



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

Corso di Laurea in Scienze Biologiche L-13

CARATTERISTICHE DELL'mRNA DI CFTR E IMPLICAZIONI PER LO SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE

FEATURES OF CFTR mRNA AND IMPLICATIONS FOR THERAPEUTICS DEVELOPMENT

Tesi di Laurea di:
Rosa Giulia Fagnocchi

Docente Referente:
Chiar.ma Prof.ssa Anna La Teana

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2022-2023

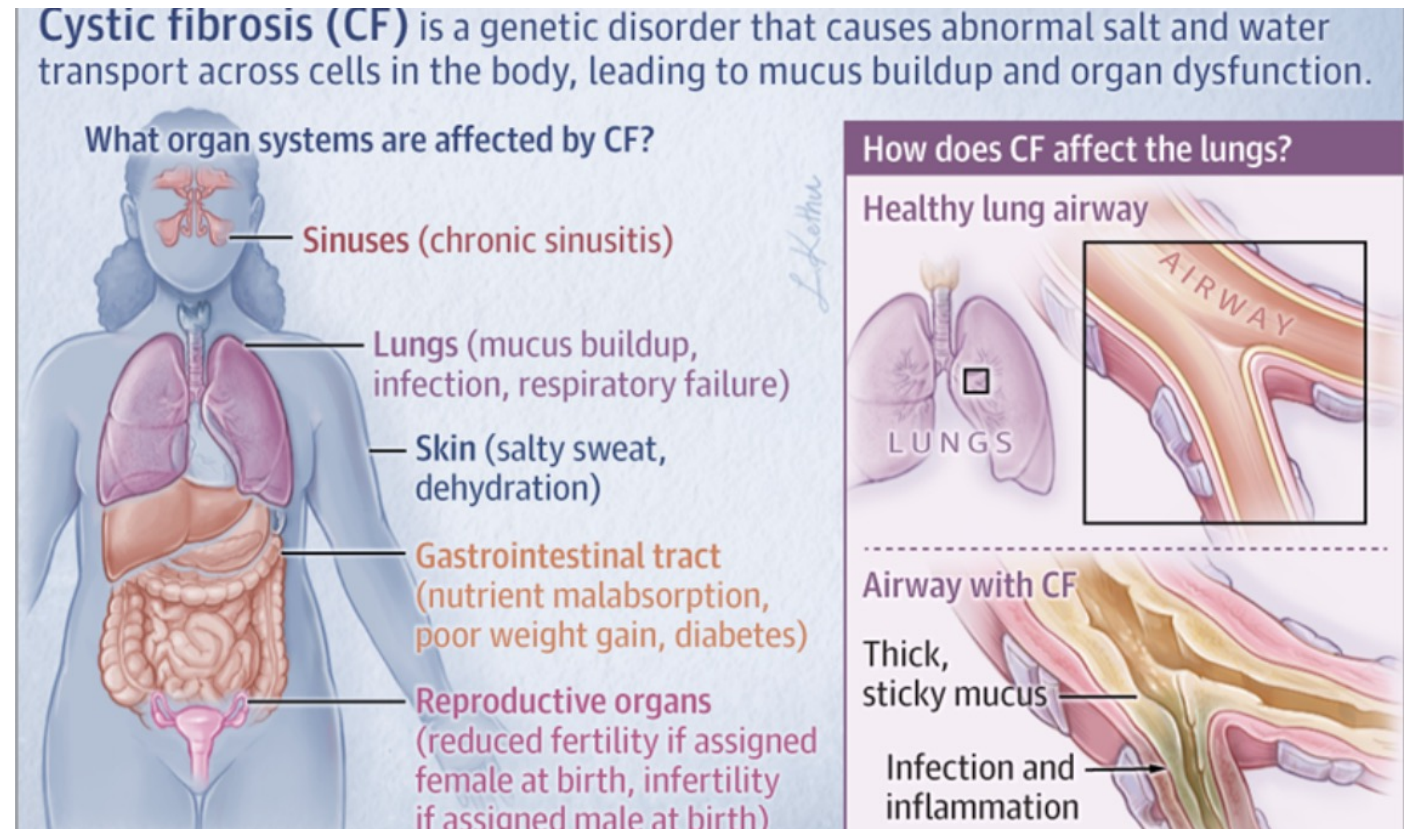
La fibrosi cistica

Malattia autosomica recessiva causata dal malfunzionamento della proteina canale codificata dal gene **CFTR**.

