



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

Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE

PIU' CHE UN MESSAGGERO: LO SPLICING ALTERNATIVO COME  
BERSAGLIO TERAPEUTICO

MORE THAN A MESSENGER: ALTERNATIVE SPLICING AS A THERAPEUTIC  
TARGET

Tesi di Laurea di: Elena Catalani

Elena Catalani

Docente Referente  
Chiar.mo Prof. Anna La Teana

Anna La Teana

Sessione estiva 2020

Anno Accademico 2019/2020



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

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE**

**PIÙ CHE UN MESSAGGERO: LO SPLICING ALTERNATIVO COME  
BERSAGLIO TERAPEUTICO**

Docente referente:  
Dott.ssa Anna La Teana

Tesi di laurea di:  
Elena Catalani

Anno Accademico 2019-2020

# INTRODUZIONE

Lo **splicing costitutivo** consiste in:

- rimozione degli introni (le sequenze non codificanti)
- attacco degli esoni adiacenti (ossia delle sequenze codificanti)

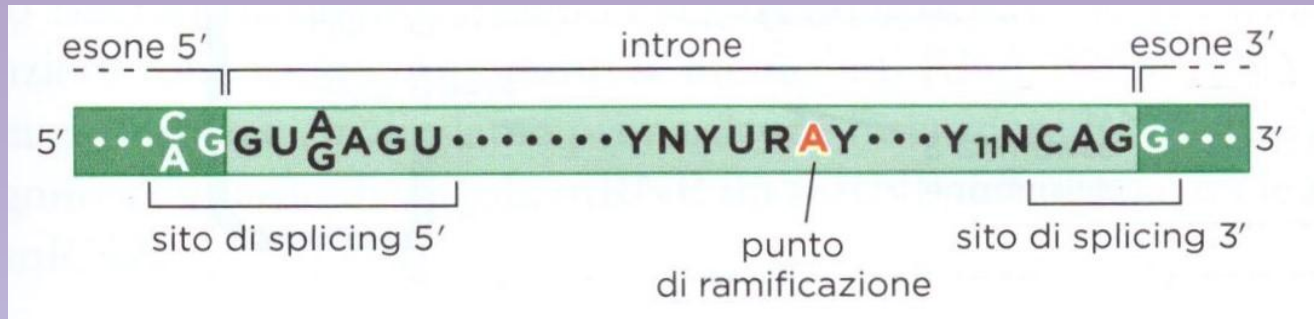
Lo **splicing costitutivo** interviene in ogni legame introne-esone con due reazioni consecutive di transesterificazione mediate dallo **spliceosoma**.

Lo **spliceosoma** è un complesso molecolare ribonucleoproteico formato da cinque piccole ribonucleoproteine nucleari o (snRNP).

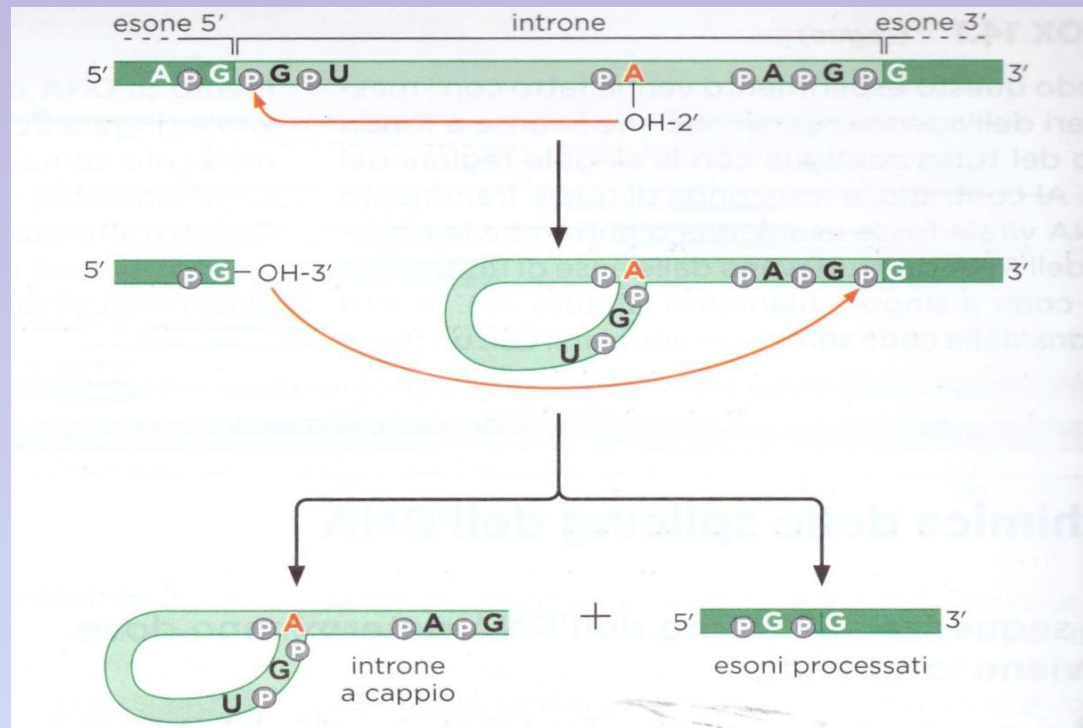
Le sequenze specifiche interne all'introne a cui si legano i componenti dello spliceosoma sono tre:

- **GU al sito di splicing 5'**
- **AG al sito di splicing 3'**
- **A al punto di ramificazione**

# Le tre sequenze di riconoscimento per lo splicing



## Le due reazioni di transesterificazione che portano alla rimozione dell'introne

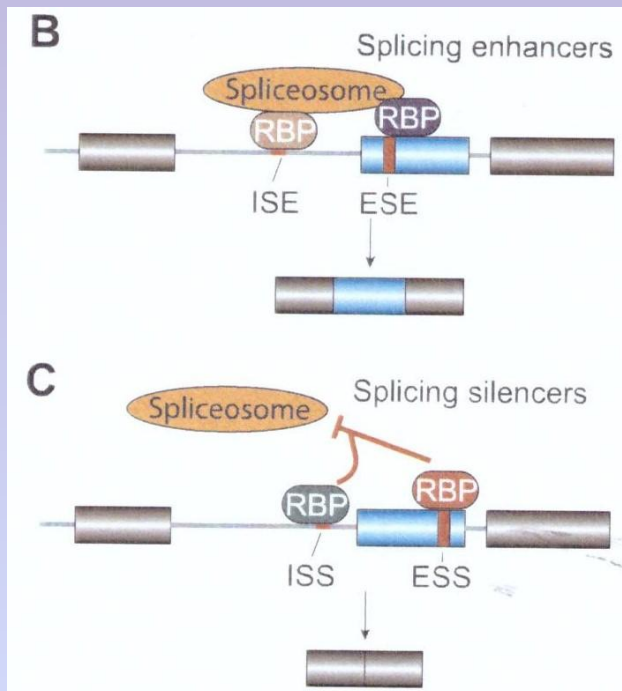


# MECCANISMO DI SPLICING ALTERNATIVO

Lo **splicing alternativo** differisce da quello **costitutivo** per quanto riguarda i siti di legame dello **spliceosoma**. Infatti questo complesso molecolare non interviene in tutti i legami introne-esone ma solamente in alcuni specifici.

La selezione degli esoni che devono essere attaccati si basa su:

- la presenza e il successivo riconoscimento da parte delle **RBP** di sequenze specifiche chiamate **enhancer** o **silenziatori esonici (ESE e ESS)** e delle rispettive sequenze all'interno di un introne (**ISE e ISS**)
- la presenza di **modifiche nella struttura dell'RNA**, come quelle di tipo **epigenetico**



**B:** legame di RBP con la sequenza ESE e inclusione dell'esone azzurro

**C:** legame di RBP alla sequenza ESS e salto dell'esone azzurro

# LO STUDIO DELLO SPLICING ALTERNATIVO CON FINI TERAPEUTICI

Questa tesi ha l'obiettivo di descrivere gli approcci attualmente eseguiti per correggere le irregolarità nel processo di splicing che sono associate con l'insorgenza di malattie specifiche.

In ordine di trattazione verranno descritti gli studi che si avvalgono dell'utilizzo di:

- **un gruppo di molecole che si legano direttamente all'mRNA** per indirizzare lo splicing alternativo
- **molecole che hanno come bersaglio componenti dello spliceosoma** (in particolare nella **terapia contro il cancro**)
- **piccole molecole che correggono l'attività inappropriata di chinasi** che a loro volta regolano le reazioni di splicing alternativo
- **approcci terapeutici precedentemente descritti combinati con altri metodi di regolazione dello splicing**, in particolare quelli riguardanti **l'epigenetica**

## **STUDI CON GRUPPI DI MOLECOLE CHE SI LEGANO DIRETTAMENTE ALL'mRNA**

Questi approcci terapeutici si avvalgono dell'utilizzo o di oligonucleotidi antisenso (gli ASO) oppure di piccole molecole. Verrà approfondito l'utilizzo degli **ASO**.

