



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

STRUTTURE DI RNA ASSOCIATE A SEQUENZE RIPETUTE E SPLICING ABERRANTE

Repeat-associated RNA structure and aberrant splicing

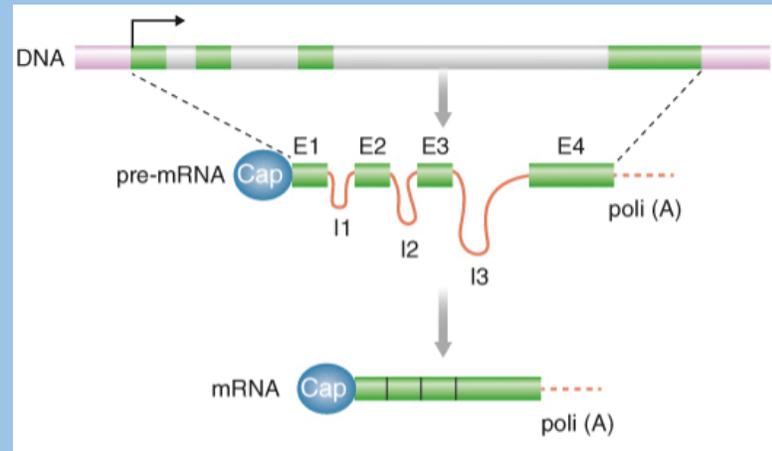
Tesi di Laurea di
Irene Cori

Relatore
Prof.ssa Anna La Teana

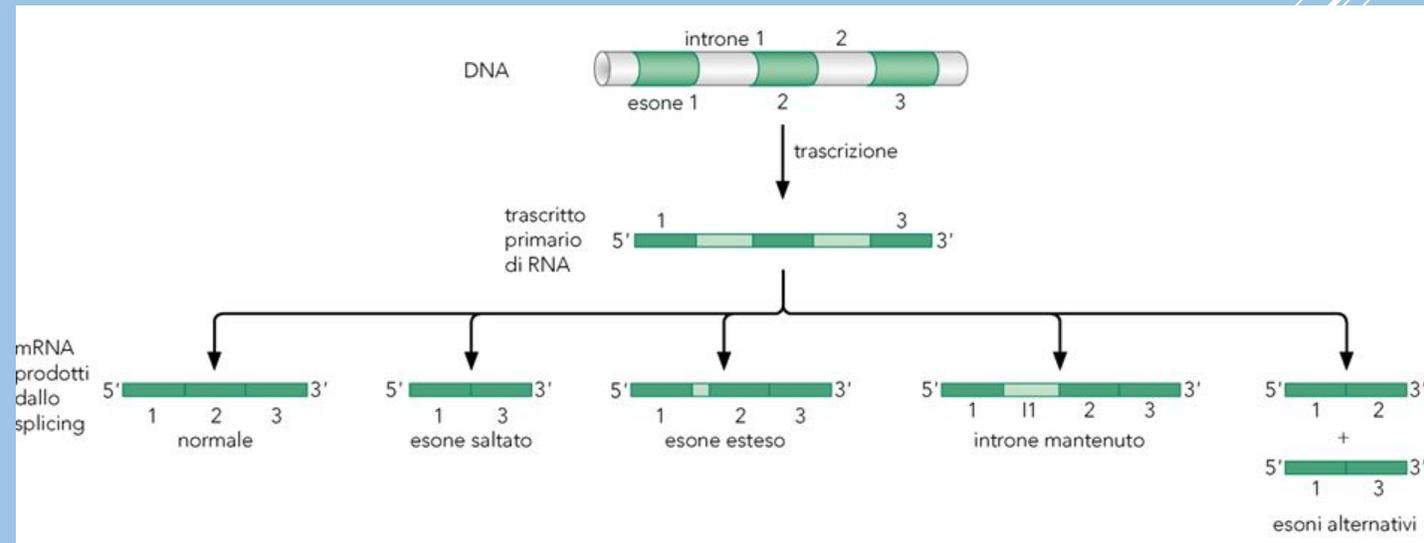
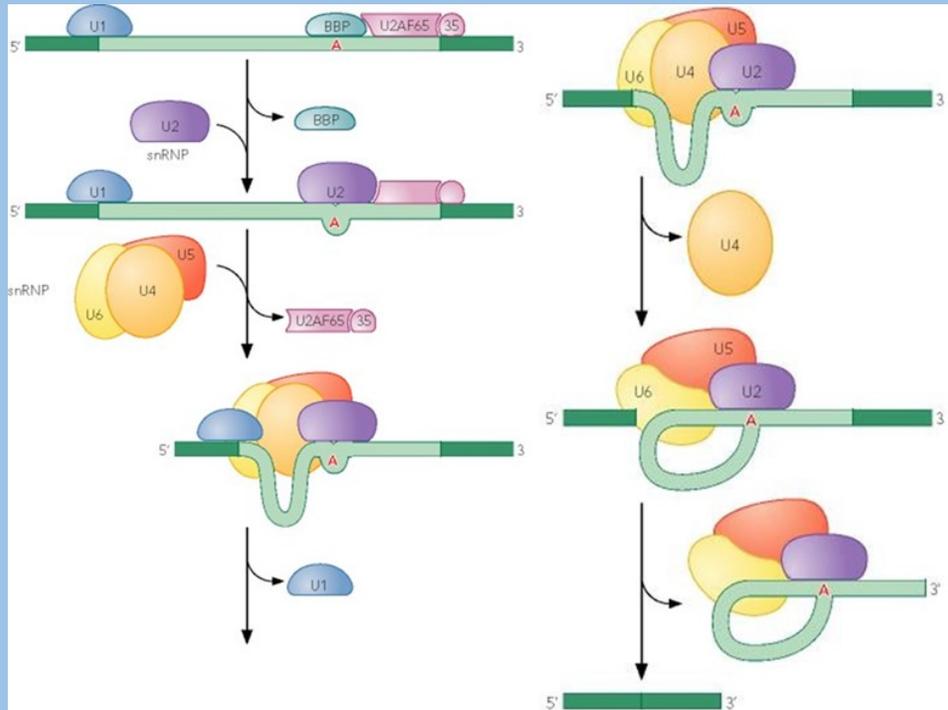
La trascrizione è un processo che porta alla formazione dell'**mRNA**, cui segue la maturazione, composta da:

- **Capping** del pre-mRNA,
- **Splicing**,
- **Poliadenilazione**.

SPLICING: processo dinamico di due reazioni di transesterificazione, mediato dal complesso **SPLICEOSOMA (snRNA + snRNP)**, dove da un pre-mRNA, costituito da **esoni** ed **introni**, si origina un mRNA maturo formato da una sequenza di esoni.



Splicing alternativo: diversa inclusione di regioni codificanti e non codificanti all'interno di un singolo mRNA



Struttura dell'RNA + legame con le

RBP



Comparsa di ripetizioni espanse di
microsatelliti
(da 1 a 6 nucleotidi)



MECCANISMO A GUADAGNO DI FUNZIONE DELL'RNA

FOCI RIBONUCLEARI:

aggregati di elementi
strutturali di RNA prodotti da
geni contenenti ripetizioni
espande.

**Tossici per la cellula perché
legano e sequestrano le RBP.**

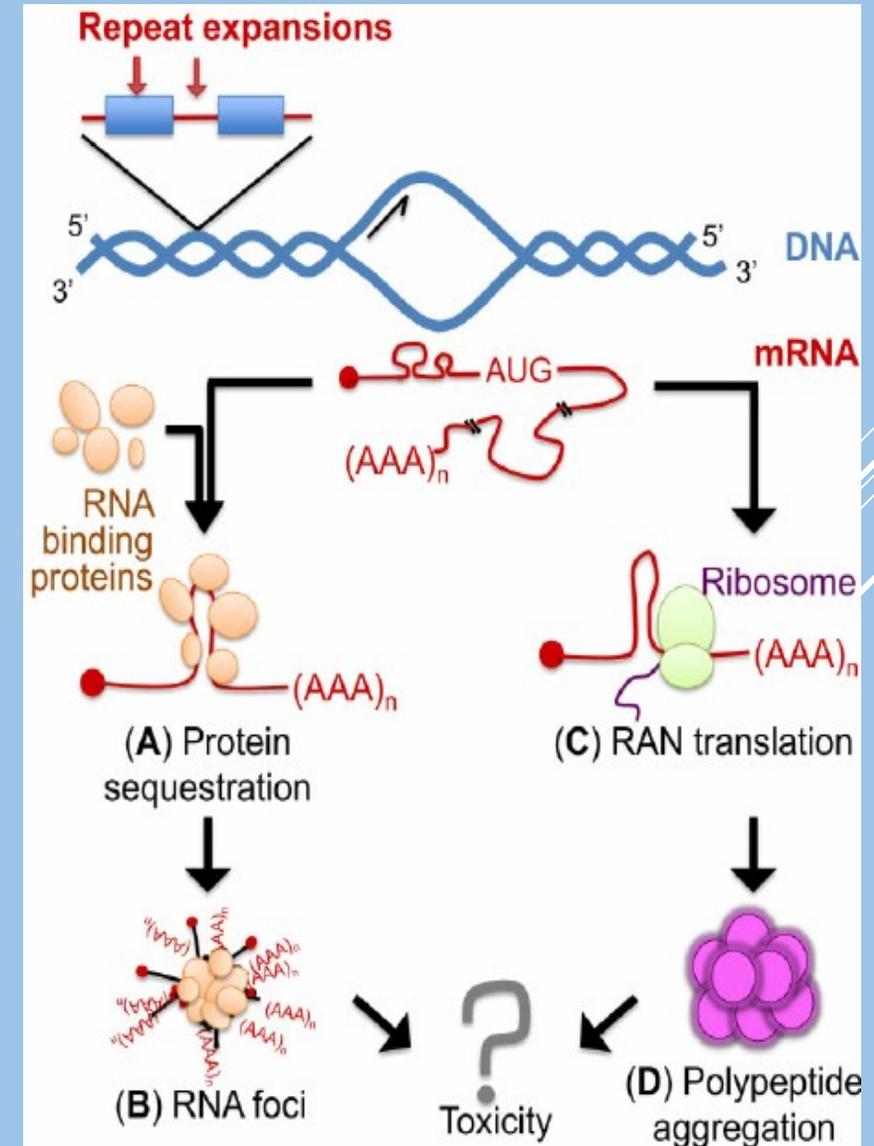


MALATTIE GENICHE:

- DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1 e 2 (DM1 e DM2),
- ATASSIA SPINOCEREBELLARE (SCA),
- SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA/DEMENTIA FRONTOTEMPORALE (ASL/FTD)

TRADUZIONE NON-AUG (RAN):

causa la
formazione di
aggregazioni di
polipeptidi
probabilmente
tossici.



