

**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DISVA-DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**  
**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE BIOLOGICHE**



**UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE**

**Tesi di laurea**

**Splicing degli RNA e patologie: dai modelli animali alle terapie**

**Laureanda**  
**Chiara Emanuela Saccani**

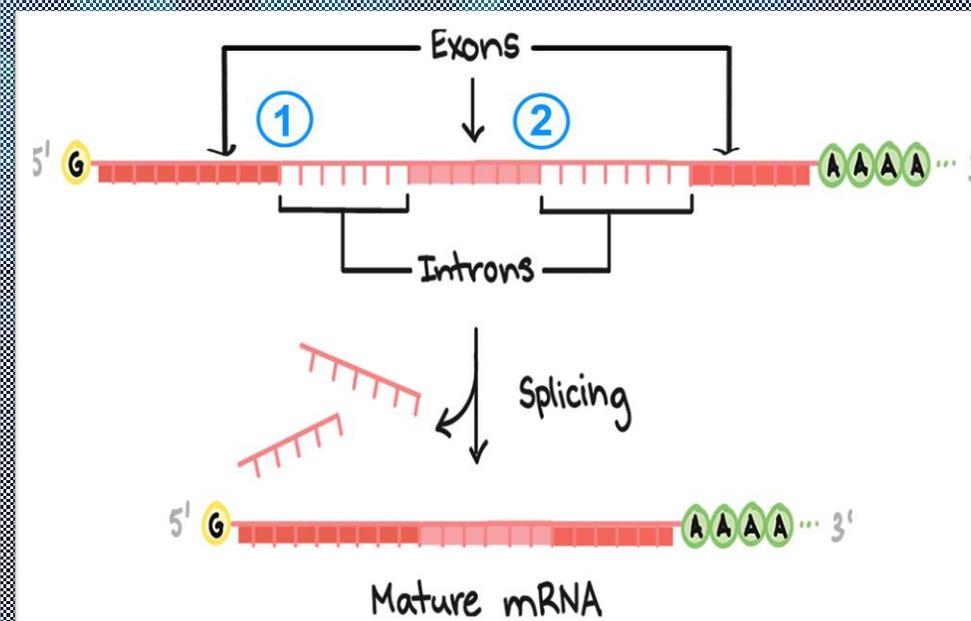
**Relatore**  
**Dott.ssa Anna La Teana**

**Anno Accademico 2019/2020**

# CODICE GENETICO

nt → aa

- 1) REPLICAZIONE
- 2) TRASCRIZIONE (DNA → mRNA)
- 3) TRADUZIONE (mRNA → amminoacidi)



