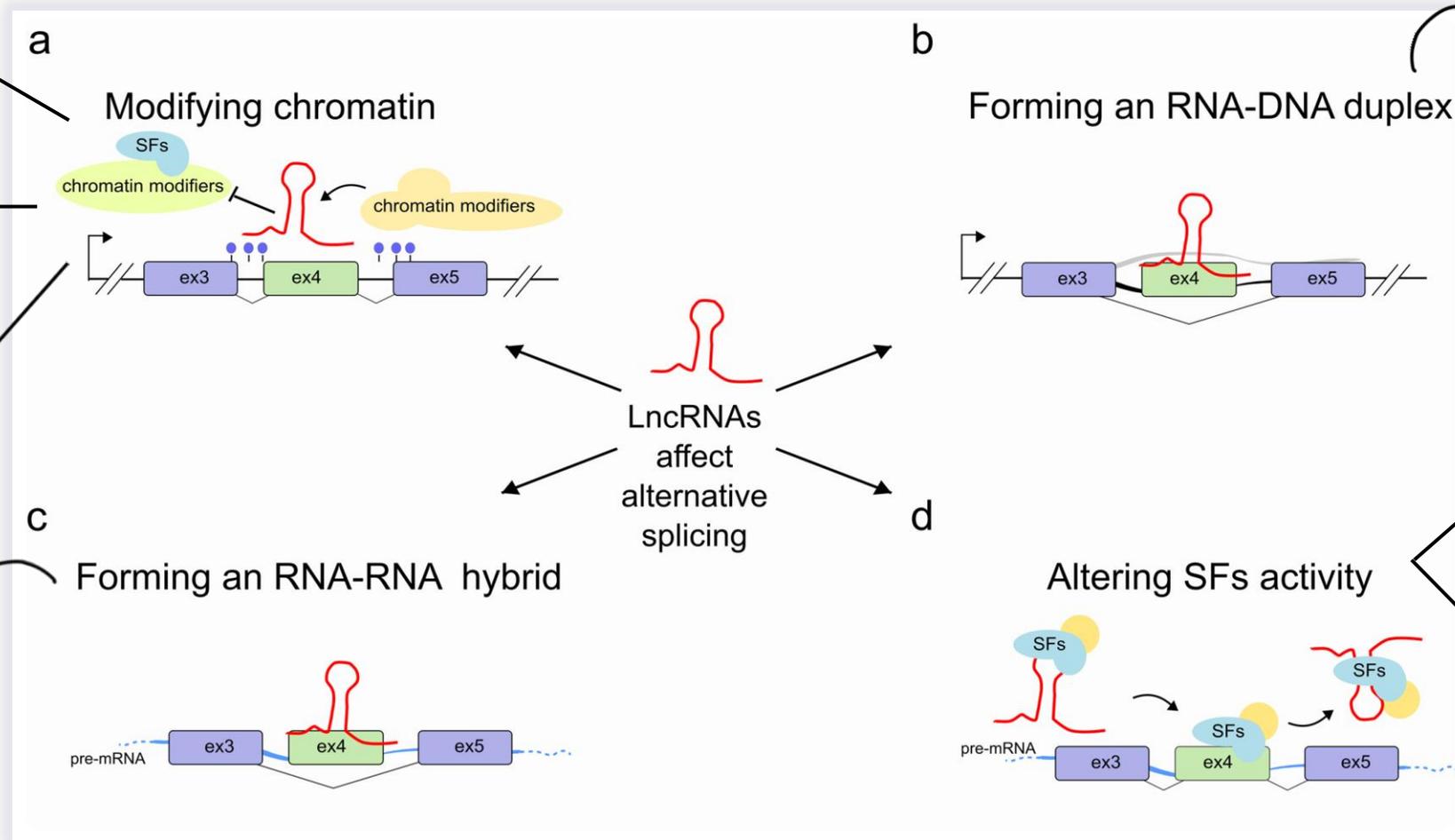
reclutando gli enzimi che modificano le code N-terminali degli istoni

reclutando i complessi di rimodellamento della cromatina

Rimuovendo i «roadblocks» determinati dal legame della proteina CTCF al DNA

**NATs:**

se l'appaiamento tra un pre-mRNA e un NAT avviene in corrispondenza di un sito di splicing, a causa dell'ingombro sterico questo non verrà riconosciuto