DISTROFIA MIOTONICA (DM)

Seconda forma più comune di distrofia muscolare in età adulta dopo quella di Duchenne

Incidenza: **1:8000**

Disturbi multisistemici, neurodegenerativi a organi e tessuti muscoloscheletrici, gastrici, cardiaci e del SNC

Durata media della vita: **55 anni**,

Morte per aritmie cardiache, insufficienza polmonare e neoplasie.

Sintomatologia:

- debolezza progressiva dei muscoli,
- cataratta ad esordio precoce,
- miotonia o ritardo del rilassamento del muscolo scheletrico a seguito di contrazione volontaria.

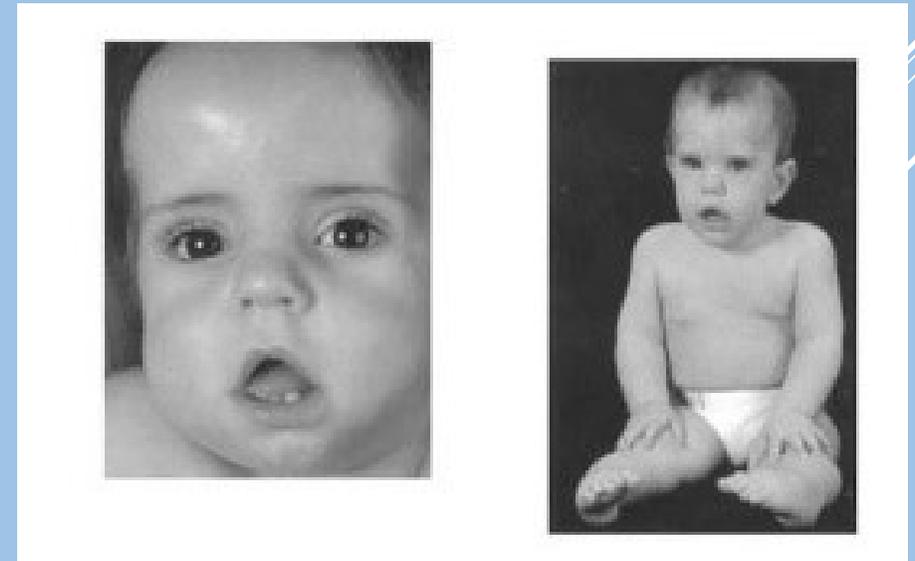
DISTROFIA MIOTONICA CONGENITA (CDM)

Nel **10-20% dei pazienti con DM1**, ma non in pazienti con DM2, i sintomi si manifestano alla **nascita**.

Tasso di mortalità del 30% nel primo anno di vita

Sintomatologia:

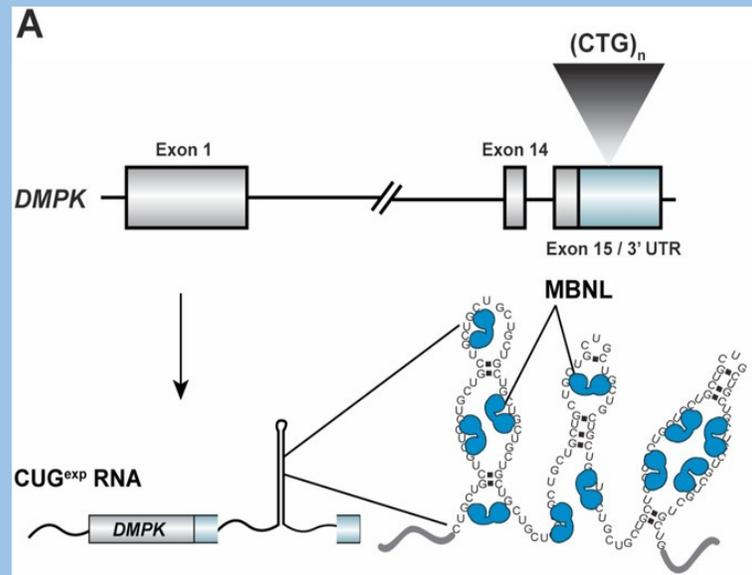
- ipotonia muscolare,
- insufficienza polmonare,
- disabilità intellettuale,
- biassicamento,
- sindrome da deficit di attenzione e iperattività.



La Distrofia Miotonica si distingue in due forme geneticamente e clinicamente distinte:

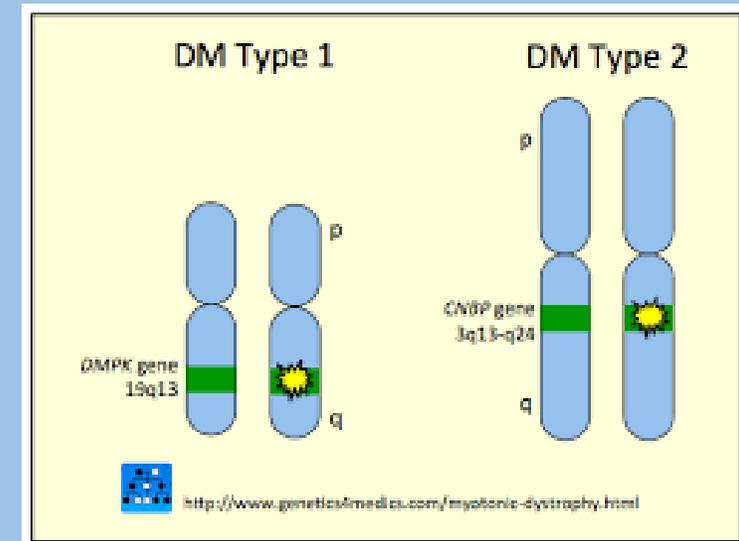
DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1 (DM1)

- Progressiva debolezza al muscolo distale.
- Causata da una **espansione ripetuta del trinucleotide CTG nell'esone 15 nella regione 3'-UTR del gene della proteina chinasi della distrofia miotonica (DMPK),**
- Ripetizioni CTG espanse: da **50 a 2000 unità**, nella normalità da 5 a 37 unità.

