

Espressione alterata di ncRNA

L'espressione dei ncRNA è particolarmente alterata nelle patologie umane, e spesso l'alterata espressione di ncRNA sono all'origine di patologie umane. Alterazioni genetiche ed epigenetiche sono spesso responsabili nella deregolazione dell'espressione di ncRNA.

miRNA

In relazione alle patologie oncologiche i miRNA possono essere classificati in due categorie: miRNA oncogenici e miRNA oncosoppressori.

miRNA oncogenici

I miRNA oncogenici hanno come bersaglio gli mRNA dei geni oncosoppressori, reprimono quindi la traduzione di geni oncosoppressori.

miRNA oncosoppressori

I miRNA oncosoppressori hanno come bersaglio gli mRNA che codificano per proteine oncogeniche.

In certi casi di miRNA possono far parte di entrambe le classi, a seconda del contesto di espressione cellulare. Questi profili di espressione alterati sono causati da molteplici meccanismi, quali ad esempio modifiche epigenetiche come la metilazione del DNA. La metilazione è responsabile del silenziamento dell'attività di promotori che controllano l'espressione di miRNA. Anche amplificazione e delezione genomica sono responsabili della over o down espressione dei miRNA.

Diversi tumori sono stati associati ad un profilo di espressione aberrante dei miRNA, ciascuno associato ad aspetti diversi del tumore.

Anche l'espressione di altri piccoli RNA come piwiRNA e snoRNA sono associati a patologie oncologiche.

lncRNA

NATs

L'espressione dei NATs è aberrante in un gran numero di patologie umane, quali la sindrome della X fragile, la malattia di Huntington, la malattia di Alzheimer ed altre.

Transcribed ultraconserved regions

L'espressione di questi T-UCR è associata a diversi tipi di tumori, come la leucemia.

Long intergenic ncRNA

L'espressione aberrante di numerosi lincRNA è stata correlata con tumori umani e altre patologie.

Pseudogeni

Si è dimostrato che ci sono degli pseudogeni che hanno un ruolo significativo nella progressione dei tumori.

RNA circolari

I circRNA giocano un ruolo importante nell'aterosclerosi, in malattie neurologiche e nel cancro. CiRS-7 circRNA agisce da inibitore spugna nei confronti di miR-7, che modula l'espressione di diversi oncogeni.

Biomarker

L'espressione di molti ncRNA è alterata nei tessuti malati rispetto ad i tessuti sani. I ncRNA sono potenziali marker per la diagnosi, prognosi e predizione di patologie umane.

miRNA

I miRNA hanno dei vantaggi nell'uso come marcatori. Sono stabili alle alte temperature, possono essere conservati per molto tempo, sono resistenti a molte condizioni ambientali e possono essere rilevati sia in campioni biologici fissati sia in campioni freschi.

La presenza di miRNA può essere determinata usando metodiche basate sulla PCR o sull'ibridazione. I miRNA hanno un pattern di espressione tessuto specifico. Almeno il 60% dei geni umani che codificano proteine sono regolati dai miRNA.

L'espressione alterata dei miRNA influenza molti importanti pathway di regolazione cellulare.

Targeting ncRNA per il trattamento delle patologie umane

L'espressione di ncRNA e lncRNA è deregolata in varie patologie umane, per cui sono dei potenziali bersagli terapeutici.

I miRNA vengono trascritti come precursori più lunghi nel nucleo, i pri-miRNA, che assumono una configurazione *stem-loop*. Questi miRNA primari sono substrato del complesso Drosha, che genera il pre-miRNA. Il pre-miRNA viene trasferito dal nucleo al citoplasma, dove diventa substrato di Dicer. Dicer rimuove il loop e genera il miRNA duplex, a doppio filamento. L'elica guida di questo miRNA si lega al

complesso RISC e questo complesso miRNA/RISC può appaiarsi alla regione 3' UTR del mRNA target, portando alla degradazione dell'mRNA o alla repressione traduzionale. I miRNA possono anche appaiarsi alla regione 5'UTR del mRNA bersaglio; in questi casi si può avere attivazione o repressione traduzionale. Studi recenti hanno dimostrato che alcuni miRNA/RISC possono appaiarsi all'interno della sequenza di mRNA target, con successiva repressione traduzionale.

