UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

IMPORTANZA DEI FATTORI DI SPLICING NEI TRATTI DISTINTIVI DEL CANCRO AL SENO E NELLA PROGRESSIONE DELLA MALATTIA

Splicing regulatory factors in breast cancer hallmarks and disease progression

Tesi di laurea di:
Benedetta Bernacchia

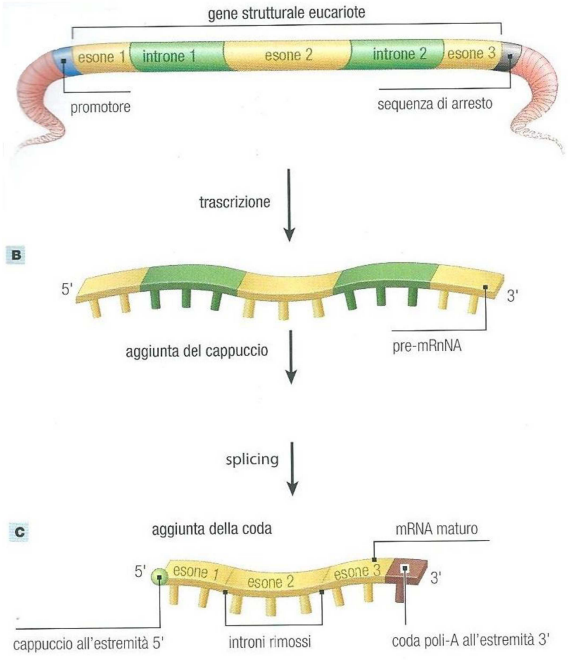
Relatore:
Prof.ssa Anna La Teana

Sessione straordinaria Febbraio 2020

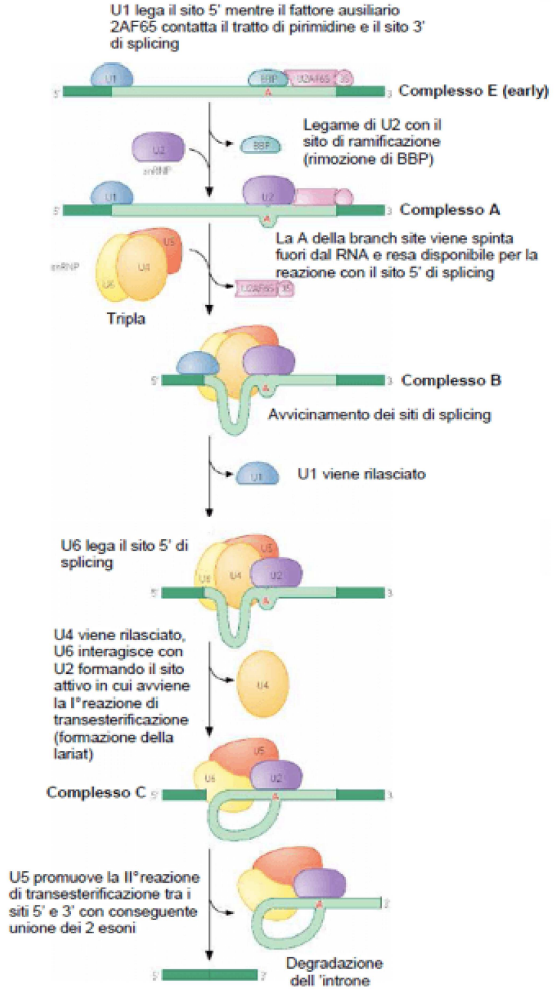
Anno Accademico 2018-2019

INTRODUZIONE

- *Che cos'è lo splicing*? Lo **splicing** è una modifica del nascente pre-mRNA nella quale gli introni sono rimossi e gli esoni vengono uniti.
- *Come avviene*? Esso avviene attraverso un processo a più fasi catalizzato dallo **spliceosoma**, complesso multicomponente formato da cinque piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP): U1,U2,U4,U5 e U6.
- *Quando si parla si splicing alternativo (AS)*? Quando alcuni trascritti primari producono molecole diverse di RNA, ognuna delle quali codifica per una proteina differente. E' proprio l'insieme di queste **isoforme** che promuove e supporta la trasformazione neoplastica, la crescita e la progressione del tumore.
- *Quali sono i cinque tratti distintivi sui quali agiscono questi fattori di splicing*? Proliferazione elevata, attivazione e formazione delle metastasi, resistenza alla morte cellulare, deregolamentazione energetica cellulare e angiogenesi.