Sintomatologia

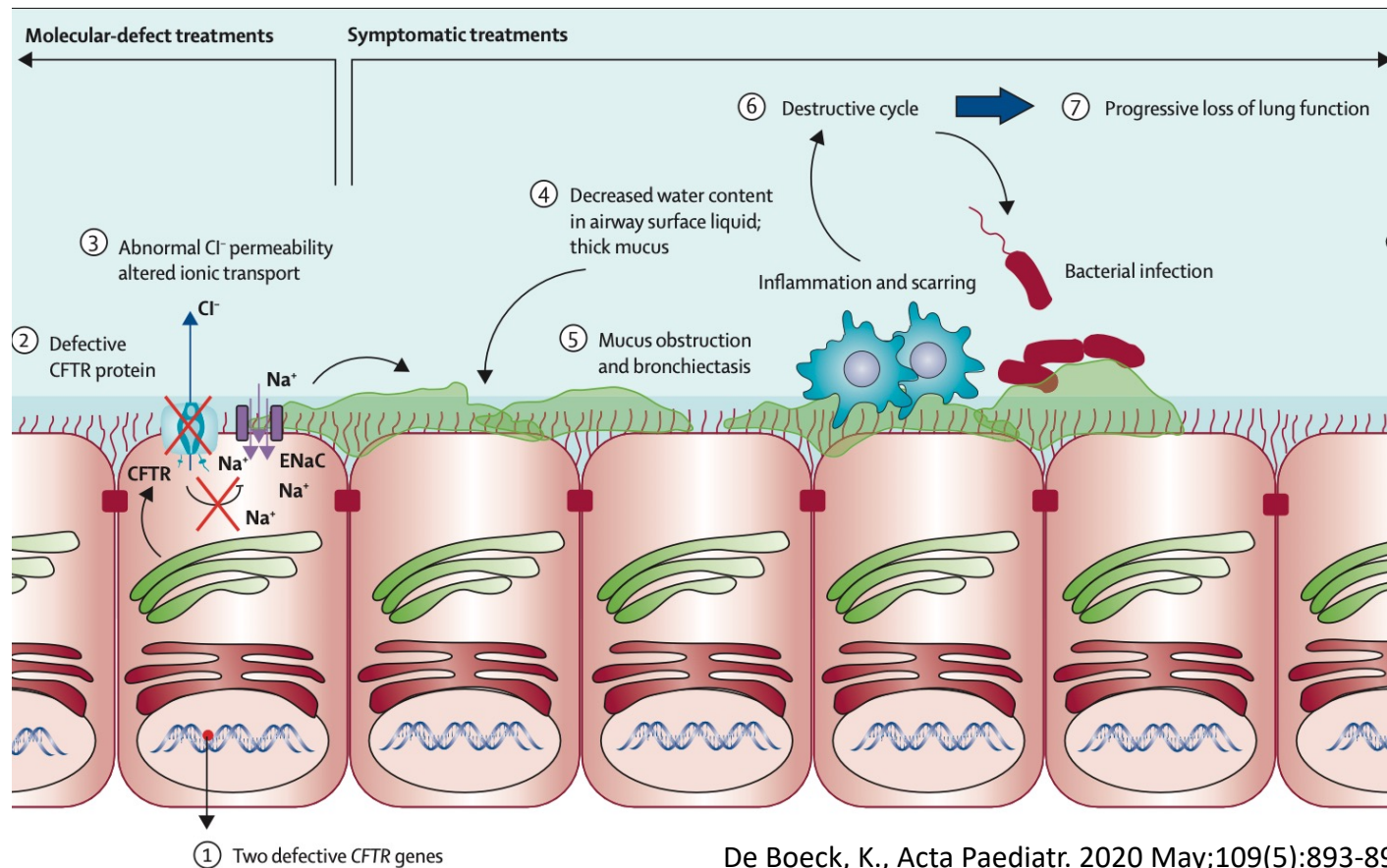
accumuli di muco denso che ostruiscono:

- vie respiratorie
- tratto gastrointestinale



Le cause

Mutazione del gene CFTR che codifica per una proteina della famiglia ABC di classe C che media l'efflusso degli ioni cloruro o il loro riassorbimento.