In campo oncologico sono state messe a punto strategie terapeutiche per downregolare l'attività dei miRNA oncogenici e strategie per aumentare l'attività degli RNA oncosoppressori.

Agenti terapeutici che attivano la funzione dei miRNA

Tra le cause principale della ridotta espressione di miRNA oncosoppressori nei tumori umani c'è la delezione dei loci codificanti per i miRNA oppure il silenziamento epigenetico. Il silenziamento epigenetico può essere invertito con l'uso di agenti ipometilanti. Si può in alternativa utilizzare l'*enoxcina*. Questa molecola permette di aumentare la produzione di miRNA legandosi alla proteina TARBP2, coinvolta nella biosintesi dei miRNA.

Questi sono sistemi aspecifici, che non agiscono su uno specifico miRNA.

È possibile ripristinare i livelli dei miRNA usando appositi approcci basati sull'uso di oligonucleotidi. Queste strategie prevedono il disegno e la sintesi di miRNA mimics oppure di miRNA espressi a partire da vettori di espressione. Una strategia per incrementare la stabilità e l'assorbimento dei miRNA terapeutici è quella di accoppiare miRNA-mimics con nanoparticelle rivestite da anticorpo tumore-specifici.

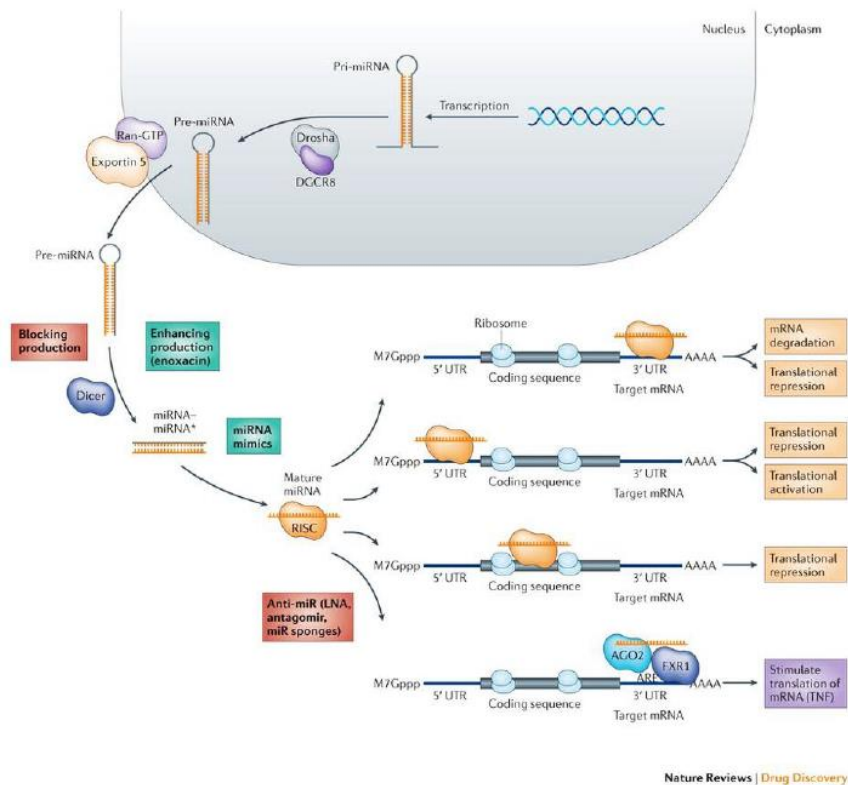
I miRNA mimics sono molecole sintetiche che mimano gli RNA presenti nella cellula. Un'altra strategia è quella di ingegnerizzare vettori di espressione codificanti per i miRNA in modo tale che i promotori siano in grado di promuovere l'espressione dei miRNA di interesse in un tessuto specifico.