Schema riassuntivo delle fasi di elaborazione di una molecola di mRNA trascritta da un gene strutturale di un eucariote.



DISREGOLAZIONE DEI FATTORI DI SPLICING NEL CANCRO AL SENO

- Gli eventi di splicing specifici per il cancro al seno vengono stabiliti tramite percorsi diversi:

1. Cambiamenti nei livelli di espressione, attività e localizzazione dei fattori di splicing
2. Mutazioni nei domini funzionali delle proteine correlate allo splicing e/o mutazioni di sequenze regolatorie come enhancer o silenziatori

Se questi processi vanno incontro a processi di splicing alternativo allora possono essere considerati come i responsabili dello sviluppo del carcinoma mammario

1- Espressione, attività e localizzazione alterata dei fattori di splicing

Espressione alterata

Cambiamenti significativi nel modello di splicing possono avvenire durante la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

I livelli di espressione di specifici fattori di splicing sono molto modificati:

- il fattore **RBFOX2** è uno dei più differenziati, espresso tra lo stato epiteliale e quello mesenchimale.

I FATTORI DI SPLICING POSSONO AVERE IL CONTROLLO DELL'EMT E DELLA PROGRESSIONE DEL CARCINOMA.

Modifiche post traduzionali e struttura della cromatina

L'attività di alcuni fattori di splicing può essere regolata anche da modifiche post traduzionali come acetilazione, fosforilazione e ubiquitinazione:

- acetilazione e ubiquitinazione di **SRSF5** controllano crescita tumorale

Importante è anche:

- La posizione intracellulare dei fattori di splicing
- La struttura della cromatina
  - *gli **lncRNA** possono alterare l'ambiente della cromatina reclutando complessi repressivi di adattatori cromatin-splicing che portano poi allo AS di fattori come **FGFR2***

2- Mutazioni

Lo splicing anomalo può essere causato da mutazioni nei geni che codificano per questi fattori:

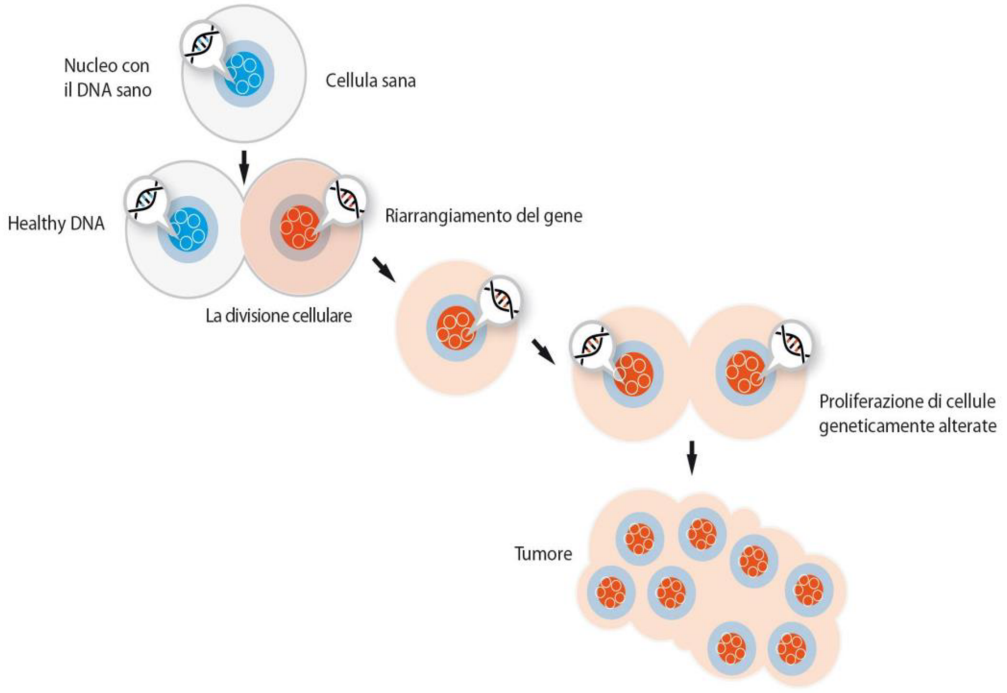
1. *Mutazioni per **U2AF1, SRSF1, SF3B1** nelle sindromi mielodisplastiche* . Causano principalmente ematopoiesi a causa della compromissione del sito di riconoscimento in posizione 3', che causa alterazioni nel processo di splicing
2. *Mutazioni di **U2AF1**: alterazione dei percorsi cardine per lo sviluppo del cancro come apoptosi tramite CASP8 e risposta al danno del DNA*
3. *Mutazioni di **SF3B1**: classificate come possibili mutazioni pilota, provocano cambi di funzione con annesse variazioni di 100 siti di splicing all'estremità 3'*
4. *Mutazioni a **ESE** (enhancer di giunzioni esoniche), **ESS** (silenziatori di giunzioni esoniche), **ISE** (enhancer di giunzioni introniche) e **ISS** (silenziatori di giunzioni introniche)*