<https://doi.org/10.3390/ncrna7010021>

**circRNAs:**

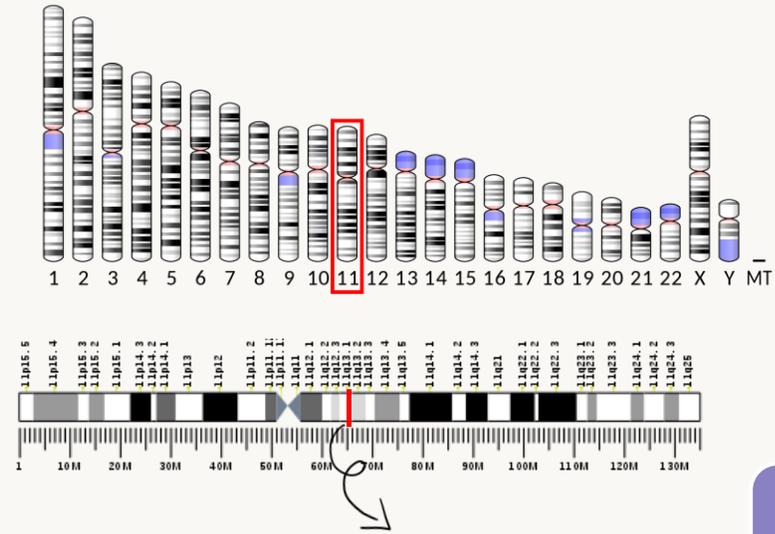
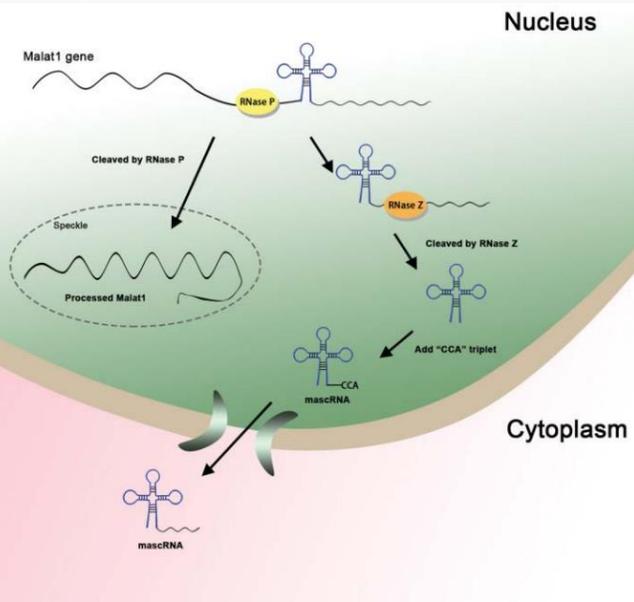
vanno a costituire un R-loop appaiandosi con la regione di DNA dalla quale si sono originati, determinando una pausa della trascrizione che coincide con il reclutamento dei SFs

sequestrando i fattori di splicing, impedendogli di interagire con altri SFs o con i pre-mRNAs

modulando lo stato di fosforilazione dei SFs, che influisce sulla loro funzionalità e localizzazione

# Un esempio di long non coding RNA: Malat1

## Biogenesi



Nell'uomo è localizzato in posizione 11q13

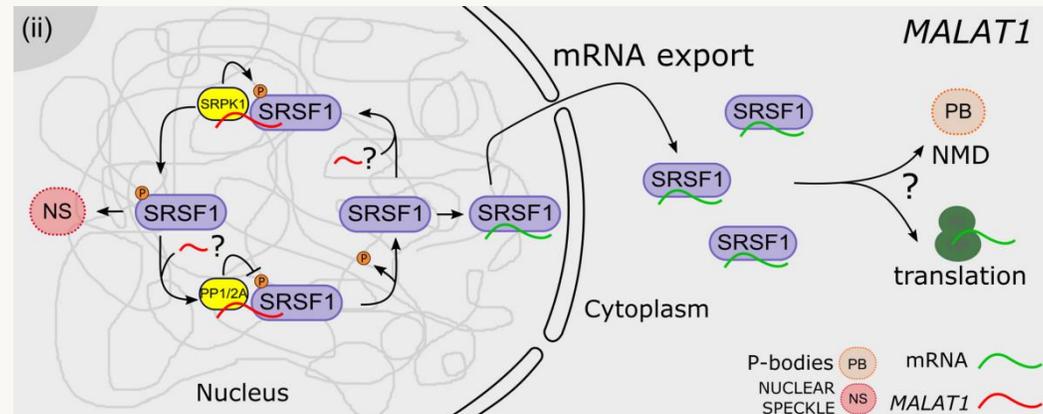
livelli di espressione elevati, paragonabili a quelli dei geni housekeeping

Malat1 «rompe le regole» dei lncRNAs

sequenza conservata in diverse specie di mammiferi

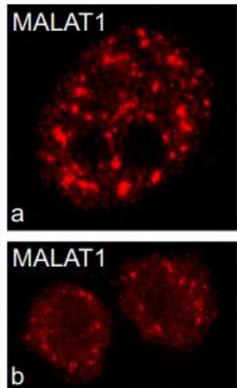
ubiquitario

## Come regola lo splicing alternativo?



- Interagendo con le proteine SR e influenzando la loro distribuzione all'interno degli speckles nucleari;
- modulando lo stato di fosforilazione delle proteine SR presenti all'interno del nucleo, tra cui SRSF1 (direttamente o influenzando l'attività di chinasi e fosfatasi).