Un miRNA è in fase di sperimentazione clinica come terapia, è MRX34, una formulazione liposomale di miR-34 per somministrazione endovenosa, utilizzata per pazienti con tumore epatico metastatico.

Agenti terapeutici che bloccano la funzione dei miRNA

Queste strategie si basano sull'utilizzo di oligonucleotidi. Possono essere utilizzati oligonucleotidi antisenso (ASOs, antisense oligonucleotides, or *anti-miRs*). Gli oligonucleotidi antisenso includono i *locked nucleic acid* (LNA anti-miRs), tiny LNA anti-miRs e gli *antagomirs*. Altri approcci oligonucleotidici si basano sulle spugne miRNA, che catturano i miRNA per complementarità e ne riducono la funzione.

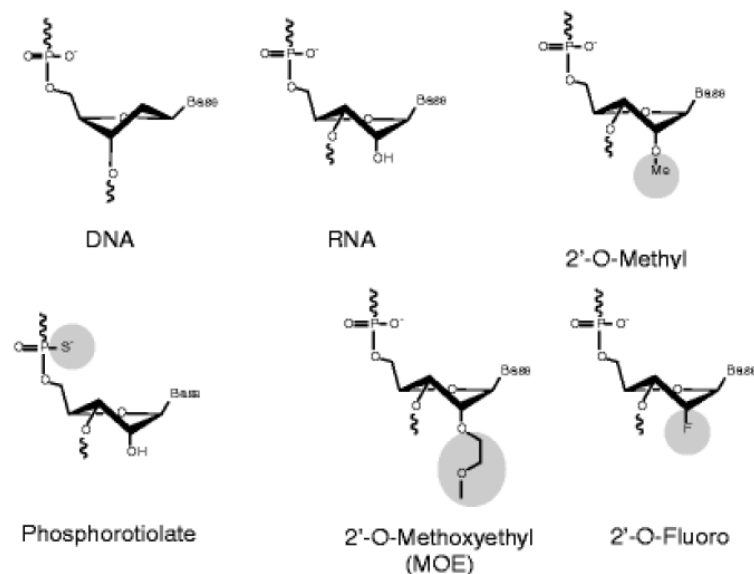
Gli *oligonucleotidi antisenso* sono molecole in grado di formare un duplex con il miRNA target, portando alla degradazione del miRNA.



Antagomir ASO

Gli antagomirs sono molecole di RNA a singolo filamento di 23 nucleotidi, che mediante complementarità delle basi si legano ai miRNA target, che devono essere boccati.

Questi antagomir contengono delle modificazioni, una delle quali è la 2'-O-metile, in cui ad essere modificato è lo zucchero in posizione 2, dove c'è un gruppo metile al posto del gruppo OH. Questa modificazione aumenta l'affinità di legame per la molecola complementare; tuttavia si è visto che gli oligonucleotidi che presentavano questa modificazione risultano molto sensibili alle esonucleasi, specialmente alle esonucleasi del siero, rendendo le molecole 2'-O-metilate non ideali per l'utilizzo clinico.



È stata quindi introdotta un'altra modificazione, che è il fosforotiolato. In questa molecola uno degli O del gruppo fosfato è sostituita dallo zolfo S. L'O sostituito non è quello coinvolto nel legame con il nucleotide adiacente.

Altre modificazioni sono la 2'-O-metossietile (MOE), dove al posto dell'OH è inserito un etere (metossietano).

Un'altra modificazione è l'aggiunta sempre in posizione 2 di un atomo di fluoro, 2'-O-fluoro.

Gli antagomir presentano al 3' una coda di colesterolo che è in grado di aumentare l'uptake da parte delle cellule in vivo.

Gli antagomir che usano un gruppo alternativo al 2' (fosfotiolato) hanno alterate proprietà chimiche, che riducono l'attività delle esonucleasi su questi substrati. Per aumentare la protezione verso le endonucleasi è suggerito inserire queste modificazioni nei nucleotidi che vengono inclusi nella sequenza di oligonucleotidi.

Va quindi attentamente valutata la quantità di legami modificati da inserire nella catena oligonucleotidica, che non possono essere inseriti in ogni nucleotide perché riducono la stabilità dell'oligonucleotide.