RUOLO DEI FATTORI DI SPLICING NEI SEGNI DISTINTIVI DEL CANCRO

- PROLIFERAZIONE ELEVATA

1. VIE DIPENDENTI DAL RECETTORE ORMONALE: l'elevata proliferazione è probabilmente il segno distintivo del cancro più critico. Ciò si verifica principalmente attraverso mutazioni che provocano la sovra espressione dei recettori ormonali tra cui:
   - **ER** (recettore degli estrogeni)
   - **AR** (recettore degli androgeni)
   - **EGFR** (recettore del fattore di crescita epidermico)
   - **HER2** (recettore 2 del fattore di crescita epidermica umana)

   → Livelli di espressione di **PRPF4B** sono direttamente regolati da ER e da HER2. Il knockdown di HER2 provoca la downregulation di PRPF4B, mentre l'upregulation di HER2 aumenta i livelli di questo fattore di splicing nelle linee cellulari di carcinoma mammario.



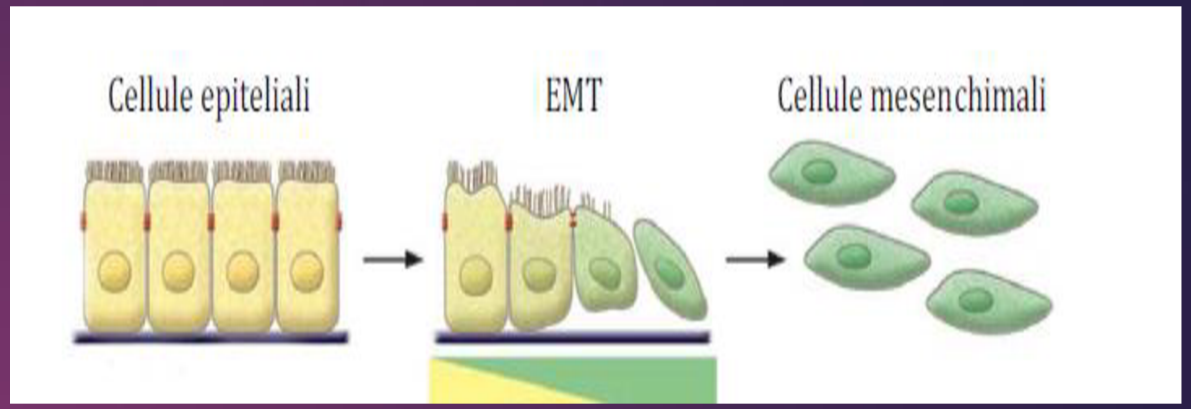
2. VIE INDIPENDENTI DAL RECETTORE ORMONALE: altri tumori sono invece indipendenti da queste cascate di ormoni:
   - **PTBP1** inibisce la crescita cellulare nelle linee cellulari di carcinoma mammario
   - **ETS-1** è sovra regolato nel carcinoma mammario ed è associato con la sopravvivenza delle cellule tumorali

NEL COMPLESSO POSSIAMO CONCLUDERE CHE I FATTORI DI SPLICING GIOCANO UN RUOLO IMPORTANTE NELLA PROLIFERAZIONE SREGOLATA DEL CANCRO AL SENO, ATTIVANDO DIRETTAMENTE O INDIRETTAMENTE I RECETTORI ORMONALI

- Dipendenza del carcinoma mammario dai componenti spliceosomici
  - fattori come **BUD31**, **SF3B1** e **SRSF1** sono noti per essere bersagli genici di terapie tumorali.