# SPLICING SPLICING ALTERNATIVO



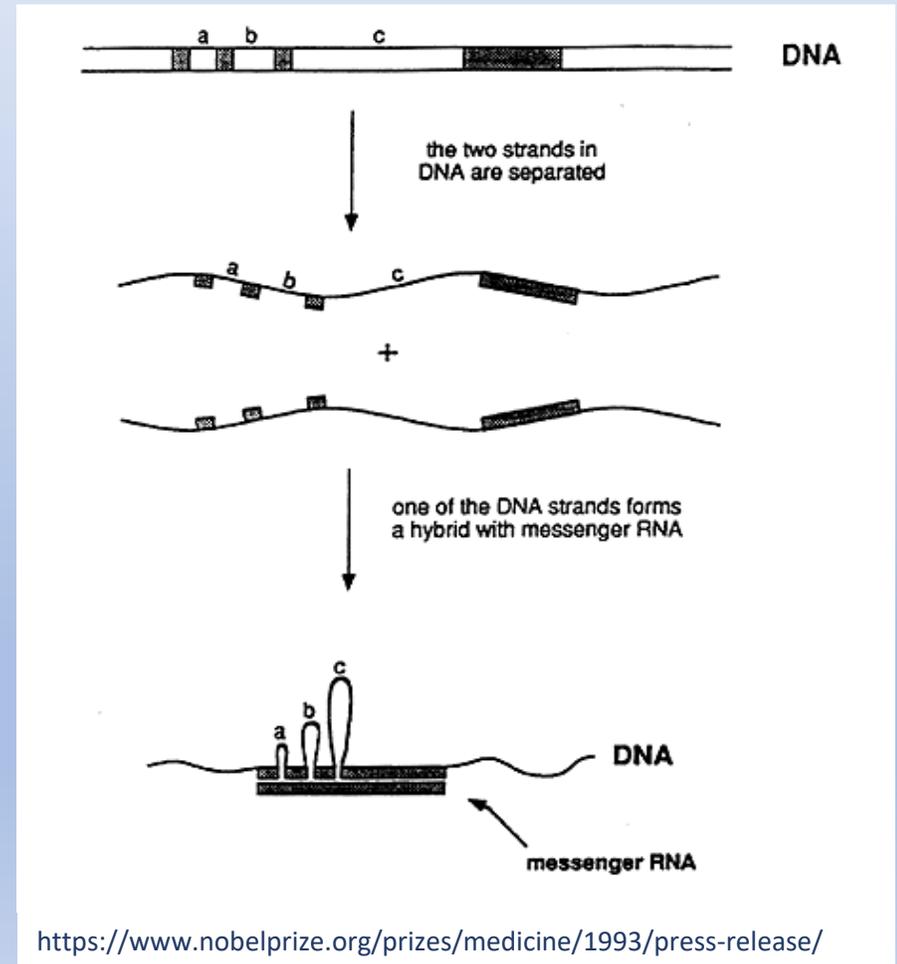
DIVERSITA'  
PROTEICA



Richard J. Roberts & Phillip A. Sharp, Nobel per  
la Fisiologia e la Medicina, 1993

## STUDI SULL'mRNA DI ADENOVIRUS

- 1) Confronto tra gli mRNA nel nucleo con gli stessi mRNA trasportati poi all'esterno dell'involucro nucleare;
- 2) Denaturazione del DNA per ottenere i filamenti singoli;
- 3) Ibridazione dell'mRNA con la sequenza complementare di DNA: formazione di ANSE;
- 4) VARIAZIONE DELL'INFORMAZIONE DEL DNA RISPETTO ALL'INFORMAZIONE DELL'mRNA;



# ARGOMENTI PRINCIPALI

→CONCETTO DI SPLICING

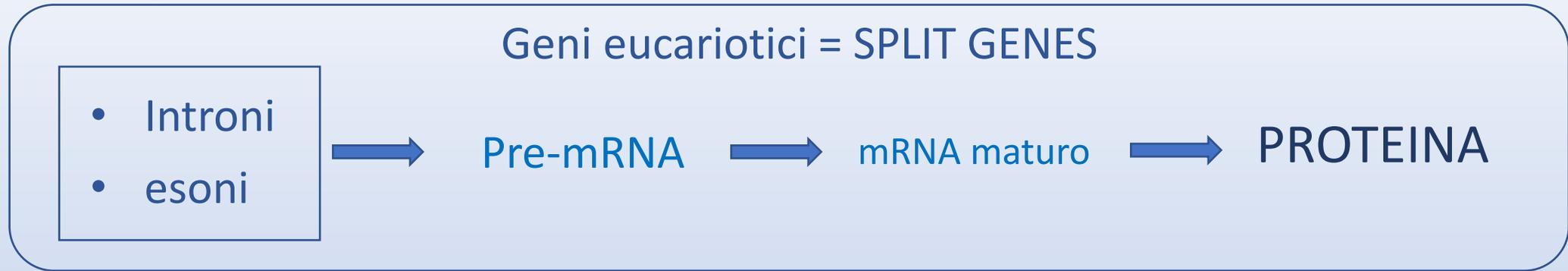
→MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLO SPLICING

→PANORAMICA SULLE MUTAZIONI LEGATE ALLO SPLICING COINVOLTE  
IN PATOLOGIE GRAVI

→ELABORAZIONE DEI MODELLI ANIMALI E TRATTAMENTI UTILIZZATI

→TECNOLOGIE INNOVATIVE UTILI ALLA RICERCA

# 1) ABERRAZIONE DELLO SPLICING NELLA MALATTIA



Lo splicing è un fenomeno complesso e finemente regolato che permette la produzione dell'mRNA maturo:

- Regolazione a livello dei SITI DI SPLICING e SEQUENZE ASSOCIATE
- Regolazione attraverso FATTORI ESTERNI DI RICONOSCIMENTO (potrebbero richiedere l'intervento di COFATTORI)