Gli **ASO** sono:

- brevi **molecole a singolo filamento** sintetizzate artificialmente
- **complementari ad una specifica sequenza di mRNA** con la quale si appaiano

Possono essere utilizzati per regolare un processo di splicing alternativo anomalo grazie al loro legame con sequenze enhancers o silencers specifiche. Questa classe di ASO è conosciuta come gli **oligonucleotidi splice-switching (SSO)**.

## TERAPIA CON ASO IN PAZIENTI AFFETTI DA SMA

La causa di questa malattia deriva da una **significativa riduzione** dell'espressione della proteina di sopravvivenza dei motoneuroni (SMN). Nell'uomo due geni praticamente omologhi, l'SMN1 e l'SMN2, codificano per una proteina SMN identica.

Le **persone affette da SMA** subiscono:

- la **perdita del gene omozigote SMN1**
- la **mutazione di una citosina in timina in posizione +6 (C6T) all'interno dell'esone 7 nel gene SMN2**

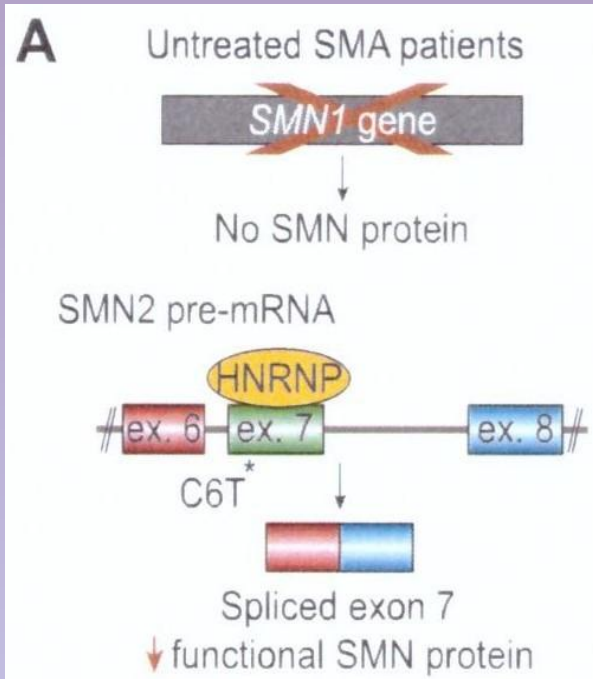


formazione di una nuova sequenza **ESS** a cui si lega **HNRNPA1** (repressore di splicing)

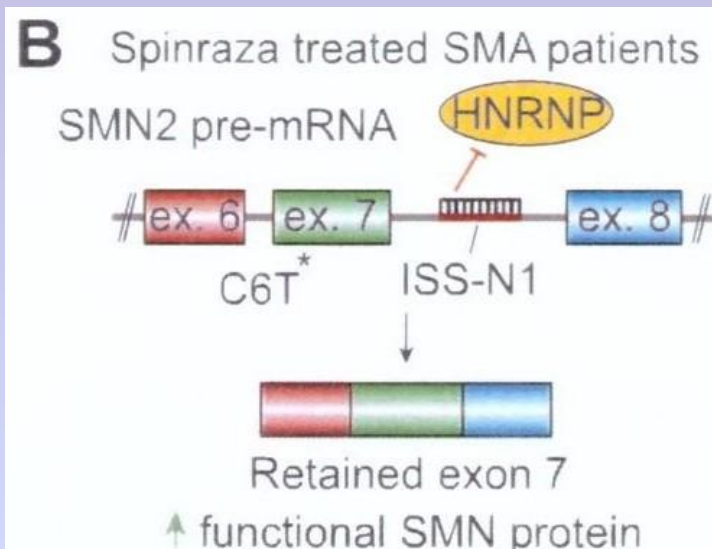


**salto dell'esone 7 e proteina SMN più corta e non completamente funzionale**





**A:** pazienti affetti da SMA non trattati



**B:** pazienti affetti da SMA trattati con Spinraza

L'approccio terapeutico che ha portato a risultati più significativi consiste nell'utilizzo dell'**SSO Spinraza** che è complementare ad una sequenza specifica:  
**SSO Spinraza** si lega alla sequenza complementare **ISS-N1** nell'introne 7 del gene SMN2