- ATTIVAZIONE E FORMAZIONE DELLE METASTASI
- *Cosa causa la morte per cancro al seno?*

Formazioni di lesioni metastatiche negli organi secondari. La formazione di metastasi avviene attraverso diversi passaggi che prendono il nome di invasione-metastasi a cascata. Le cellule tumorali primarie del seno iniziano a invadere localmente il tessuto circostante e spesso subiscono una variazione fenotipica caratterizzata dalla transizione epiteliale-mesenchimale (**EMT**).



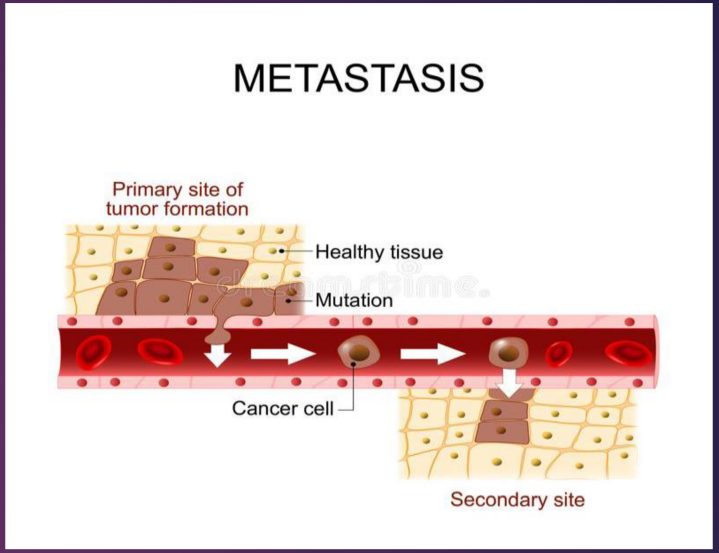
Le cellule epiteliali, con forti strutture di adesione, possono passare a un fenotipo mesenchimale migratorio con perdita di polarità cellulare e contatti cellula-cellula.

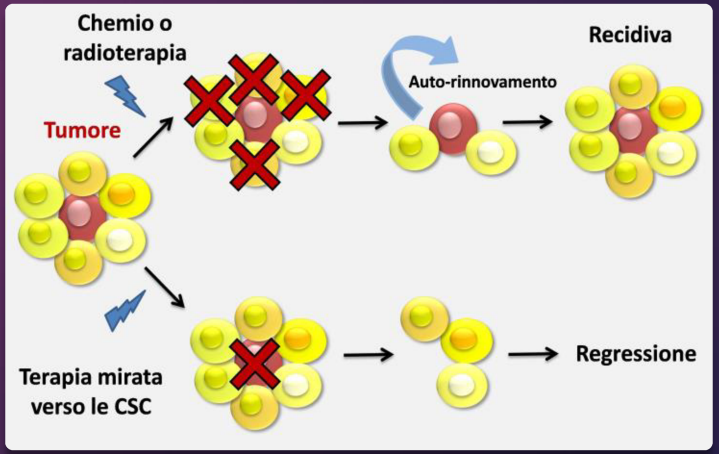
Ciò causa:

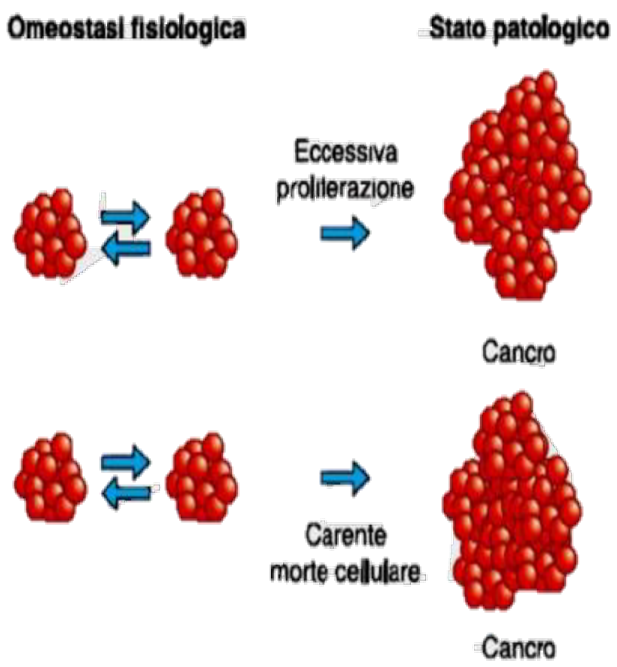
- l'infiltrazione nel tessuto adiacente
- fuga nel sangue o nei vasi linfatici