Targeting

miR-135b

miR-135b è coinvolto nel tumore al polmone. Si è visto in modelli murini che il trattamento con antagomir diretto contro il miR-135b ritardava la crescita tumorale e la comparsa di metastasi

miR-34

Ci sono studi preclinici che indicano che il miR-34 protegge dall'epilessia indotta da pilocarpina.

Locked nucleic acids (LNA)

I locked nucleic acids sono molecole di RNA a singolo filamento di 13-22 nucleotidi, che mediante complementarità delle basi legano i miRNA. Sono molecole generalmente più piccole degli antagomir.

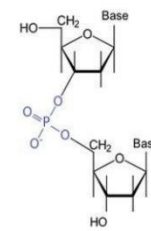
Contengono una modificazione chimica che consiste nel legame dell'O in posizione 2' al C in posizione 4' mediante un ponte metilenico. Si è visto che questa modificazione conferisce una migliore affinità di legame e una maggiore resistenza alle nucleasi.

LNA anti miR-122

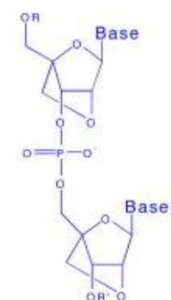
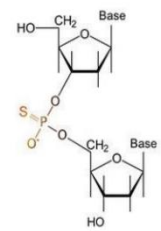
Il Miravirsen è un LNA anti miR diretto contro il miR-122. miR-122 è un miRNA presente al livello epatico, coinvolto in varie funzioni cellulari.

In cellule sane miR-122 in associazione con RISC si associa al suo mRNA target, con la conseguente repressione della traduzione del target. Quando le cellule vengono infettate dal virus il complesso miR122/RISC viene sequestrato dall'RNA del virus HCV. Il legame di miR122/RISC all'RNA di HCV sottrae il complesso dalla sua azione di inibizione dell'mRNA cellulare target originario.

Phosphodiester Bond



Phosphorothioate Bond



Locked nucleic acid (LNA)

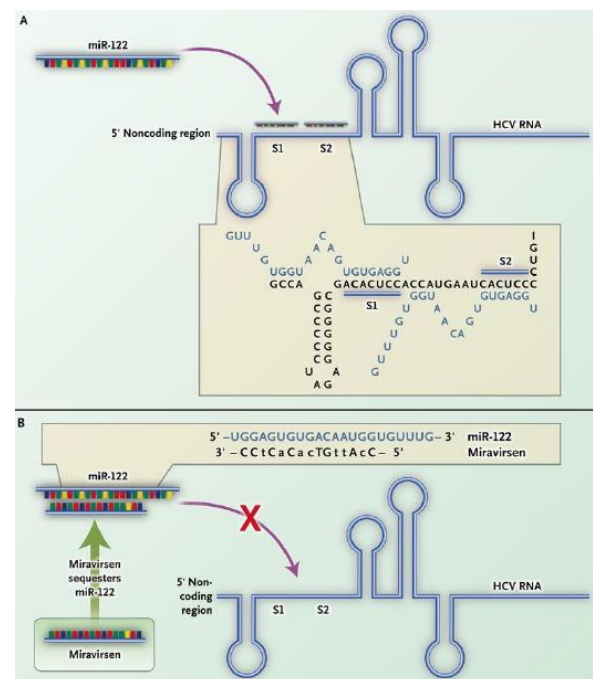
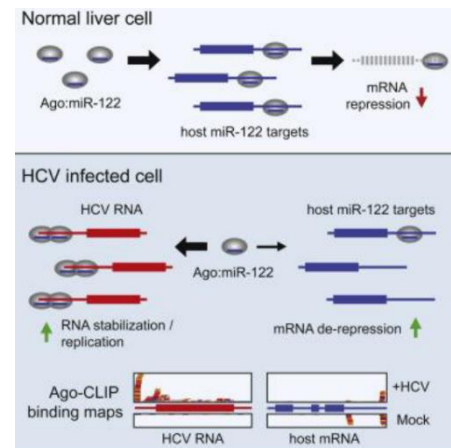
L'RNA virale risulta stabilizzato dall'interazione con il complesso miR122/RISC, mentre il target originario, che non è più bersaglio del complesso, aumenta la sua espressione nella cellula. Il prodotto dell'mRNA target, ora prodotto in grandi quantità, aumenta il potere oncogenico del virus HCV.