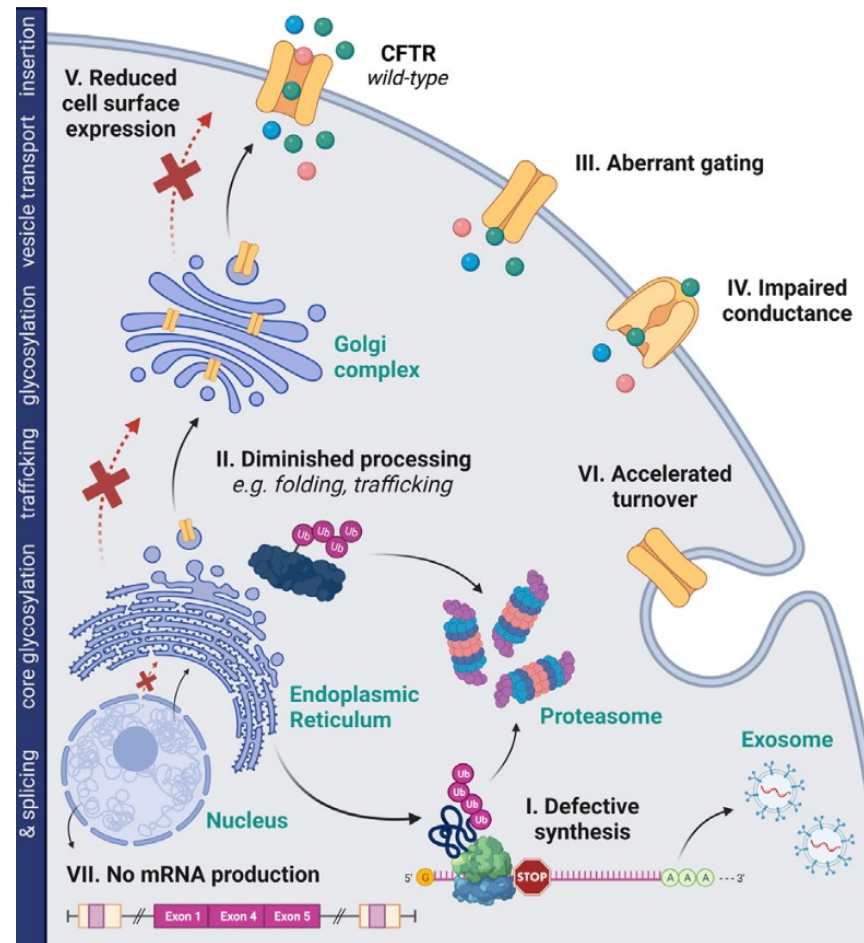


➤ Nei polmoni:
➤ accumulo di muco
➤ conseguenti infezioni

Le varianti di CFTR

Le **mutazioni** sono divise in classi

- Classe I: difetti nella sintesi proteica
- Classe II: influenzano il traffico della proteina
- Classe III: compromettono il *gating* del canale
- Classe IV: diminuzione della conduttanza del canale
- Classe V: riduzione dei livelli di proteina normale
- Classe VI: destabilizzano la proteina
- Classe VII: mancata sintesi di mRNA



- Class I.**
Defective synthesis
G542X, 3120+1G>A
- Class II.**
Diminished processing
F508del, N1303K, A559T
- Class III.**
Aberrant gating
G551D, S549N
- Class IV.**
Impaired conductance
R117H, R334W, D1152H
- Class V.**
Reduced cell surface expression
3849+10kbC>T, A455E
- Class VI.**
Accelerated turnover
120del23
- Class VII.**
No mRNA production
CFTRdela2,3