Diversi fattori di splicing sono stati associati a questo processo di EMT:

1. **QKI** e **RBFOX1** che attraverso il legame con FLNB e il rilascio di FOXC1 portano ad uno strato mesenchimale
2. Fattori convolti nella formazione di metastasi: **hnRNPs**
   - **hnRNPA1**: associata a recidiva metastatica
   - **nuclear hnRNPA1**: soppressore del tumore, inibisce l'inclusione dell'esone 3b di GTPasi Rac1, evitando la formazione dell'isoforma maligna Rac1b
   - **hnRNPM**: compete con ESRP1 per regolare lo splicing di esoni in geni coinvolti nei processi correlati a EMT. Controlla inoltre EMT modulando l'espressione dell'isoforma di CD44 che aumenta l'espressione di TGFβ
   - **hnRNP PTB1**: sovra regolato in cellule epiteliali mammarie umane progressivamente trasformate
3. Fattori di splicing **SRSF protein chinase 1** (SRPK1): esso è espresso altamente nel carcinoma mammario più aggressivo. Questi fattori SR hanno un ruolo importante, soprattutto SRSF1 che è amplificato e sovra regolato e che trasforma le cellule immortali quando sovra espresso





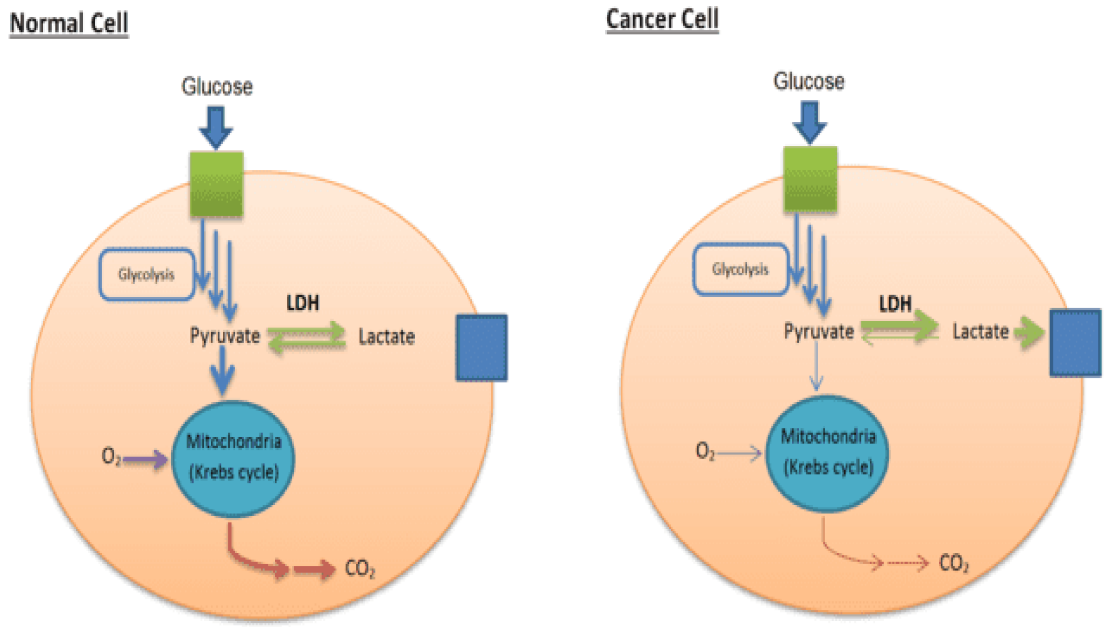


- RESISTERE ALLA MORTE CELLULARE
- Resistenza agli stress fisiologici: Le cellule tumorali si adattano e riorganizzano il loro programma apoptotico per sopravvivere
  - **SRSF1** che è responsabile dell'AS dei regolatori cruciali per l'apoptosi come BIM γ1 e γ2, fa si che si vengono a creare isoforme anti-apoptotiche che non rispondono più ai segnali apoptotici
    - MOLTE VOLTE PERO' INTERVIENE LA RISPOSTA AL DANNO DEL DNA CHE PREVIENE UN'ULTERIORE PROLIFERAZIONE E CERCA DI RIPARARE LE LESIONI ANCHE ATRAVVERSO L'APOPTOSI
- Resistenza ai farmaci: le cellule potrebbero anche acquisire proprietà con conseguente resistenza agli agenti citotossici
  - la sovra espressione di una particolare **RNA-binding-protein** e di **RBM17** comporta una resistenza a chemioterapici come doxorubicina e vincristina
  - la sovra espressione di **TRA2A** provoca AS di RSRC2 con resistenza a paclitaxel

- DEREGOLAMENTAZIONE ENERGETICA CELLULARE

La deregolamentazione dell'energia cellulare è strettamente correlata alla proliferazione cellulare incontrollata. Essa è necessaria per nutrire le cellule durante la crescita e la divisione

- Condizioni aerobiche cellule sane: glicolisi e fosforilazione ossidativa nei mitocondri
- Condizioni anaerobiche cellule sane: glicolisi
- Cellule tumorali: riprogrammano il loro metabolismo di glucosio usando principalmente la glicolisi anche in presenza di ossigeno
  - **effetto di Warburg**