Il mir-122 si lega all'RNA virale al livello della regione 5' UTR, dove sono presenti le regioni S1 ed S2, stabilizzando il genoma virale e promuovendone la replicazione. Il Miravirsen è un oligonucleotide antisense LNA fosforotioato lungo 15 nucleotidi, si lega al miR-122 in modo stabile. Si forma una molecola di RNA a doppio filamento, ed il miR-122 non può più legarsi al genoma virale.

Normalmente i miRNA interagiscono più con la regione 3'UTR dei mRNA bersaglio. Nel caso di HCV la regione interessata è la 5'UTR.

Il Miravirsen è stato testato su 36 pazienti con infezione da HCV, divisi in quattro gruppi. Ad un gruppo è stato somministrato un placebo, mentre gli altri hanno ricevuto dosi di 3, 5 e 7 mg/kg di Miravirsen mediante iniezione sottocutanea. Si è visto una diminuzione della quantità di RNA virale nei gruppi 5 e 7 mg/kg.

Possibili effetti collaterali sono ridotti.



Tiny LNA anti miRs

I tiny LNA anti-miRs sono degli LNA di 8 nucleotidi. Anche queste molecole sono modificate con gruppo fosforotioato.

Queste molecole hanno come target la regione seed del miRNA target. I tiny LNA possono essere disegnati in modo tale da bloccare sia un singolo miRNA che una famiglia di miRNA. Per aumentare la specificità verso un singolo miRNA è preferibile usare oligonucleotidi con sequenze complementari di lunghezza maggiore.

MiRNA antagonists	Seed	
	miR-122	G-U-U-U-G-U-G-U-A-A-C-A-G-U-G-U-G-A-G-G-U-5'
	AntagomiR	5'-C-A-A-A-C-A-C-A-T-T-G-T-C-A-C-A-C-T-C-C-A-CHOL MsMsMpMpMpMpMpMpMpMpMpMpMpMpMpMsMsMsM
	LNA-AntimiR	5'-C-C-A-T-T-G-T-C-A-C-A-C-T-C-C LsdsLsDsLsLsDsLsDsLsDsLsLsLsL
	F/MOE-AntimiR	5'-A-C-A-A-A-C-A-C-A-U-U-G-U-C-A-C-A-C-U-C-C-A OsOsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsFsOsO
	TinyLNA	5'-C-A-C-A-C-T-C-C LsLsLsLsLsLsLsLsLsL

miRNA sponge vectors

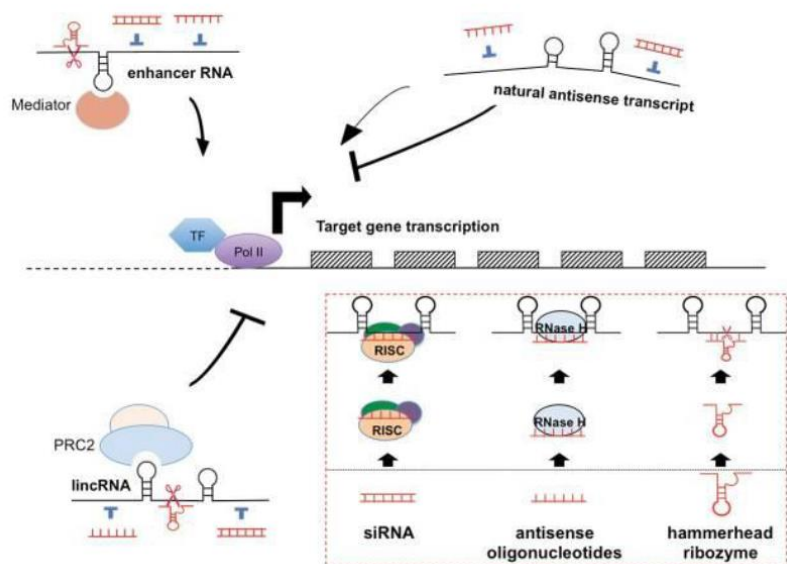
L'RNA spugna contiene siti di legame multipli complementari alla sequenza seed dei miRNA maturi. L'espressione di miRNA sponge è possibile mediante transfezione con un plasmide o mediante l'uso di un vettore virale. I miRNA spugna non presentano modificazioni chimiche, quindi sono necessari all'interno delle cellule in concentrazione alta. Questi geni sono infatti trascritti a partire da un promotore virale forte, come quello di CMV.