<https://doi.org/10.1093/nar/gky095>

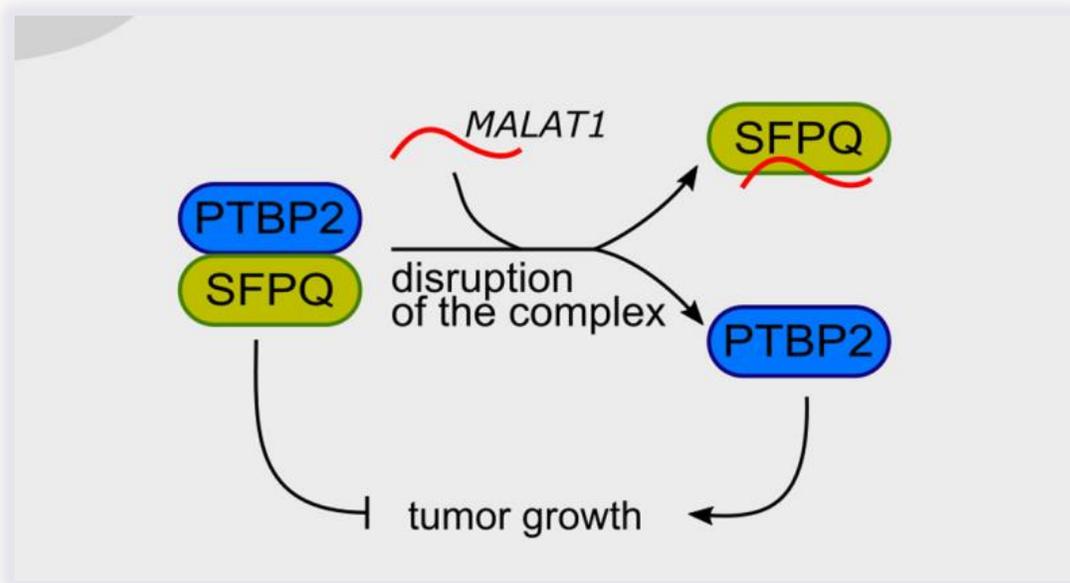


L'RNA-FISH effettuata utilizzando sonde complementari a Malat1 mostra la sua localizzazione negli speckles nucleari (interfase) e nei granuli intercromatinici (mitosi).

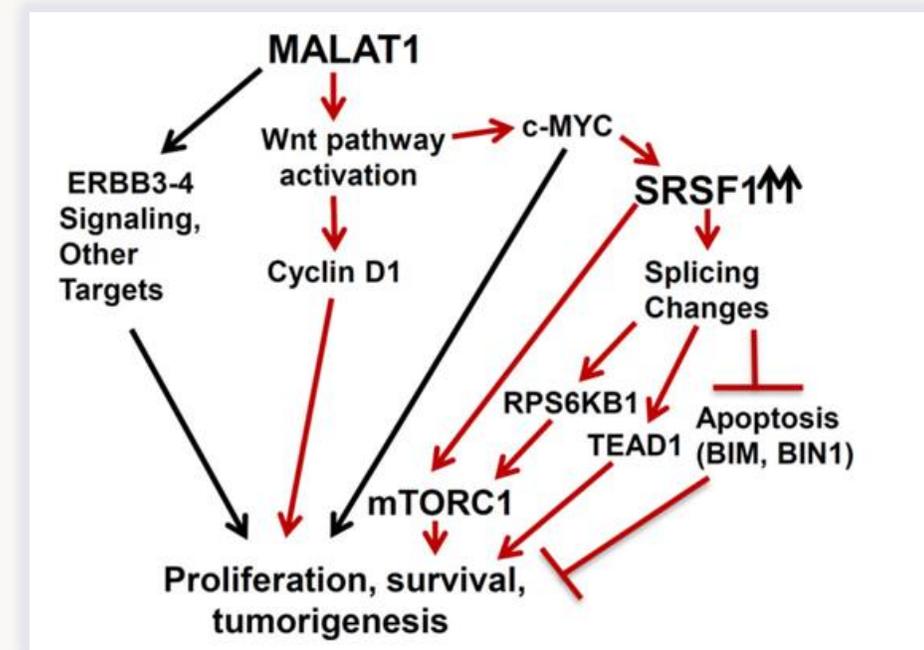
# Il ruolo di Malat1 nella tumorigenesi

Malat1 agisce come il trascritto di un oncogene e la sua espressione aberrante è coinvolta nello sviluppo di numerosi tipi di cancro. La sovraespressione (1.5-10 volte superiore rispetto al normale) di Malat1 è stata infatti correlata alla progressione di più di 20 diverse forme di tumori e ad una maggiore tendenza alla metastasizzazione. Inoltre, il suo accumulo è associato alla resistenza dei pazienti oncologici alla chemioterapia e alla radioterapia.