MUTAZIONI DEL DNA = ATTIVAZIONE DI SITI ENHANCER DI SPLICING O PRODUZIONE DI PROTEINA INATTIVA O ESTRANEA

UOMO: 95% dei geni soggetti a SPLICING ALTERNATIVO -> ogni gene codifica per un pattern proteico

**CONOSCERE IL MECCANISMO in un MODELLO ANIMALE significa poter studiare l'EZIOLOGIA ed elaborare un TRATTAMENTO**

## 2) REGOLAZIONE DELLO SPLICING

SITI DI SPLICING ALTERNATIVI vengono scelti attraverso FATTORI IN CIS o attraverso l'intervento di FATTORI IN TRANS

TRANS FACTOR: complessi multiproteici

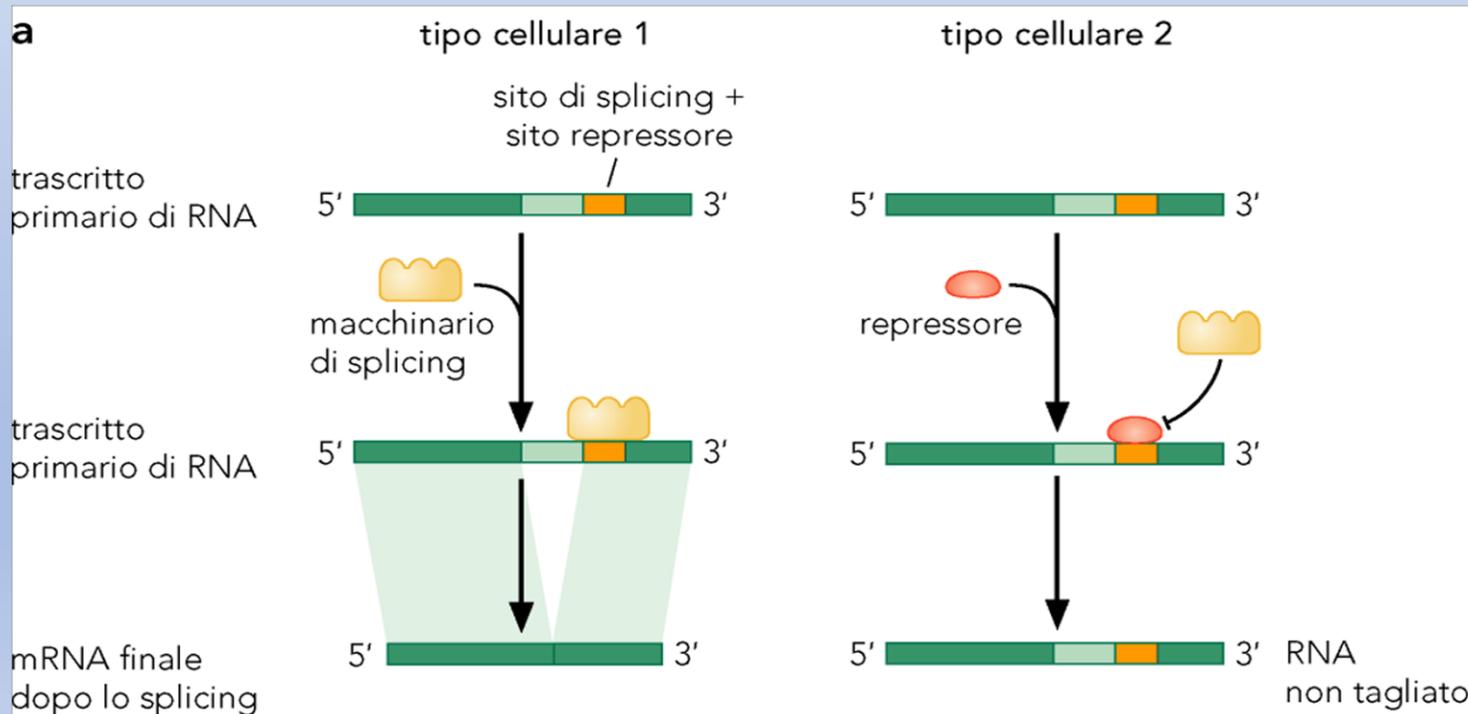
-**ATTIVATORI** richiamano il COMPLESSO SPLICEOSOMIALE