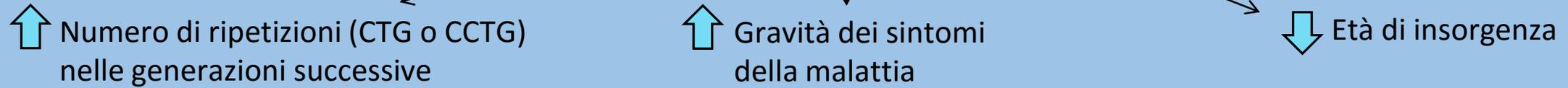


DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 2 (DM2)

- Progressiva debolezza al muscolo prossimale.
- Legata all'**espansione di ripetizioni CCTG all'interno dell'introne 1 del gene delle proteine di legame dell'acido nucleico cellulare (CNBP),**
- Numero di **ripetizioni CCTG tra 75 e 11000 unità.**

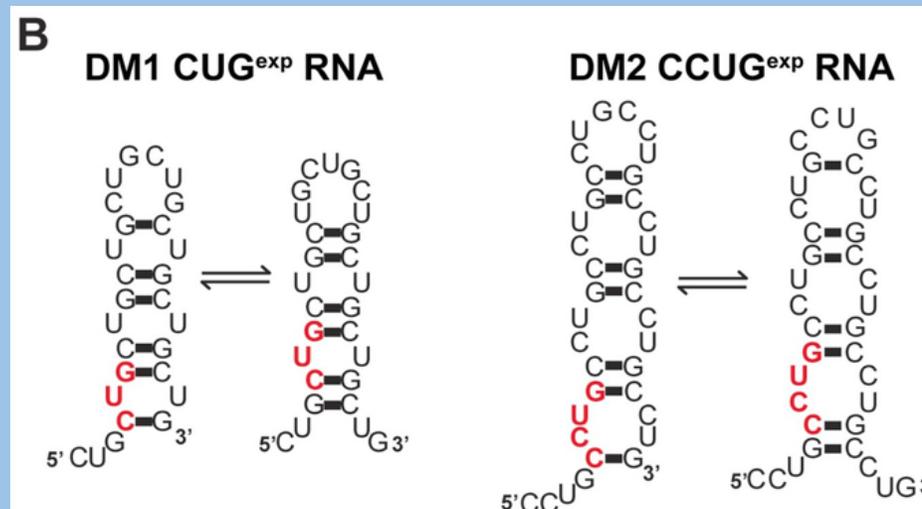


Entrambe le ripetizioni (CTG e CCTG) sono ereditate da un **motivo autosomico dominante**: il numero di ripetizioni incrementa ad ogni generazione successiva, in un fenomeno detto **ANTICIPAZIONE GENETICA**.



Gli RNA CUG^{exp} e CCUG^{exp} hanno una **struttura secondaria di tipo A**: **forcine semi-stabili** composte da appaiamenti di basi di Watson e Crick **C-G e G-C**, che conferiscono stabilità alla struttura, alternati da **coppie non canoniche U-U, C-U e U-C**, che creano delle anse.

All'aumentare della lunghezza della ripetizione **CUG** in tandem, incrementano stabilità e rigidità di queste forcine "scivolose".



PROTEINE MUSCLEBLIND-LIKE (MBNL)

- Gruppo conservato di **RNA Binding Protein (RBP)**;
- Regolano il metabolismo dell'RNA, tra cui lo splicing alternativo:

Se MBNL lega elementi a monte o all'interno dell'esone \implies agisce come **silencer**

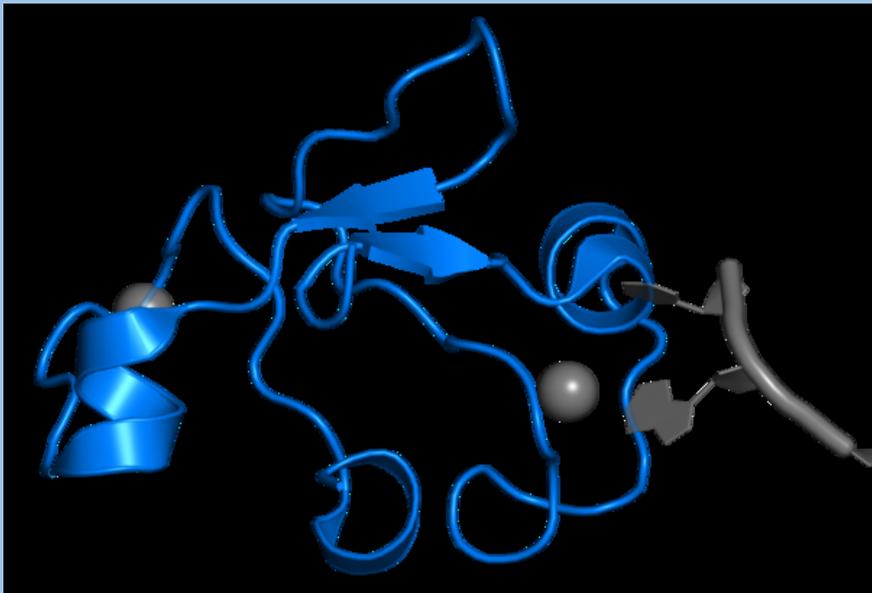
Se MBNL lega elementi a valle dell'esone \implies agisce come **enhancer**

- **Co-localizzano con i foci degli RNA CUG^{exp}/CCUG^{exp}** nelle cellule con DM, legando motivi di legame **YG₂CY** (dove **Y= C o U**): la proteina **MBNL1** lega la sequenza **UGCU**;

Il legame MBNL/RNA avviene tramite **4 motivi zinc-finger di tipo CCCH (ZF1-ZF4)**, uniti in coppie.