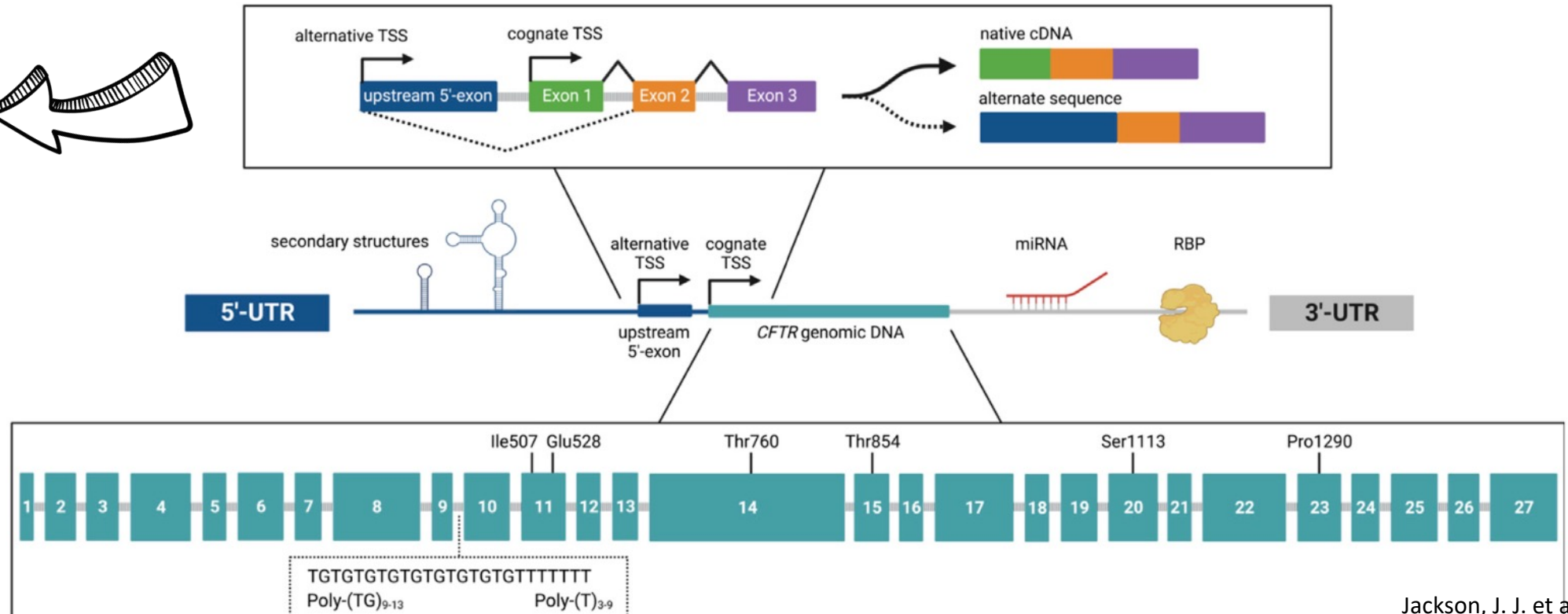
Jackson, J. J. et al.

Frontiers in Genetics, vol. 14 - 2023. doi:10.3389/fgene.2023.1166529

Le caratteristiche dell'mRNA

Nella regione 5' UTR
esoni 5' alternativi:

- portano ad uno splicing diretto verso l'esone 2 saltando l'esone 1
- codificano per una serie di uORF



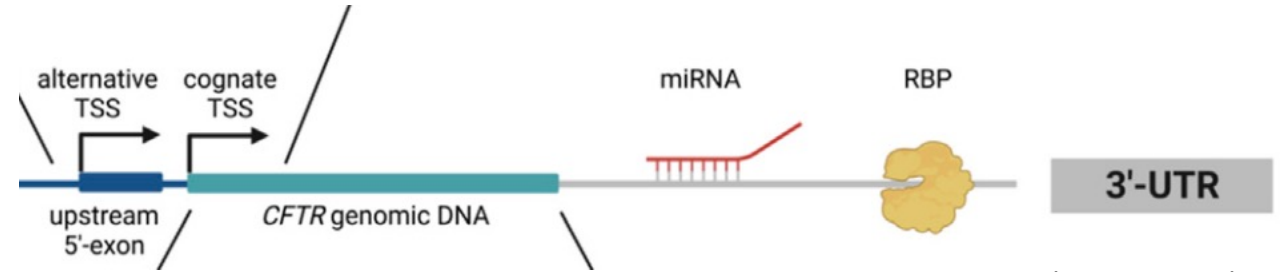
Jackson, J. J. et al.
Frontiers in Genetics, vol. 14 - 2023. doi:10.3389/fgene.2023.1166529