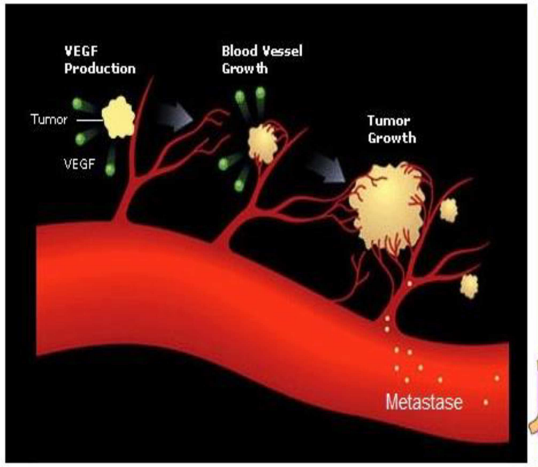


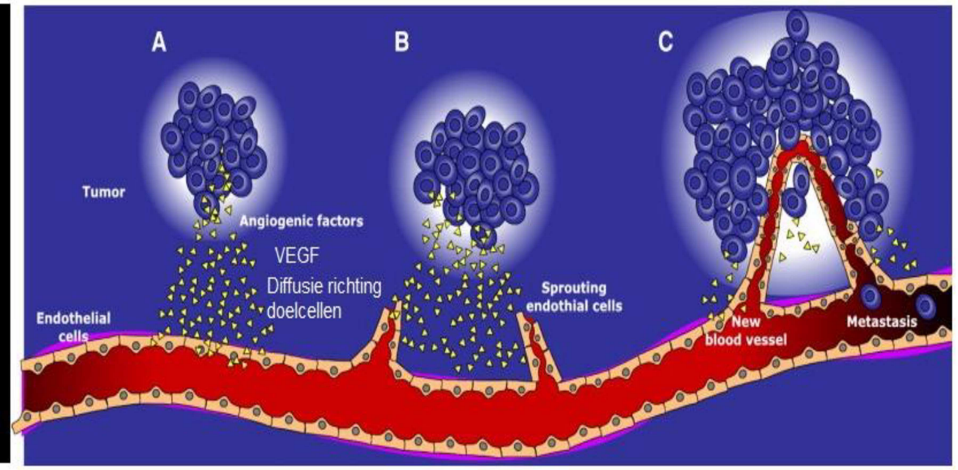
ANGIOGENESI

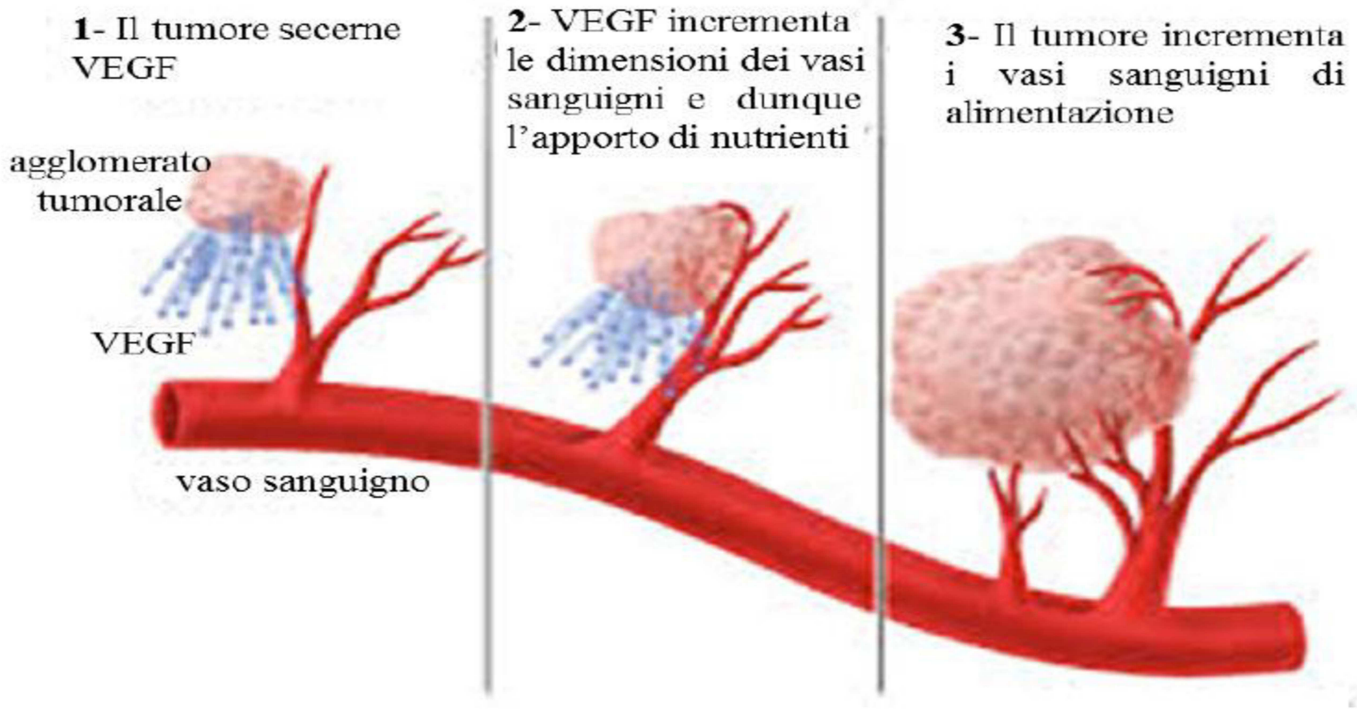
La formazione di nuovi vasi sanguigni è fondamentale per la progressione di tumori poiché:

- Fornisce al tumore i nutrienti necessari per la crescita
- Porta le cellule tumorali in stretta vicinanza alla circolazione sanguigna facilitando l'invasione e la formazione di metastasi

→ *VEGF componente chiave dell'angiogenesi*
→ *Alti livelli di VEGF= rischio maggiore di sviluppare metastasi*