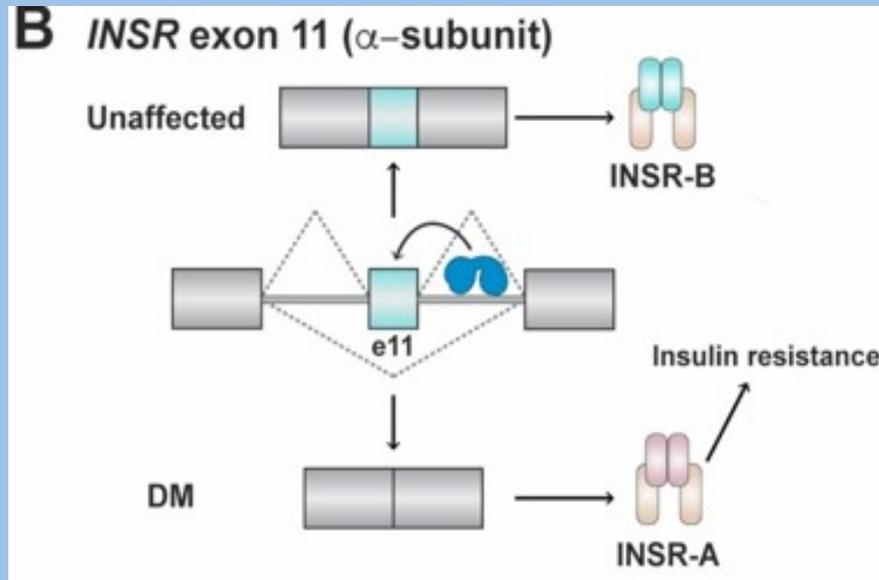
Essi legano le coppie di basi CG o GC tramite l'impilamento con i loro **residui aromatici e le arginine**, ed è favorito dalla presenza di un **numero maggiore di pirimidine che di purine**, poiché le prime promuovono la formazione di tratti a singolo filamento.

Sostituzione URIDINE con PSEUDOURIDINE \longrightarrow Destabilizzazione della struttura dell'RNA
 \longleftarrow Modifica del risultato di splicing

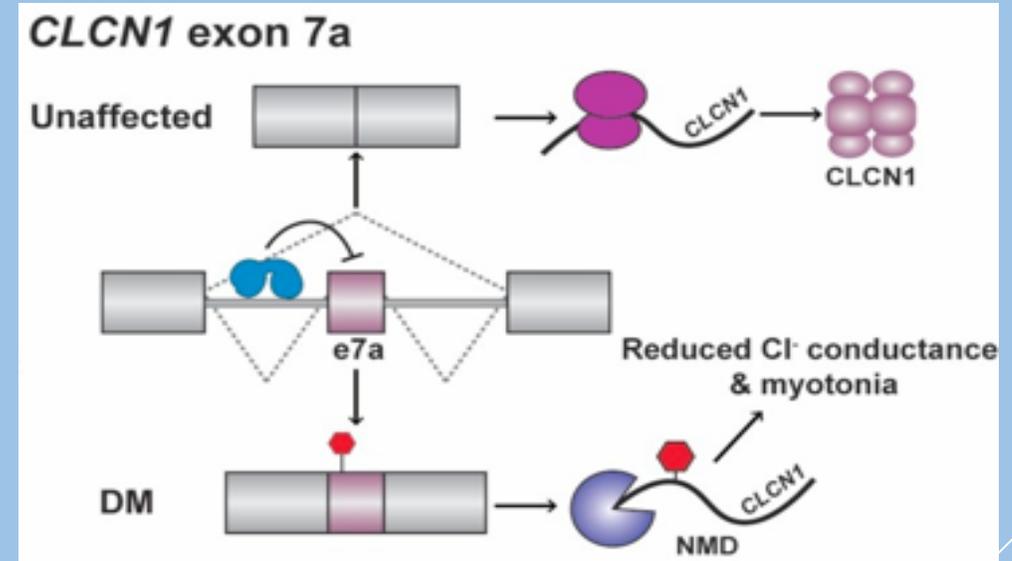


CORRELAZIONE LEGAME PROTEINE MBNL AGLI RNA CUG^{exp}/CCUG^{exp} – MANIFESTAZIONE DELLA DM

Trascrizione del recettore dell'insulina (INSR)



Trascrizione del canale del cloruro dipendente dalla tensione (CLCN1)



Pazienti DM1 con genomi ricchi di CUG

Maggiore deregolazione dello splicing

CONCORDA
CON

RNA con modello a guadagno di funzione

Aumento ripetizioni CUG/CCUG (per la DM2)