Tratti poli (TG) e poli-T portano ad una maggiore frequenza del salto dell'esone 10

Caratteristiche dell'mRNA e approcci terapeutici

3' UTR: regioni ricche di A e U a cui si legano proteine che stabilizzano l'RNA o ne accelerano la degradazione

Legame dei miRNA → riduzione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale



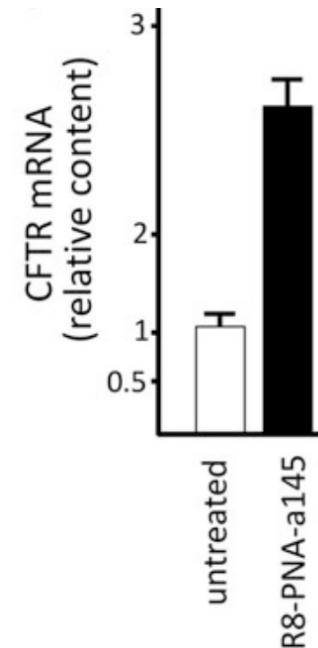
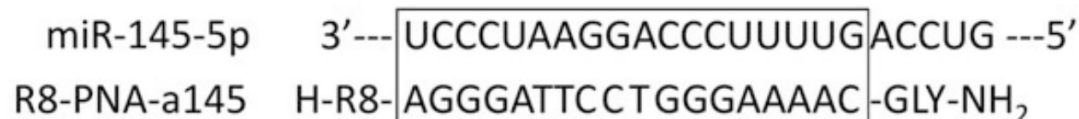
Jackson, J. J. et al.

Frontiers in Genetics, vol. 14 - 2023. doi:10.3389/fgene.2023.1166529

Nuovi approcci terapeutici anti-miRNA

➤ Oligonucleotidi bloccanti i miRNA (**MBBO**):
sequenze di RNA a singolo filamento che mascherano i siti di legame dei miRNA

➤ Acidi nucleici peptidici (**PNA**):
si ibridano con elevata affinità ai miRNA



➔ Il PNA inibisce il miRNA:
aumento dell'espressione del gene

Megiorni, F. et al.