*Cosa comporta questa sovraespressione nel contesto dello splicing alternativo?*



<https://doi.org/10.1093/nar/gky095>



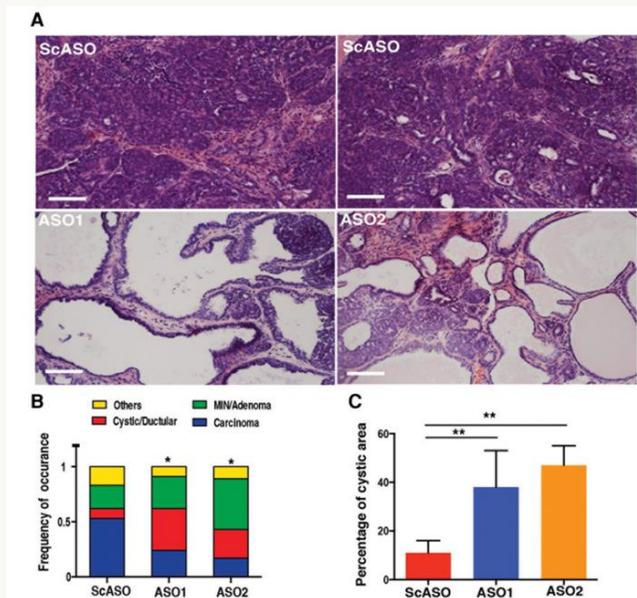
<https://doi.org/10.1158%2F0008-5472.CAN-16-1508>

# Il knockdown di Malat1 mediante l'utilizzo di ASOs inficia la progressione del tumore mammario e la sua metastasizzazione

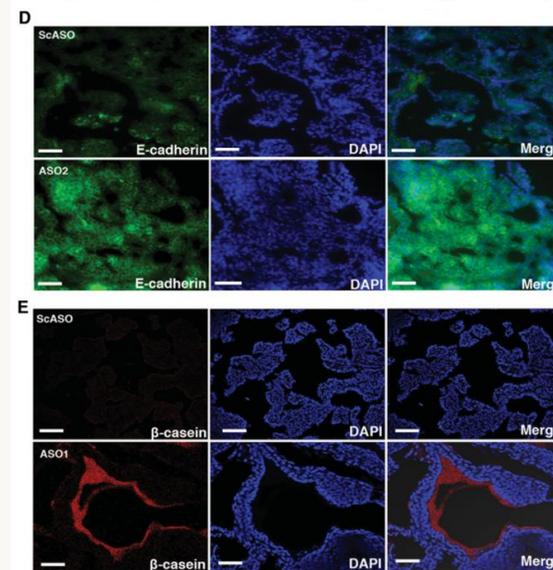
<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.270959.115>

*Malat1 potrebbe essere utilizzato come target terapeutico?*

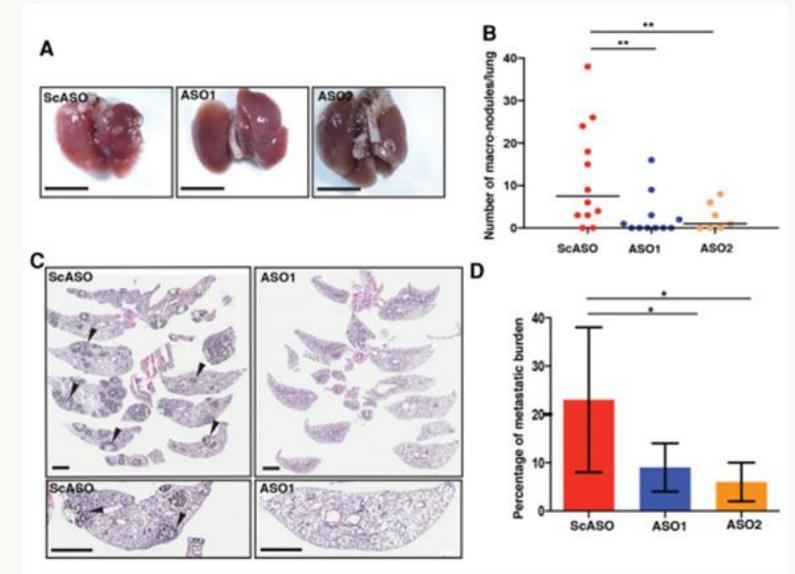
Nel 2015 il laboratorio di Cold Spring Harbor ha effettuato una serie di esperimenti in cui sono stati impiegati topi transgenici appartenenti al modello MMTV-pyMT (mouse mammary tumor virus- polyoma middle T antigen); questi sono stati divisi in 3 gruppi e ad ognuno di questi sono stati somministrati per via sottocutanea degli oligonucleotidi antisenso (16meri) complementari a due regioni diverse di Malat1 (ASO1 o ASO2) oppure degli «scrambled ASOs» di controllo, che non si appaiano in nessun punto.