-**REPRESSORI** rendono le sequenze di splicing inaccessibili causandone un cambio conformazionale



- SR PROTEINS (ricche in Ser/Arg)
- hnRNPs (heterogeneous ribonucleoproteins)

Alcune tessuto specifiche, ma in linea di massima esse collaborano durante gli eventi di splicing



80.000 MUTAZIONI CATALOGATE NEL GENOMA UMANO



Circa il 10% sono dovute a SPLICING ERRATO

### 3) ANIMALI DA LABORATORIO UTILIZZATI COME MODELLI E STUDIO DEI DIFETTI DI SPLICING

Gli animali utilizzati devono presentare un corredo genetico comparabile con quello umano:

- *Drosophila melanogaster*
- *Danio rerio* (Zebrafish)
- Mammiferi quali topi e cani



CELLULE EMBRIONALI DI TOPO perlopiù e tecniche di RICOMBINAZIONE OMOLOGA

Animali che presentano naturalmente delle mutazioni utili agli studi:

- Topo mdx = studi sulla Distrofia Muscolare di Duchenne; isolato da una linea cellulare con mutazione nonsense dell'esone 23 nel gene per la distrofina. Produzione di una proteina tronca o nociva. Poiché in questo topo è stato constatato che non vi sono difetti di splicing, fornisce un utile background per indurre lo splicing diretto verso l'esone 23 che causa la distrofia.
- Cani DMD = utilizzate diverse razze canine che mostrano fenotipo simile a quello della malattia di Duchenne; Golden Retriever affetti da questa malattia presentano un valido modello di studio: possiedono una mutazione di A>G (GRDMD) a livello dell'introne 6, quando viene trascritto causa l'esclusione dell'esone 7 del gene DMD. Produzione di una proteina errata. Questo modello ed altri, vengono utilizzati nelle terapie con SSO\*.

\*SSOs = SPLICE SWITCHING OLIGONUCLEOTIDES, piccoli filamenti di RNA complementari con le sequenze in cis di regolazione dello splicing (cis-SRE)

# 4) CONTROLLO DELLO SPLICING PER I BENEFICI TERAPEUTICI

10.000 mRNA prodotti che funzionano in maniera differente in base alla cellula o al tessuto in cui si trovano

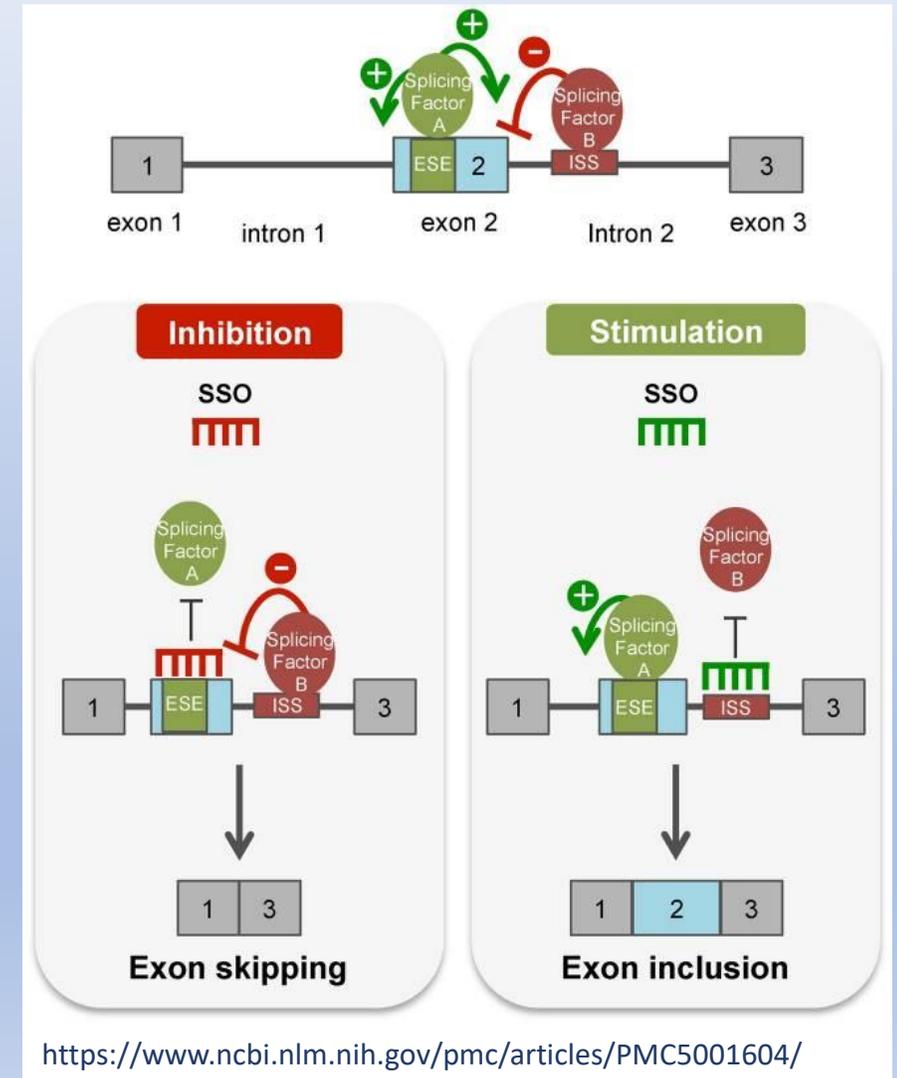
Come capire la specificità dei SITI DI TARGET dello splicing?