PLoS One 6 (10), e26601. doi:10.1371/journal.pone.0026601

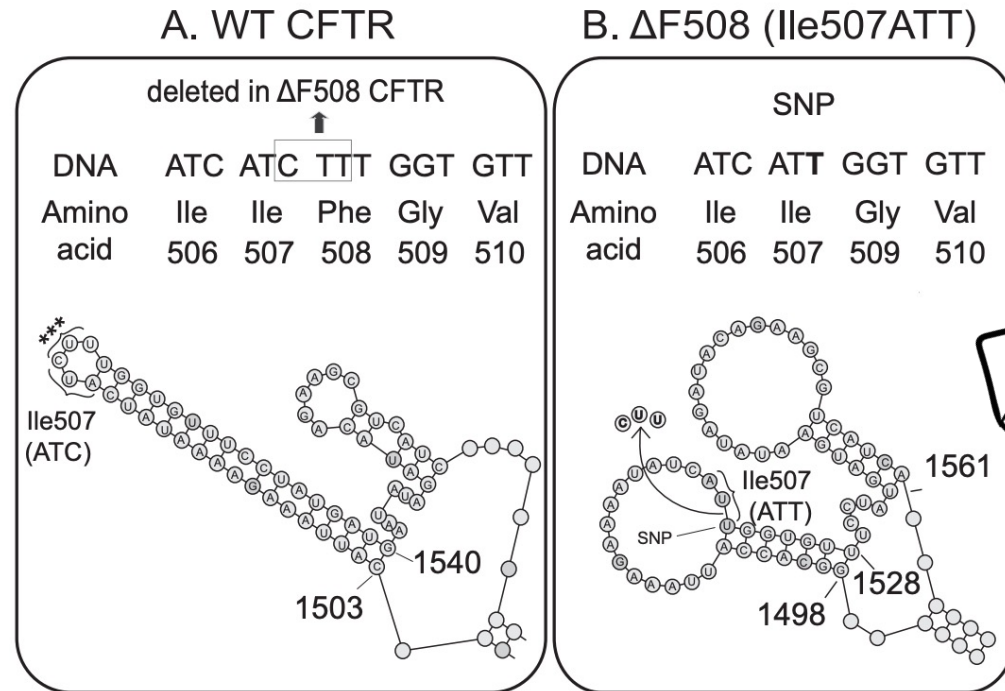
La mutazione *p.Phe508del*

Consiste nella delezione di tre nucleotidi:

- Una C dal codone ATC dell'isoleucina 507
- Due T dal codone TTT della fenilalanina 508



Perdita di Phe-508 e introduzione di un SNP sinonimo (ATT) per Ile-507



Presenza di due loops a singolo filamento allargati

Bartoszewski, R. A.

J. Biol. Chem. 285 (37), 28741–28748. doi:10.1074/jbc.M110.154575

Il «*misfolding*» dell'mRNA causato dalla mutazione ha come conseguenza una diminuzione della velocità di traduzione

Strategie terapeutiche dirette all'mRNA

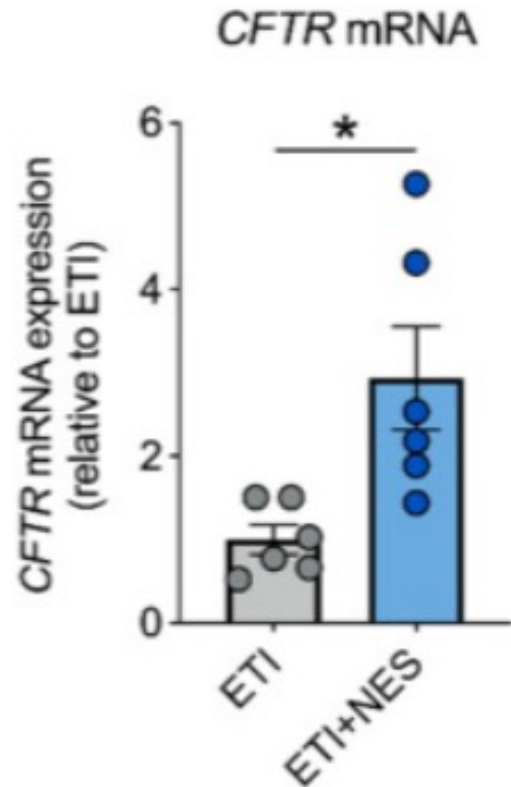
1. amplificatori: molecole in grado di stabilizzare l'mRNA



Nesolicaftor (PTI-428)

Meccanismo d'azione:

- Interagisce con PCBP1
- PCBP1 si lega ad un sito consenso all'interno di un ORF



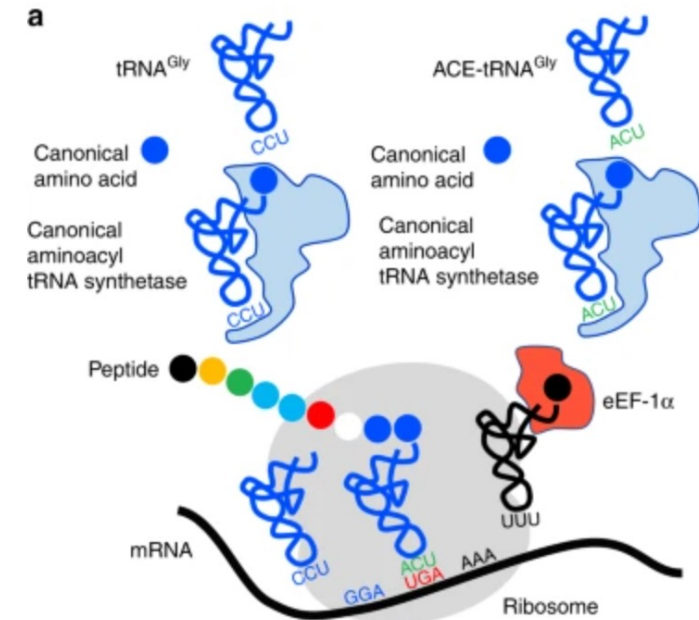
Questo farmaco:

1. aumenta stabilità e traduzione dell'mRNA
2. migliora efficacia dei farmaci già approvati
3. aumenta espressione dell'mRNA anche in presenza della citochina TGF- β 1

Strategie terapeutiche dirette all'mRNA

2. ACE-tRNA: tRNA i cui anticodoni sono stati modificati per riconoscere i codoni di stop

Efficaci nel caso di mutazioni nonsense



Lueck, J. D., Nat. Commun. 10 (1), 822.
doi:10.1038/s41467-019-08329-4

3. oligonucleotidi antisenso (ASO):

brevi sequenze a singolo filamento di DNA o RNA che si legano a sequenze di mRNA complementari alterandole funzionalmente

Meccanismo d'azione ASO:

- Promuovono il salto dell'esone 23 (contenente mutazione nonsense) legandosi ai siti di splicing
- mRNA risultante è resistente alla via NMD

Conclusioni

Importanza dei farmaci diretti all'mRNA:

- potrebbero essere utili per tutti i pazienti indipendentemente dalla mutazione
- efficaci anche nei pazienti che non producono la proteina CFTR
- in grado di aumentare la stabilità e l'espressione dell'mRNA

Principali difficoltà:

- non sono ancora state trovate vie di somministrazione efficaci
- non è ancora chiaro quali siano le cellule bersaglio più rilevanti da correggere
- sono ancora oggetto di studio i sistemi di trasporto per queste molecole

Riassunto esteso

La **fibrosi cistica** è una malattia autosomica recessiva causata dalla mutazione del gene CFTR che codifica per una proteina *ATP-binding-cassette* di classe C. Segue una panoramica sulle **caratteristiche dell'mRNA** di CFTR (regioni 5' UTR e 3' UTR) e sul contributo dei polimorfismi a singolo nucleotide noti per le conseguenze sulla conformazione e sulla funzione della proteina. Sono inoltre illustrati i **nuovi approcci terapeutici** diretti all'mRNA quali: gli oligonucleotidi bloccanti i miRNA, gli acidi nucleici peptidici, gli amplificatori, gli ACE tRNA e gli oligonucleotidi antisense.

Bibliografia



- ❑ Bartoszewski, R. A., Jablonsky, M., Bartoszewska, S., Stevenson, L., Dai, Q., Kappes, J., et al. (2010). A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *J. Biol. Chem.* 285 (37), 28741–28748. doi:10.1074/jbc.M110.154575
- ❑ Bengtson, C., Silswal, N., Baumlin, N., Yoshida, M., Dennis, J., Yerrathota, S., et al. (2022). The CFTR Amplifier Nesolicaftor Rescues TGF- β 1 Inhibition of Modulator-Corrected F508del CFTR Function. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 810956. doi:10.3390/ijms231810956
- ❑ De Boeck, K., and Amaral, M. D. (2016). Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir. Med.* 4 (8), 662–674. doi:10.1016/S2213-2600(16)00023-0
- ❑ Endres, T. M. e Konstan, M. W. (2022). What is cystic fibrosis? *JAMA.* 2022; 327(2):191. doi:10.1001/jama.2021.23280
- ❑ Jackson, J. J., Mao, Y., White Jr., T. R., Foye, C., Oliver, K. E. (2023). Features of CFTR mRNA and implications for therapeutics development. *Frontiers in Genetics*, vol. 14 - 2023. doi:10.3389/fgene.2023.1166529
- ❑ Lueck, J. D., Yoon, J. S., Perales-Puchalt, A., Mackey, A. L., Infield, D. T., Behlke, M. A., et al. (2019). Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nat. Commun.* 10 (1), 822. doi:10.1038/s41467-019-08329-4
- ❑ Megiorni, F., Cialfi, S., Dominici, C., Quattrucci, S., and Pizzuti, A. (2011). Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 6 (10), e26601. doi:10.1371/journal.pone.0026601