Aumento n° MBNL nel nucleoplasma

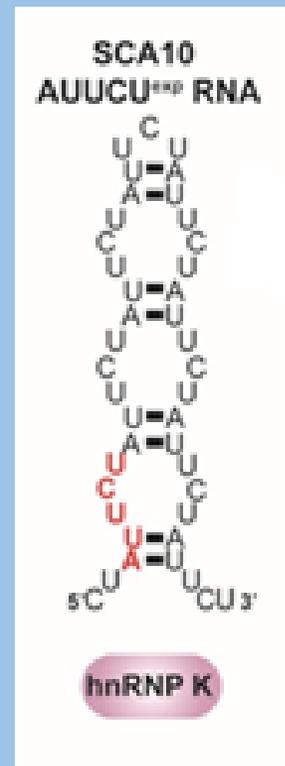
STOP modelli di splicing alternativo negli adulti

ATASSIE SPINOCEREBELLARI (SCA)

- Gruppo di malattie autosomiche dominanti;
- Causate da **espansioni di microsatelliti sia in regioni codificanti sia non codificanti di loci genomici indipendenti**;
- Gli RNA^{exp} creano strutture secondarie di **forma A o G-quadruplex (es. SCA36)**.
- *Sintomatologia:*
 - atrofia cerebellare,
 - discorso anormale,
 - perdita di coordinazione muscolare ed equilibrio,
 - movimenti involontari degli occhi e scarsa coordinazione mano-occhio;

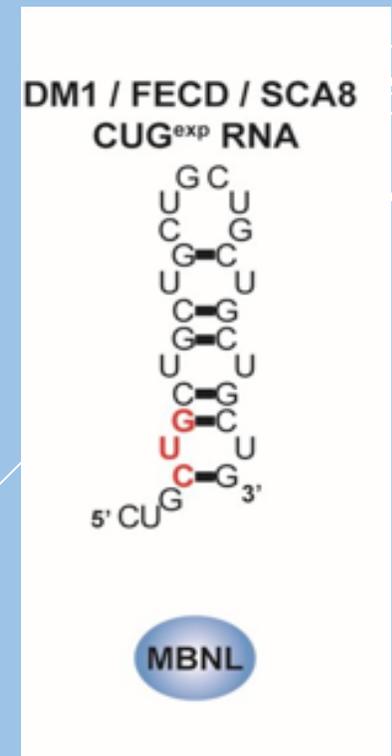
ATASSIA SPINOCEREBELLARE 10 (SCA10)

- Ripetizione del **pentanucleotide ATTCT nell'introne 9 del gene ATXN10**;
- Ripetizioni ATTCT tra **800 e 4500 unità**;
- L'RNA AUUCU^{exp} è co-localizzato con la **hnRNP K**: lega sequenze di RNA ricche di pirimidine e a **singolo filamento**;
- Struttura di **tipo A**, dove la **sequenza UCU crea erroneamente delle anse chiuse da coppie AU**.



ATASSIA SPINOCEREBELLARE 8 (SCA8)

- Espansione della **ripetizione trinucleotidica CTG nella regione 3'-UTR del gene ATXNOS**;
- Legame con le MBNL permette la **formazione di foci**;
- Crea una **struttura secondaria di tipo A**;
- **Modifiche dello splicing del trasportatore 4 GABA-A (GAT4) regolato dalle MBNL** → perdita di inibitori GABAergici nello strato granulare del cervelletto.
- Somiglianza strutturale con DM1, ma **diversità nel numero di foci**.



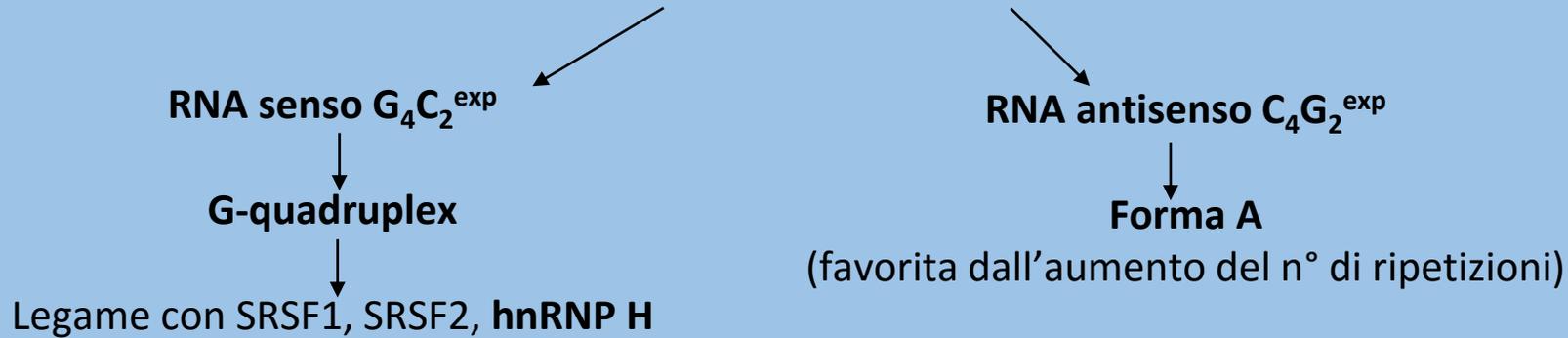
SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

- Malattia autosomica dominante;
- Disturbo neurodegenerativo progressivo: degenerazione dei neuroni motori superiori e inferiori → paralisi muscolare e alla morte;

DEMENZA FRONTOTEMPORALE (FTD)

- Malattia autosomica dominante;
- Disturbo cerebrale: degenerazione delle regioni frontale e temporale del cervello → interruzione del linguaggio, delle funzioni cognitive e delle abilità comportamentali;