## 1) TRATTAMENTO CON SSO (Splice Switching Oligonucleotides)

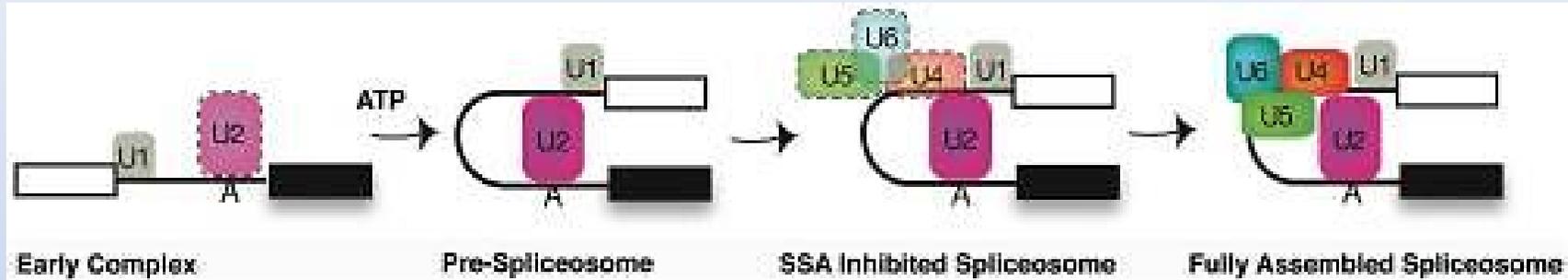


- SSOs interagiscono con i SITI DI SPLICING e gli ENHANCER
- INIBIZIONE = PROTEINA TRONCA
- SSOs interagiscono con i SITI DI SILENCING = PROTEINA COMPLETA

**ISS:** intronic splicing silencer  
**ESE:** esonic splicing enhancer



## 2) TRATTAMENTO CON SPLICEOSTATINA E PLADIENOLIDE: composti intermedi che reagiscono con il core enzimatico del COMPLESSO SPLICEOSOMIALE



La SPLICEOSTATINA (A) interagisce direttamente con la proteina SF3B dell'U2 snRNP (spliceosoma)

Queste molecole non sono specifiche → utili nelle cellule metabolicamente attive o nei pazienti affetti da IMMUNODEFICIENZA (AIDS)

A tal proposito:



**Inibizione della produzione delle proteine virali, anche di quelle resistenti alle PROTEASI e alla RETROTRASCRIPTASI**

# 5) MUTAZIONE DEL CORE SPLICEOSOMIALE COME CAUSA DELLA MALATTIA

SINDROME MIELOIDOPLASTICA (MDS) e LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (AML)

le cellule staminali ematopoietiche non compiono ematopoiesi

Geni coinvolti:

- SRSF2
- U2AF
- **SF3B1**



**Modello murino con mutazione K700E (A>G) del gene SF3B1, esone 15**

*Proteina SF3B1* aumenta affinità dell'U2 snRNP per il pre-mRNA: geni alternativamente spliced con comparsa di ANEMIA MACROCITICA e MIELOIDOPLASIA.