I tumori primari prelevati dai topi trattati con ASO1 o ASO2 sono risultati ben differenziati; si è inoltre osservato un dimezzamento dei carcinomi solidi.



Utilizzando la tecnica dell'immunofluorescenza su sezioni di tumore primario ottenute da topi trattati con ASO1 o ASO2 il segnale che si osserva è molto più forte: l'E-caderina e la β-caseina sono marker di differenziamento.



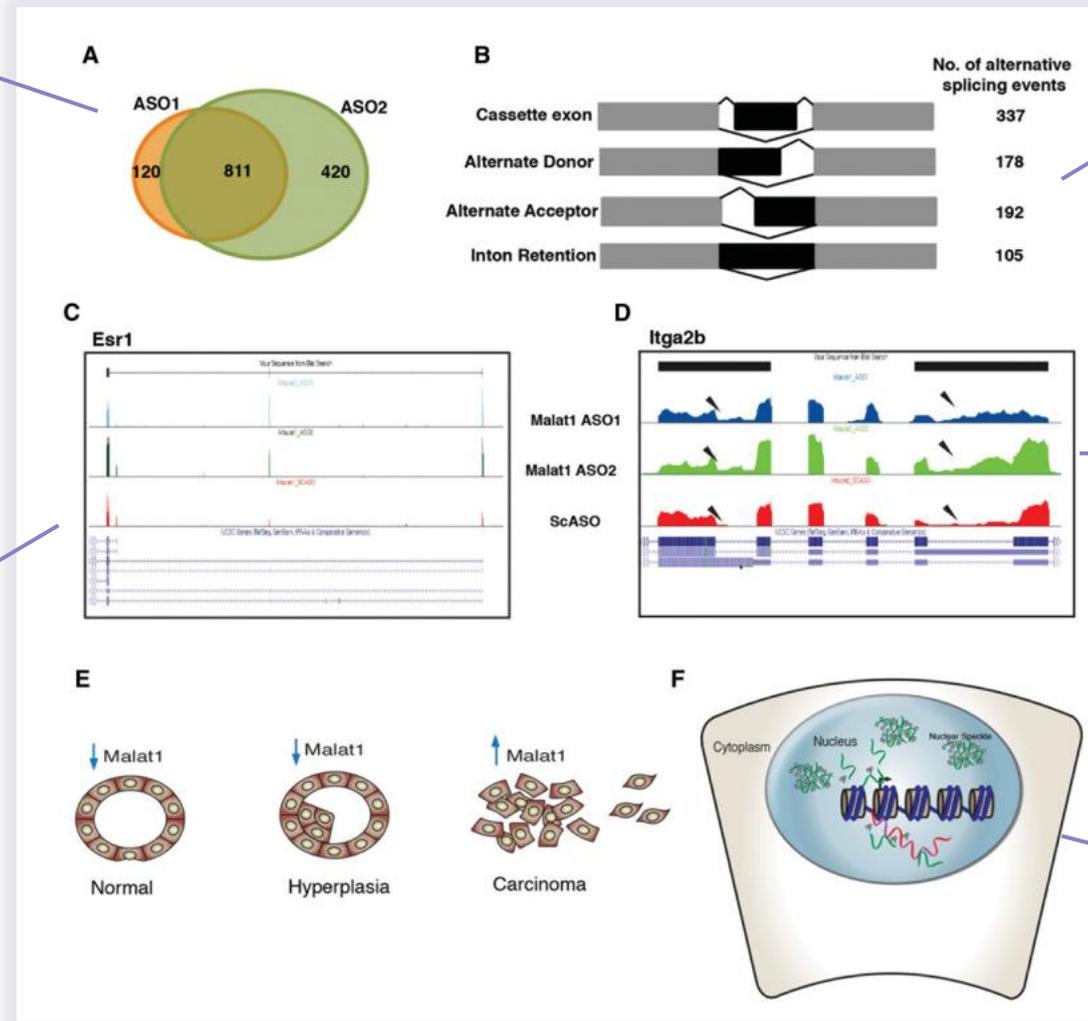
I topi a cui erano stati somministrati o gli ASO1 o gli ASO2 hanno mostrato una significativa riduzione del volume di tumore metastatico (<10%) e nei polmoni privi di noduli macrometastatici, non sono state osservate micrometastasi.

*Che impatto ha sullo splicing alternativo il knockdown di Malat1 nel tumore mammario?*

Il diagramma mostra il numero totale di cambiamenti nello splicing che sono avvenuti nei tumori trattati con ASO1 e ASO2, rispetto a quelli di controllo trattati con ScASO.

Risultati ottenuti dall'integrazione di metodi computazionali e di laboratorio:

Numero di geni sottoposti ad un diverso pattern di splicing alternativo in seguito al trattamento con ASOs.