# APPROCCI TERAPEUTICI CHE UTILIZZANO MOLECOLE CHE HANNO COME BERSAGLIO COMPONENTI DELLO SPLICEOSOMA

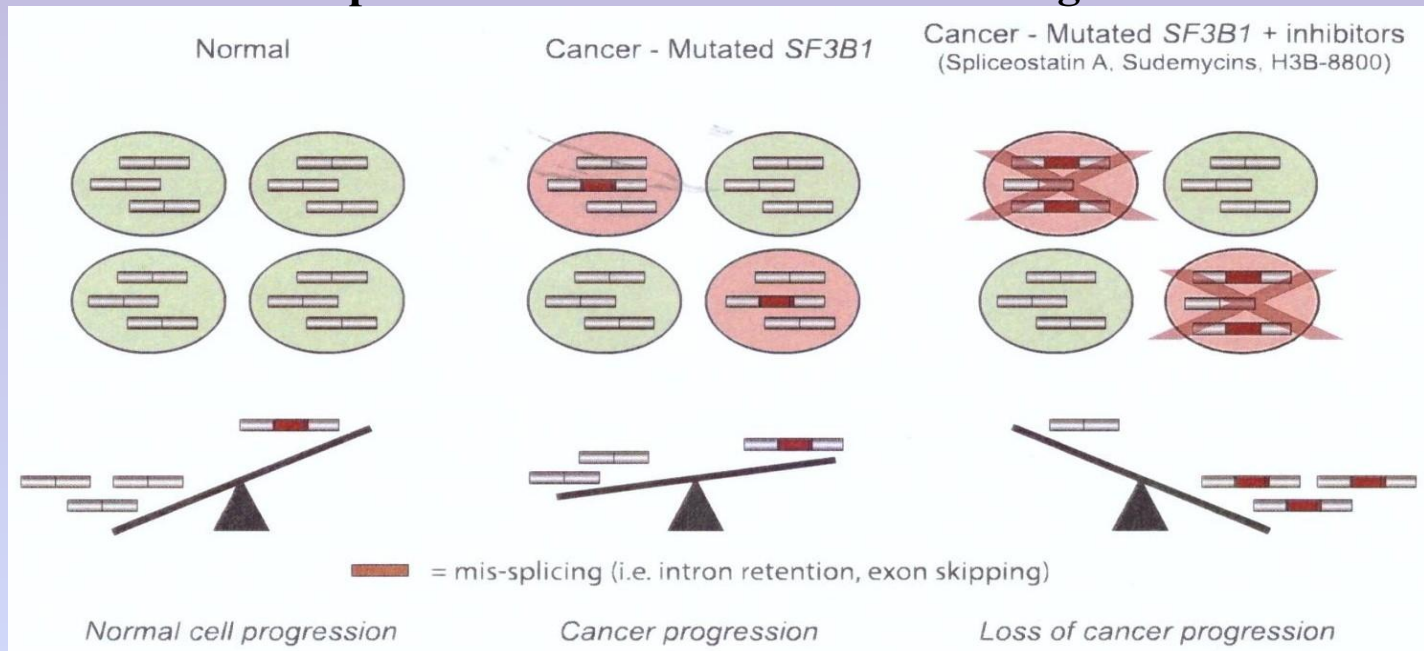
Una delle mutazioni più frequenti che porta ad uno splicing alternativo anomalo e determina l'insorgenza di alcune forme di cancro avviene nel gene **SF3B1**.

Le principali molecole inibitrici di **SF3B1** individuate sono:

la **spliceostatina A** e le **sudemicine**



Inducono l'**arresto del ciclo cellulare** e in questo modo **bloccano la proliferazione delle cellule cancerogene**



## APPROCCI TERAPEUTICI CHE UTILIZZANO MOLECOLE IN GRADO DI CORREGGERE L'ATTIVITÀ ANOMALA DI CHINASI E FOSFATASI

Il processo di fosforilazione delle proteine **RBP** da parte di alcune chinasi e fosfatasi è di fondamentale importanza per il corretto funzionamento delle **RBP** stesse. Gli approcci terapeutici più promettenti nel correggere l'attività anomala di chinasi e fosfatasi si avvalgono dell'utilizzo di molecole che funzionano da inibitori, quali per esempio:

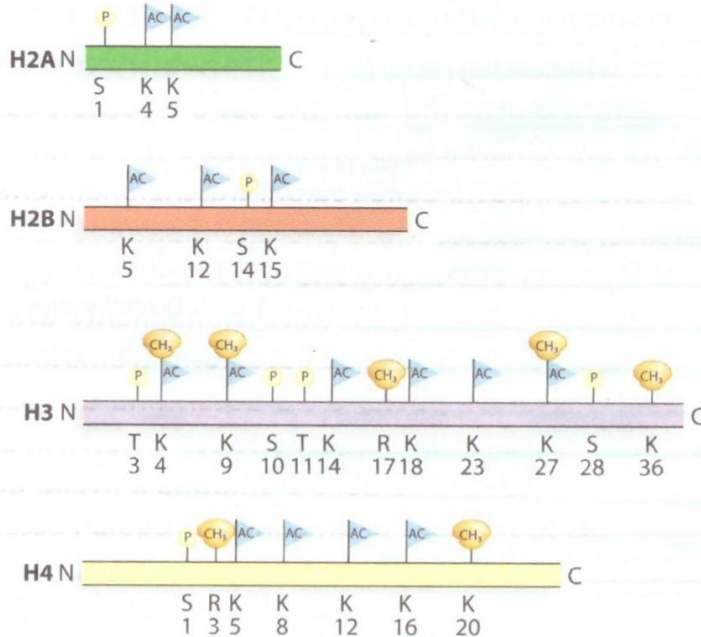
- **isocotinamide** o **SRPIN340** che agiscono da inibitori della famiglia di chinasi SRPK

## APPROCCI TERAPEUTICI CHE SFRUTTANO L'EFFETTO COMBINATO DI PIÙ METODI CHE AGISCONO CONTEMPORANEAMENTE

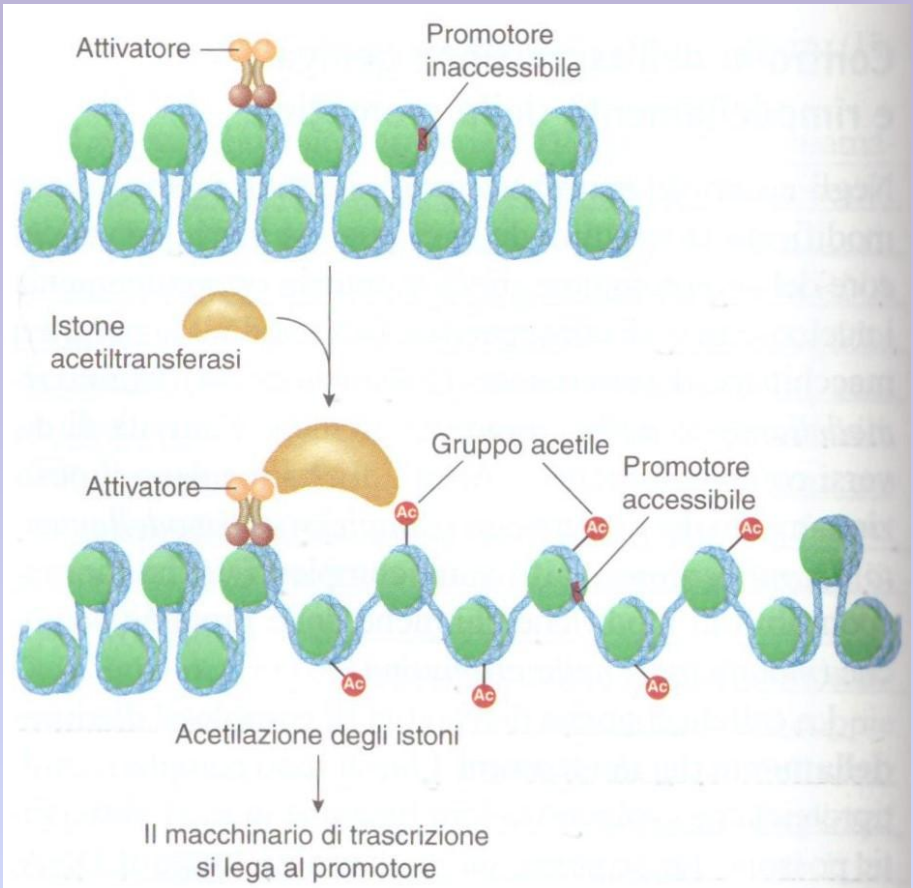
Questo tipo di approccio terapeutico sfrutta l'effetto combinato dei metodi visti in precedenza con, in particolare, il contributo dell'epigenetica nella regolazione dello splicing alternativo.