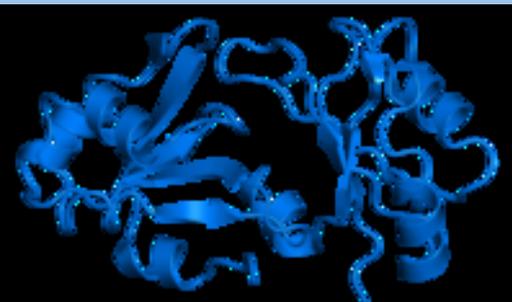
Generate dalla **ripetizione espansa GGGGCC** nel primo introne del cromosoma 9 della ORF 72 (C9ORF72), trascritta **bidirezionalmente** in:



Funziona come **enhancer e silencer** nello **splicing alternativo** legando RNA con **motivi ricchi di guanine**:

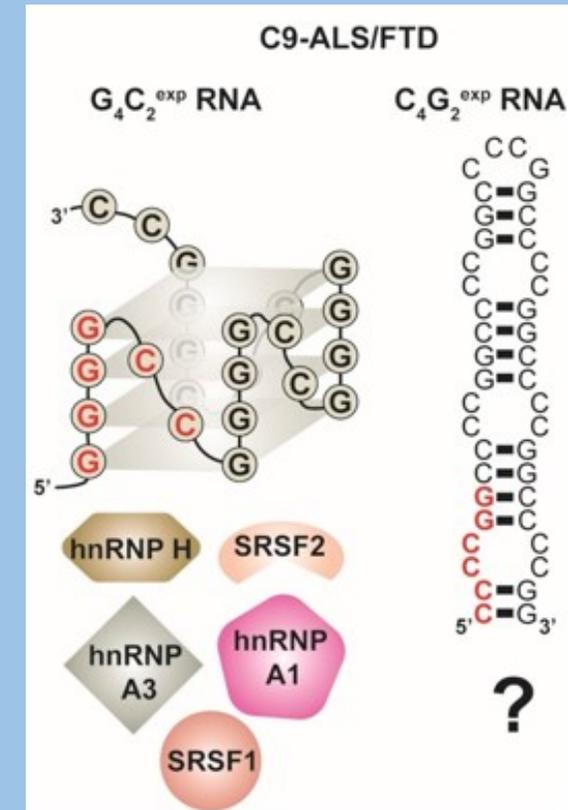
Inclusione esone = aumento legame degli introni a monte e a valle dell'esone bersaglio

Esclusione esone = hnRNP H si lega all'interno dell'esone bersaglio



hnRNP H

La **deplezione della hnRNP H dal nucleoplasma** provoca la **spliceopatia**.



OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO (ASO)

- Brevi frammenti di DNA con sequenza nucleotidica complementare del filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA). Si appaiano al filamento «senso» o all'mRNA, annullandone l'attività biologica.
- Legano RNA patogeni aventi ripetizioni espanse tramite accoppiamenti di basi complementari.
- Interferiscono con la formazione di foci di RNA ripetuti e **prevengono l'associazione delle RBP** a questi RNA tossici.
- **Negli RNA CUG^{exp} della DM1** provocano la redistribuzione cellulare delle MBNL e la correzione dello splicing errato.
- **Negli RNA G₄C₂^{exp} della C9-ALS/FTD** bloccano la formazione di foci e accumulazioni nucleari dell'**enzima ADARB2** (Adenosina Deaminasi Specifica per l'RNA B2).

OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

- DNA patogeni con appaiamento di basi inter- e intramolecolari e ripetizioni espanse formano RNA con anomali aggregati (foci);
- Questi RNA espansi possiedono la capacità di adottare strutture di RNA con stabilità variabile in base al contenuto di sequenze e al contesto della ripetizione;
- Gli RNA tossici forniscono una base fondata per il legame delle RBP, riducendone la loro quantità nell'ambiente cellulare;
- Impatti sul "dosaggio" delle RBP all'interno della cellula hanno profondi effetti sul metabolismo dell'RNA, in particolare sullo splicing, correlato alla funzione regolatrice di specifiche RBP che legano l'RNA e provocano la manifestazione della malattia.
- Serviranno ulteriori studi per poter ovviare al problema della formazione dei foci ribonucleari, ma al momento non si conoscono altre vie.

Riassunto esteso

Lo splicing è un meccanismo genico facente parte del processo della trascrizione. Tramite esso si viene a formare, a partire da un filamento di pre-mRNA, un RNA messaggero (mRNA), composto di soli esoni e a cui si potranno legare proteine. Questo prodotto sarà fondamentale per la traduzione delle proteine.

Lo splicing può determinare la formazione di più isoforme di un pre-mRNA, tramite l'esclusione di alcuni esoni o l'inclusione di introni, elementi genici solitamente eliminati. Questo modello viene definito splicing alternativo (AS), o aberrante; la sua regolazione avviene da parte di alcune proteine che legano l'RNA, dette RNA Binding Proteins (RBPs).

L'AS determinato dalle RBPs causa disturbi da microsattelliti e ripetizioni espanse, riscontrabili nelle malattie come la DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1 E 2, nelle ATASSIE SPINOCEREBELLARI, nella SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA e nella DEMENZA FRONTOTEMPORALE.

Queste malattie sono causate da un meccanismo patogeno di RNA a guadagno di funzione: il legame tra RNA con ripetizioni espanse di basi e le RBP danno origine ai foci ribonucleari, tossici per la cellula proprio per la loro abilità di legare e sequestrare queste proteine.