Il trascritto *Esr1*, che codifica per il recettore  $\alpha$  degli estrogeni, subisce un diverso pattern di splicing alternativo nei tumori trattati con gli ASOs; questo risulta in una maggiore espressione del ERA rispetto a quelli trattati con ScASO (nello stadio di carcinoma avanzato ERA non viene più espresso).

*Itga2b*, appartenente alla via di segnalazione delle integrine, ha mostrato variazioni nel processo di splicing: viene selezionato un sito di splicing 3' alternativo determinando così la ritenzione di parte di un introne e, come risultato finale, una ridotta espressione del trascritto in questione.

Rappresentazione del meccanismo molecolare proposto: Malat1 si sposta tra gli speckles nucleari e i TSSs, dove funge da scaffold affinché avvengano trascrizione e splicing alternativo.

# ASOs: cosa sono?

Gli oligonucleotidi antisenso (ASOs) sono acidi nucleici (DNA o RNA) sintetici a singolo filamento costituiti da 12-25 nucleotidi che si legano ad un RNA bersaglio seguendo le regole di complementarità delle basi di Watson e Crick.

oligonucleotidi antisenso  
con un normale backbone  
fosfodiesterico  
(«unmodified ASOs»)

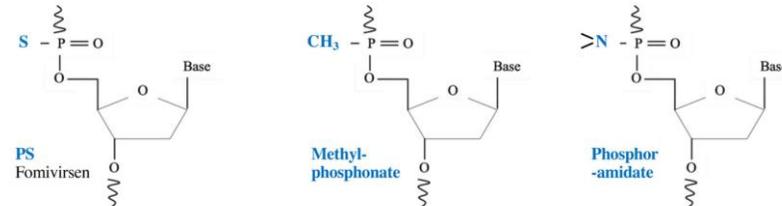
sono suscettibili alla degradazione da parte  
delle esonucleasi e endonucleasi

sono molecole grandi e cariche negativamente, per cui la loro  
diffusione passiva all'interno delle cellule è impedita

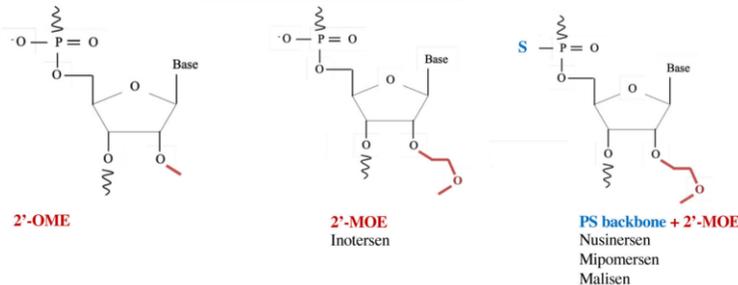
per renderli compatibili con lo sviluppo  
di nuovi farmaci si è andati a  
modificare la loro struttura chimica:



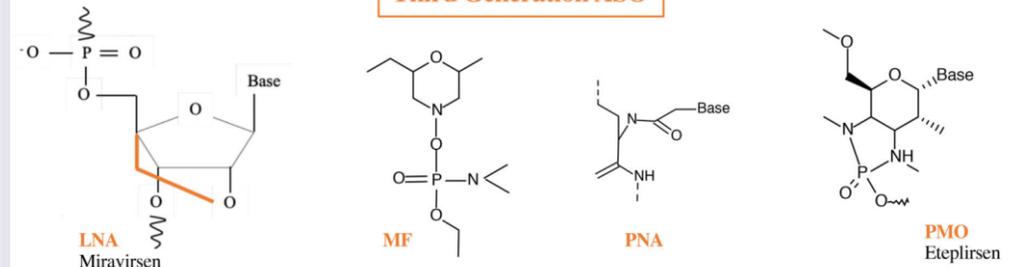
## First Generation ASO



## Second Generation ASO

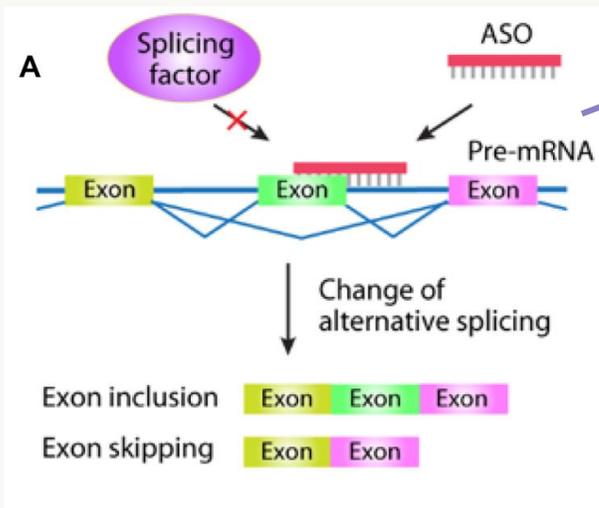


## Third Generation ASO



# ASOs: come agiscono a livello molecolare per regolare lo splicing alternativo?

https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239

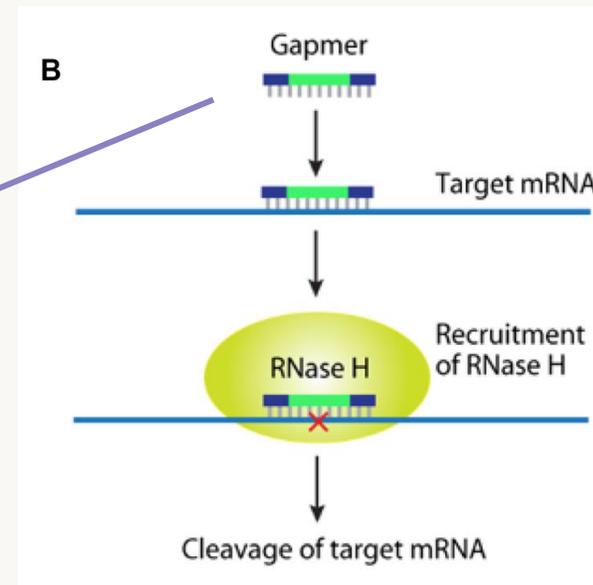


Direttamente:  
INGOMBRO  
STERICO  
DELL'RNA  
BERSAGLIO  
(pre-mRNA)

i SFs non possono legarsi  
alle sequenze in cis  
complementari all'ASO

Indirettamente:  
DEGRADAZIONE  
DELL'RNA  
BERSAGLIO  
(lncRNA)

reclutamento  
RNasi H



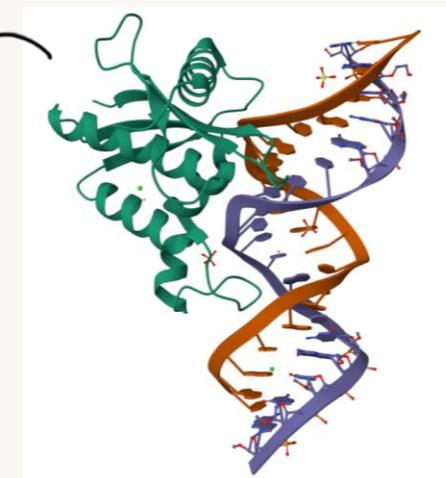
https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239

costituiti da:  
- una regione centrale di desossinucleotidi non modificati  
- fiancheggiata da oligonucleotidi modificati, ad esempio LNA

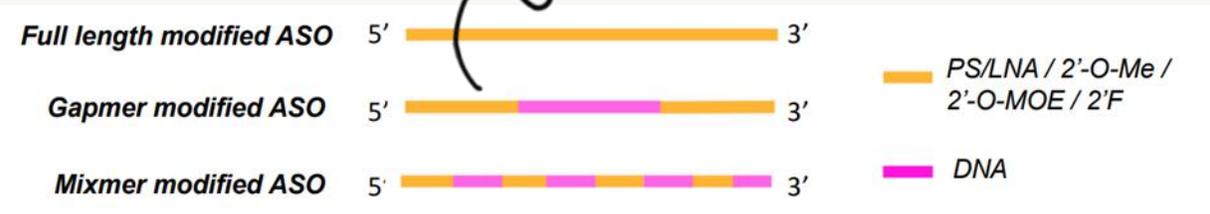
serve per reclutare  
l'RNasi H, il cui substrato  
è un duplex DNA-RNA

assicurano  
protezione dalle  
nucleasi e  
migliorano l'affinità  
di legame tra ASO  
e RNA target

complesso  
RNasi H-ASO-RNA



https://doi.org/10.2210/pdb8SWC/pdb



http://dx.doi.org/10.3390/jcm9062004

## Conclusioni...

La scoperta che anche i lncRNAs hanno un importante ruolo nella regolazione dello splicing alternativo porta con sé la possibilità di adottare nuovi approcci terapeutici che possano modulare la loro espressione e la loro attività.

Questa possibilità acquisisce ancora più valore considerando che l'utilizzo dei lncRNAs consente, rispetto ad altri bersagli, di agire in maniera più specifica nella regolazione dello splicing alternativo, limitando effetti collaterali tossici o addirittura non compatibili con la vita.

Nel contesto della lotta contro il cancro, un possibile approccio terapeutico, come visto, potrebbe risiedere nel modulare la concentrazione di Malat1, la cui sovraespressione è associata alla progressione tumorale e alla metastasizzazione.

Tra l'altro utilizzare Malat1 come target terapeutico permetterebbe di eludere la resistenza alla chemioterapia tipica delle forme più aggressive di tumore, oltre che di evitare ai tessuti sani gli effetti avversi correlati.