Le **modifiche epigenetiche** sono quelle **modifiche della struttura chimica degli istoni** che si manifestano unicamente nel rimodellamento dello stato della cromatina **senza andare a modificare le sequenze del DNA**. Tali modifiche sono dovute all'azione di molecole specifiche: i **modificatori della cromatina**.



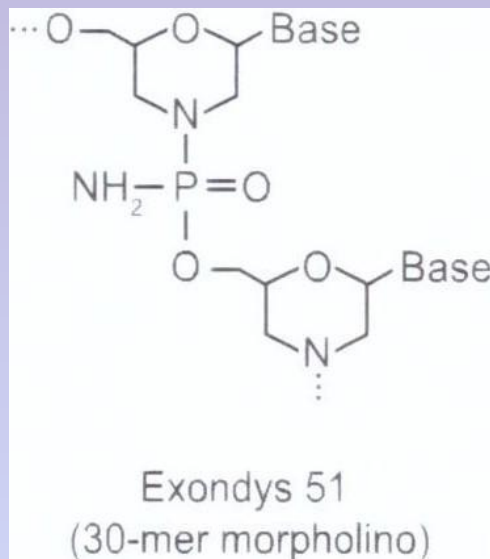
**Residui aminoacidici bersaglio di modifiche chimiche.** Sono indicati per ciascun istone gli aminoacidi che possono essere bersaglio di specifiche modifiche chimiche. La lisina (K) nelle posizioni 4, 9 e 27 dell'istone H3 può essere bersaglio di acetilazione o metilazione in maniera competitiva.



# CONCLUSIONI

Alla fine di questa analisi si può affermare che lo **splicing alternativo è il risultato di più meccanismi che cooperano insieme.**

Lo sviluppo di nuove tecnologie, unito allo studio dei processi di regolazione dello splicing alternativo e ad una maggior consapevolezza delle strutture secondarie e terziarie dell' RNA, fa sperare nell'identificazione di nuove molecole in grado di legarsi direttamente all'RNA con il fine di "riparare" un processo di splicing alternativo anomalo.



Struttura chimica di Exondys 51,  
molecola approvata dalla FDA per la cura  
di DMD

# ABSTRACT

Lo splicing alternativo del pre-mRNA è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica, che avviene durante il processo di trascrizione o dopo di questo, attraverso il quale vengono sintetizzati diversi trascritti maturi di mRNA da un unico gene. Le mutazioni genetiche che influenzano lo splicing sono causa di numerose malattie, tuttavia la conoscenza sempre più approfondita della regolazione del processo di splicing ha permesso lo sviluppo di approcci terapeutici che correggono eventuali anomalie indotte da tali mutazioni genetiche. In questo articolo dapprima sono stati presi in considerazione alcuni studi che si avvalgono degli ASO e di altre piccole molecole che si legano direttamente all'RNA, poi sono stati analizzati alcuni approcci terapeutici che hanno come bersaglio componenti dello spliceosoma e infine si è parlato dell'azione di molecole che legano le chinasi e dell'effetto combinato degli approcci precedentemente descritti con altri meccanismi di regolazione come quelli epigenetici. I progressi fatti in questo campo comunque fanno ben sperare nello sviluppo di tecniche nuove e sempre più efficaci.



# BIBLIOGRAFIA

## TESTO

- *“More than a messenger: alternative splicing as a therapeutic target”*, an article that is part of a Special Issue entitled: “RNA structure and splicing regulation” edited by Francisco Baralle, Ravindra Singh and Stefan Stamm.

Authors of the article: Adam J. Black, Jennifer R. Gamarra and Jimena Giudice, the first two of the Department of Cell Biology and Physiology, School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, USA and the third of McAllister Heart Institute, School of Medicine University of North Carolina at Chapel Hill, USA .

- “Biologia molecolare del gene” di James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine e Richard Losick, settimana edizione, casa editrice Zanichelli

## IMMAGINI

- *“More than a messenger: alternative splicing as a therapeutic target”*
- “Biologia molecolare del gene” di James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine e Richard Losick, settimana edizione, casa editrice Zanichelli per immagini della diapositiva numero 4
- “Genetica, un approccio molecolare” di Peter J. Russel, quarta edizione, casa editrice Pearson per immagini diapositiva numero 11