Nell'uomo sono stati identificati dei geni che rientrano nel sottogruppo dei geni sottoposti allo splicing alternativo anomalo nel topo K700E

**E' FONDAMENTALE PRODURRE MODELLI ANIMALI QUANTO PIU' FENOTIPICAMENTE SIMILI AI PAZIENTI AFFETTI DALLA PATOLOGIA OGGETTO DI RICERCA**

# 6) SEPARAZIONE DI FASE E SPLICING ALTERNATIVO NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

CELLULE EUCARIOTICHE = *STRUTTURE BIOLOGICHE COMPARTIMENTALIZZATE*



Due modelli murini:

1) Topo mutante Q331K TDP-43

→ Perdita di funzione splicing di Kcnp2 e Atp2b1 =  
invecchiamento dei motoneuroni

2) Topo mutante per Tardbp: conversione 110-Gln (CAA; CAG) in codone di stop (UAA; UGA; UAG) → proteina tronca

**→ DIFETTI DI SPLICING NELLA SLA ←**

# TAUOPATIE = MALATTIA DI ALZHEIMER (AD) e MALATTIA DI PICK



Topo transgenico hTau con background neutro

Esclusione dell'esone 10  $\longrightarrow$  produzione massiccia di 3R-Tau

## TRATTAMENTI:

- 1) INFEZIONE CON LENTIVIRUS con PTM (RNA pre-trans splicing) con segnali di splicing in 3' e 5' = ESCLUSIONE ESONE 10 nelle cellule nervose
- 2) SSOs con segnali regolatori dell'esone 12 di MAPT = aumento dell'inclusione dell'esone 10

Terapia contraria causa convulsioni nelle cavie quindi **TITOLAZIONE DEI PRODOTTI DI SPLICING FONDAMENTALE**

# 7) NUOVE TECNOLOGIE PER IL CONTROLLO DELLO SPLICING: TARGETING GENOMICO CON LA TECNICA CRISPR-Cas9

## CRISPR-Cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-Cas9)

*Streptococcus pyogenes*

Utilizzo:

- Knock-out genetici;
- Tag di proteine endogene;
- Induzione di malattie;
- Correzione di geni tossici *in vitro* e *in vivo* nei modelli animali;