In sperimentazione preclinica, questo obiettivo è stato raggiunto utilizzando degli oligonucleotidi antisenso; attualmente numerosi farmaci basati sulla tecnologia antisenso sono in sperimentazione clinica per trattare anche malattie cardiovascolari, metaboliche, endocrine, neurologiche, neuromuscolari, infiammatorie e infettive.

In generale, la struttura degli ASOs e le modificazioni chimiche alla quale si possono apportare, offrono una considerevole flessibilità e adattabilità in base al target terapeutico scelto e al meccanismo di azione che è necessario utilizzare per trarre dei benefici.

Comunque questo approccio innovativo è ancora sperimentale e richiede ulteriori indagini, con particolare riguardo ai problemi di natura sia clinica che etica.

## Riassunto esteso

Lo splicing alternativo è ampiamente disregolato in vari tumori; questa disregolazione può essere dovuta a cambiamenti dell'espressione di alcuni RNA lunghi non codificanti.

I long non coding RNAs, infatti, sono in grado di modulare i pattern di splicing alternativo modificando la cromatina, formando dei duplex RNA-RNA, andando a costituire delle triple eliche dsDNA-RNA o interagendo con i fattori di splicing, in modo da regolare la loro attività e/o modificare la loro localizzazione.

Tra i diversi coinvolti nella tumorigenesi, quello più ampiamente studiato è Malat1: la sua sovraespressione è coinvolta nello sviluppo di numerosi tipi di cancro.

Essendo stato dimostrato sperimentalmente che il knockdown di Malat1 in topi transgenici promuove il differenziamento del tumore mammario e conduce ad una significativa riduzione dell'incidenza di metastasi polmonare, Malat1 rappresenterebbe quindi un promettente target terapeutico.

Questo knockdown è stato ottenuto mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso che, una volta appaiati con i loro RNA bersaglio, promuovono la loro degradazione reclutando l'RNasi H.

Un altro meccanismo mediante il quale gli ASOs possono regolare lo splicing alternativo è legandosi a specifiche sequenze in cis del pre-mRNA, prevenendo così il legame dei fattori di splicing.

# Bibliografia

- Pushkar Malakar, Sudhanshu Shukla, Meghna Mondal, Rajesh Kumar Kar & Jawed Akhtar Siddiqui (2024) The nexus of long noncoding RNAs, splicing factors, alternative splicing and their modulations, *RNA Biology*, 21:1, 1-20, DOI: 10.1080/15476286.2023.2286099
- Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, Ariel F, Crespi M. Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018 Mar 16;46(5):2169-2184. doi: 10.1093/nar/gky095. PMID: 29425321; PMCID: PMC5861421.
- Pisignano G, Lodomery M. Epigenetic Regulation of Alternative Splicing: How LncRNAs Tailor the Message. *Noncoding RNA.* 2021 Mar 11;7(1):21. doi: 10.3390/ncrna7010021. PMID: 33799493; PMCID: PMC8005942.
- Xuejing Zhang, Milton H. Hamblin & Ke-Jie Yin (2017) The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions, *RNA Biology*, 14:12, 1705-1714, DOI: 10.1080/15476286.2017.1358347
- Arun G, Aggarwal D, Spector DL. MALAT1 Long Non-Coding RNA: Functional Implications. *Noncoding RNA.* 2020 Jun 3;6(2):22. doi: 10.3390/ncrna6020022. PMID: 32503170; PMCID: PMC7344863.
- Malakar P, Shilo A, Mogilevsky A, Stein I, Pikarsky E, Nevo Y, Benyamini H, Elgavish S, Zong X, Prasanth KV, Karni R. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Development by SRSF1 Upregulation and mTOR Activation. *Cancer Res.* 2017 Mar 1;77(5):1155-1167. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1508. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27993818; PMCID: PMC5334181.
- Arun G, Diermeier S, Akerman M, Chang KC, Wilkinson JE, Hearn S, Kim Y, MacLeod AR, Krainer AR, Norton L, Brogi E, Egeblad M, Spector DL. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev.* 2016 Jan 1;30(1):34-51. doi: 10.1101/gad.270959.115. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26701265; PMCID: PMC4701977.
- Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, Pham H, Gupta A, Vikram A, Bahal R. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med.* 2020 Jun 26;9(6):2004. doi: 10.3390/jcm9062004. PMID: 32604776; PMCID: PMC7355792.
- Quemener AM, Bachelot L, Forestier A, Donnou-Fournet E, Gilot D, Galibert MD. The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2020 Sep;11(5):e1594. doi: 10.1002/wrna.1594. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32233021; PMCID: PMC9285911.
- Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018 Feb 28;46(4):1584-1600. doi: 10.1093/nar/gkx1239. PMID: 29240946; PMCID: PMC5829639.