FATTORI DI SPLICING NEGLI ALTRI SEGNI DISTINTIVI DEL CANCRO AL SENO

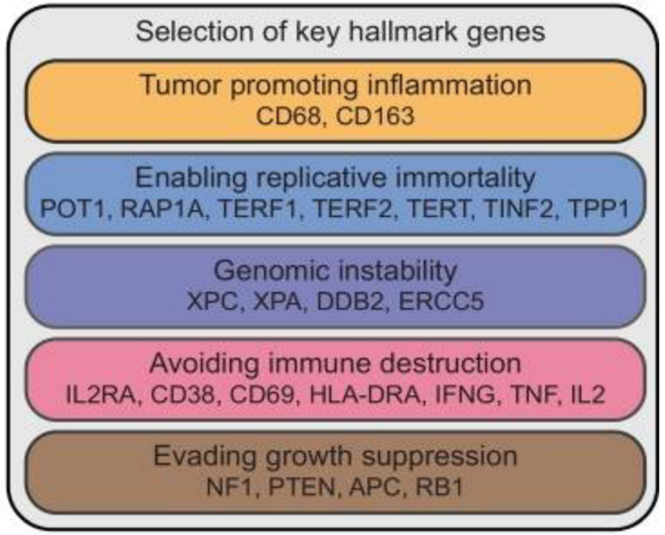
Per quanto riguarda gli altri 5 segni distintivi ritroviamo:

1. Instabilità genica
2. Tumore che favorisce l'infiammazione
3. Abilitazione immortalità replicativa
4. Prevenzione della distruzione immunitaria
5. Elusione della soppressione della crescita

Per quanto riguarda essi vi sono ancora diversi dubbi, non è infatti stato possibile identificare precisamente i rispettivi fattori di splicing. Attraverso diversi esperimenti si sono però raggiunti traguardi importanti:

- Ex: *l'instabilità del genoma è caratterizzata da una perdita di meccanismi di riparazione*

Attraverso il confronto tra persone malate e persone sane è stato però possibile individuare con più certezza i livelli di espressione di specifici fattori di splicing, analizzati poi attraverso il **T-test**



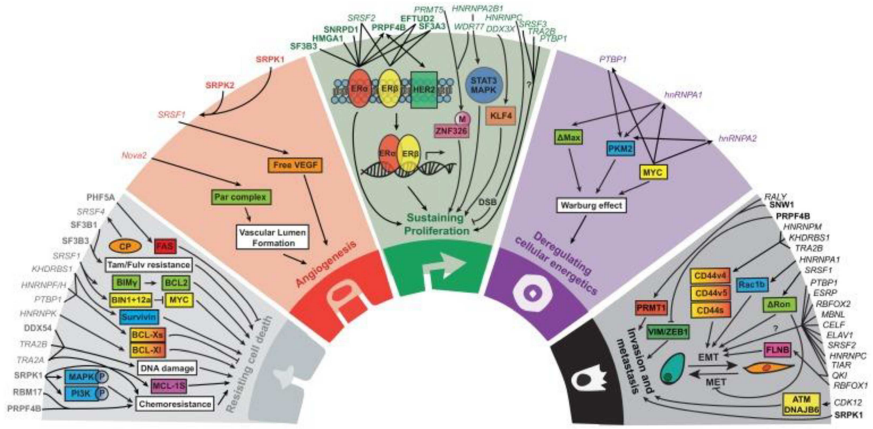
PROSPETTIVE E CONCLUSIONE FUTURE

Possibili strategie di cura:

- intervento su questi fattori di splicing come possibile cura antitumorale, che va a limitare la mortalità delle donne
- inibizione farmacologica dello spliceosoma, la quale potrebbe essere una possibile strategia terapeutica per i tumori del cancro al seno dipendenti da MYC
- impiego degli SSO: nucleotidi, a singolo filamento, costituiti da 20-30 nucleotidi che si legano al pre-mRNA e impediscono il legame dei fattori di splicing, con conseguente commutazione del sito di splicing

→ *Ad esempio il trattamento con SSO induce il salto dell'esone 15 con HER2, causando la riduzione della proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi*

- Obiettivi futuri: CREARE INIBITORI CHE PREVENGANO LA FORMAZIONE DELLE METASTASI E LA MORTE DIEI PAZIENTI



BIBLIOGRAFIA:

- Oncotarget. 2019 Oct, *Splicing regulatory factors in breast cancer hallmarks and disease progression*. Koedoot E1, Wolters L1, van de Water B1, Dévédec SEL1
- Biologia dello sviluppo, Piero Andreuccetti, O. Carnevali. McGraw-Hill Education

SITOGRAFIA

- https://biologielessen.nl/index.php/dna/714-kanker
- https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/splicing.png
- https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/schematizzazione-delle-reazioni-di-splicing.png
- https://thumbs.dreamstime.com/b/compressioni-delle-cellule-tumorali-tramite-il-vaso-sanguigno-durante-le-metastasi-132100282.jpg