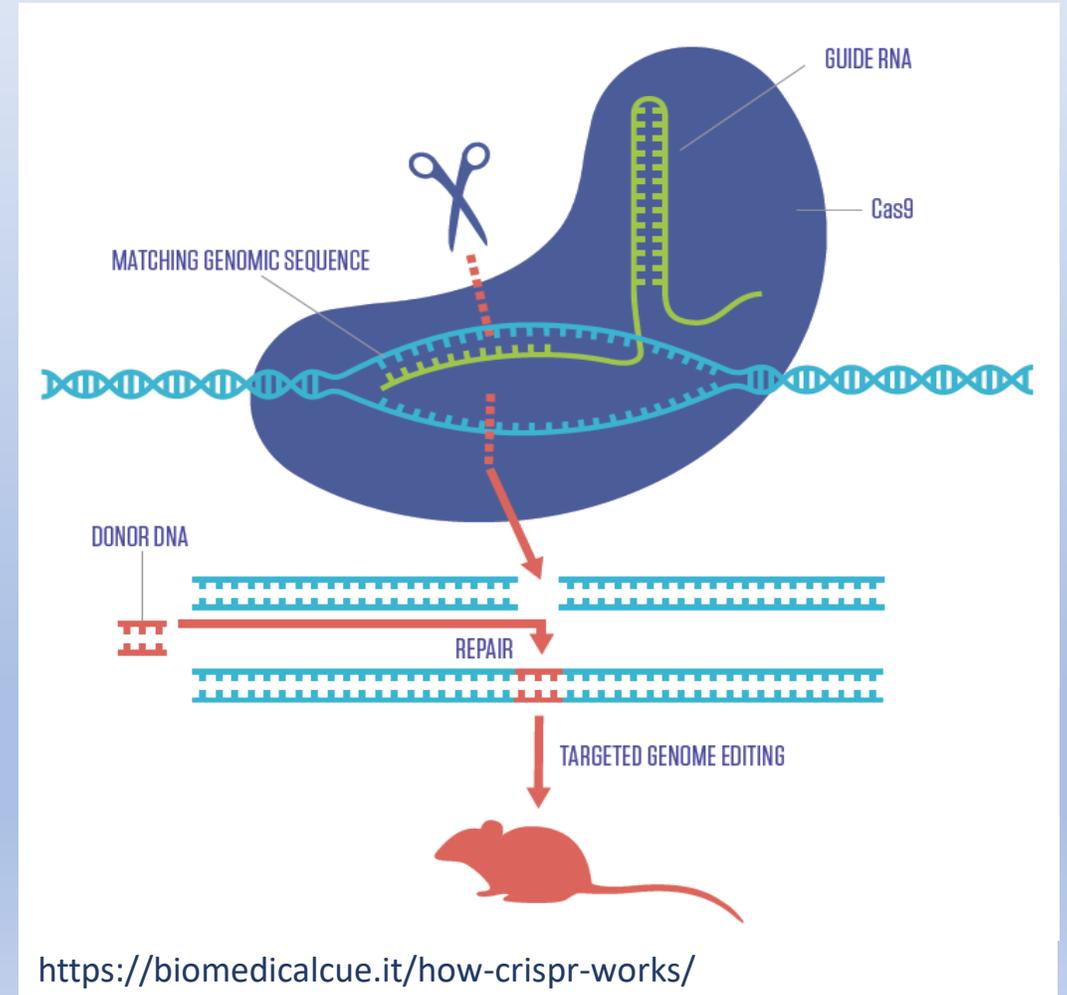
### TIROSINEMIA EREDITARIA DI TIPO I

Mutazione omozigote puntiforme G>A ed esclusione dell'esone 8 =  
proteina FAH tronca

- 1) Mutazione individuata nell'uomo ed inserita nel topo;
- 2) Mutazione corretta, ripristino proteina FAH e BMI nella cavia normale

POSSIBILITA' DI INSERIRE MUTAZIONI EX-NOVO PER  
CORREGGERNE ALTRE

Emmanuelle Charpentier e Jennifer A. Doudna, Nobel per  
la Chimica 2020



MALATTIA	MODELLO	TRATTAMENTO	RISULTATO
Sindrome di Alzheimer e Tauopatie	Topo N296H mutante per isoforma Tau	PTM, SMaRT	Inclusione maggiore dell'introne 10 del gene <i>Mapt</i> nelle cellule nervose <i>in vivo</i>
Sclerosi Laterale Amiotrofica	Topo con mutazione Q331K del gene <i>TDP-43</i> espressa	SSOs	Esclusione dell'esone 7 di <i>FUS in vitro</i>
Distrofia Muscolare di Duchenne	Modelli multipli: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Topi mdx</li> <li>- Cani DMD (mutazione A&gt;G dell'esone 6 del gene canino DMD)</li> </ul>	SSOs, SMaRT, CRISPR-Cas9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trasfezione con vettore avente esone 23 e introne 22 del gene DMD che inducono espressione della proteina WT <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>;</li> <li>- Trattamento con SSOs induce l'esclusione dell'esone 51 ripristinando la produzione dell'mRNA <i>in-frame</i>;</li> </ul>
Tirosinemia Ereditaria di tipo I	Topo con mutazione G>A nell'esone 8 del gene <i>FAH</i>	CRISPR-Cas9	Trattamento con CRISPR-Cas9 induce l'inclusione dell'esone 8 di <i>FAH in vivo</i> e ripristino della proteina integra <i>FAH</i>

# CONCLUSIONI E NUOVE PROSPETTIVE

- NUMEROSI POSSIBILI SCENARI

- SVILUPPO DELLE TECNICHE
- MODELLI ANIMALI SEMPRE PIU' EVOLUTI ED ATTENDIBILI

SF che agiscono da oncogeni o da oncosoppressori:  
NUOVI SCENARI PER GLI STUDI DI ONCOGENESI

Metilazione dell'adenina nel DNA coinvolta nella regolazione dello splicing in particolari condizioni di stress cellulari

Ruolo dei *long non coding RNAs* (sisRNA/snoRNA) nello splicing e nella risposta cellulare alla malattia

*Grazie per l'attenzione.*