La Distrofia Miotonica può essere di due tipi (1 e 2), causati rispettivamente dalle ripetizioni CTG nel gene della proteina DMPK e CCTG nel gene della proteina CNBP, i cui RNA CUG^{exp} e CCUG^{exp} sono legati dalle proteine MBNL e formano strutture secondarie a forcina e foci ribonucleari.

L'Atassia Spinocerebellare (SCA) è una famiglia di malattie autosomiche dominanti causate da ripetizioni espanse. In particolare, la SCA10 è causata dalla ripetizione ATTCT nel gene ATXN10 e il suo RNA^{exp} viene legato dalla proteina hnRNP K; la SCA8 è determinata dalla ripetizione CTG, proprio come la DM1, ma localizzata nel gene ATXNOS.

Infine, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e la Demenza Frontotemporale (FTD) sono determinate dalla ripetizione GGGGCC nell'introne del cromosoma 9 della ORF 72, trascritta bidirezionalmente in due RNA, RNA G₄C₂^{exp} e RNA C₄G₂^{exp}, il quale determina la manifestazione di sintomi differenti. L' RNA G₄C₂^{exp}, relativo alla SLA, viene legato dalla proteina hnRNP H e si assembla a formare foci ribonucleari.

In conclusione, sono stati effettuati studi per comprendere come si potrebbe impedire la formazione dei foci ribonucleari, evitando la manifestazione di questa malattia, e proponendo come soluzione gli oligonucleotidi antisenso (ASO). Questi oligonucleotidi interferiscono con il filamento di DNA o mRNA, impedendo l'attacco delle RBP all'RNA e soprattutto la formazione dei foci ribonucleari. Al momento questa è solo una delle vie intraprese per ovviare a questo problema, ma serviranno sicuramente ulteriori studi per ottenere risultati migliori.

Bibliografia

BBA Gene Regulatory Mechanisms, Journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagrm, "Repeat-associated RNA structure and aberrant splicing", Melissa A. Hale ^a, Nicholas E. Johnson ^a, J. Andrew Berglund ^b. (^aDepartment of Neurology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, USA; ^bThe RNA Institute, Department of Biological Sciences, University at Albany, State University of New York, Albany, NY 12222, USA).

<http://www.unife.it/farmacia/Im.farmacia/insegnamenti/biochimica-e-biologia-molecolare/materiale-didattico-modulo-di-biologia-molecolare/8-rna-maturazione>

"Decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders", *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41. 109-134, February 2015, M. J. Walsh, J. Cooper-Knock, J. E. Dodd, M. J. Stopford, S. R. Mihaylov, J. Kirby, P. J. Shaw and G. M. Hautbergue.

www.researchgate.net/publication/272486318_32_Decoding_the_pathophysiological_mechanisms_that_underlie_RNA_dysregulation_in_neurodegenerative_disorders

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdocplayer.it%2F15918167-Malattie-muscolari-miopatie-ereditarie-ed-acquisite.html&psig=AOvVaw1EAnpLzoVxQBiuYX491_p7&ust=1592328315372000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCMD747GrhOoCFQAAAAAdAAAAABAE

"Study identifies potential drug targets for muscular dystrophy treatments", Public Release: January 9, 2017; JCI Journals, Perrine Castets, Biozentrum, University of Basel

https://www.eurekalert.org/pub_releases/2017-01/jj-sip010317.php

<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3d2s/protein/2>

<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/5u6h/bound/ZN#101A>

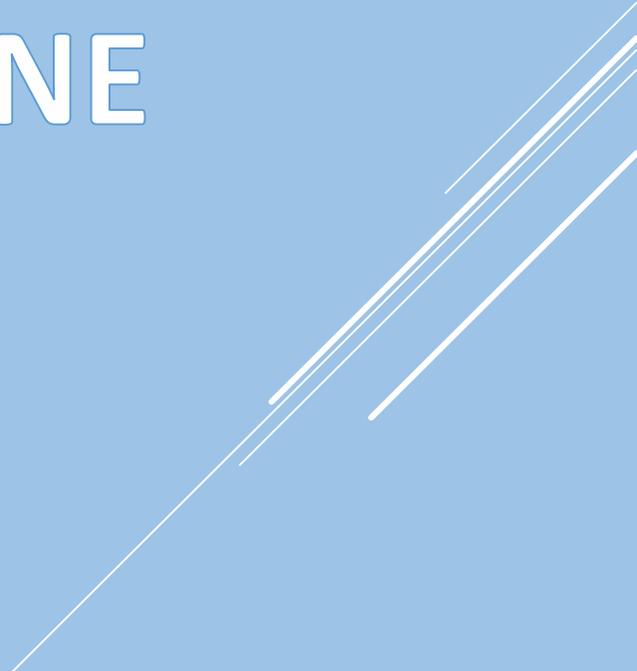
Nucleic Acids Research 2018 Sep 28; 46(17): 9119 – PMID: PMC61585049133; "MBNL splicing activity depends on RNA binding site structural context", Katarzyna Taylor, Lukasz J. Sznajder, Piotr Cywoniuk, James D. Thomas, Maurice S. Swanson, Krzysztof Sobczak. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158504/>

https://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/6dhs_assembly_1_chain_front_image-200x200.png

www.univacalabria.it/formazione/2014/pdf/21maggio/Anfossi.pdf

<https://www.artoi.it/oligonucleotidi-antisenso/>

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

The image features a solid light blue background. In the center, the text "GRAZIE PER L'ATTENZIONE" is written in a bold, white, sans-serif font. In the bottom right corner, there are several thin, white, parallel diagonal lines that create a sense of motion or a modern design element.