miRNA sponge sono stati utilizzati per studi preclinici.

Strategie per la regolazione dei lncRNA

Vi sono diversi gruppi di lncRNA, che svolgono funzioni specifiche. I NATs fungono da guida appaiandosi al DNA e portando con sé proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina, spesso portando ad una downregolazione della trascrizione dei geni bersaglio.

I lincRNA fungono da scaffold, legando proteine come il PRC2 (polycomb repressive complex 2), che inibisce la trascrizione. Gli eRNA si associano a proteine e permette l'attivazione della trascrizione genica.



Ci sono varie strategie per la regolazione dei lncRNAs. Possono essere usati dei siRNA, oligonucleotidi antisense, e ribozimi a testa di martello.

siRNA

Questa tecnica consiste nella trascrizione nelle cellule di RNA a doppio filamento di 22 nucleotidi, in cui uno dei due filamenti è complementare ad una regione dell'RNA bersaglio, che in questo caso è un lncRNA. Non è quindi necessaria maturazione dell'RNA guida, ma uno dei due filamenti dell'RNA a doppio filamento si lega al complesso RISC; il complesso RNA/RISC si lega alla regione complementare dell'RNA bersaglio e ne causa la degradazione o il blocco della traduzione.

Molti siRNA sono prodotti da vettori, che codificano per piccoli RNA con una forma a forcina. Questi piccoli RNA diventano substrato del complesso Dicer, che ha il compito di tagliare il loop dall'RNA precursore *stem-loop*, dando luogo ad un RNA a doppio filamento. Uno dei due filamenti viene caricato dal complesso RISC ed è in grado di interagire con il bersaglio (complementare al filamento di RNA legato a RISC).

Oligonucleotidi antisenso

AntagoNATs

I NATs possono avere una alterata regolazione ed espressione nelle patologie umane. Gli antagoNATs sono oligonucleotidi a singolo filamento diretti contro i NATs, che ne determinano la degradazione o bloccano l'interazione tra NAT e bersaglio.

Allo scopo di aumentare stabilità ed uptake cellulare gli antagoNATs sono modificati chimicamente, con le modifiche viste precedentemente negli oligonucleotidi antisenso.

I NATs possono reprimere l'espressione genica al livello trascrizionale. I NATs sono bersaglio degli antagoNATs, i quali possono bloccare l'interazione tra NAT e proteina effettrice, impedendo quindi l'azione dei NATs.

Gli antagoNATs possono anche causare la degradazione del trascritto NAT bersaglio.

Un esempio applicativo degli antagoNATs ne ha dimostrato l'efficacia nell'upregolazione di geni in vivo.

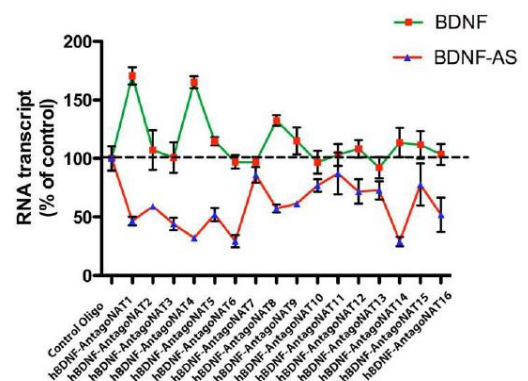
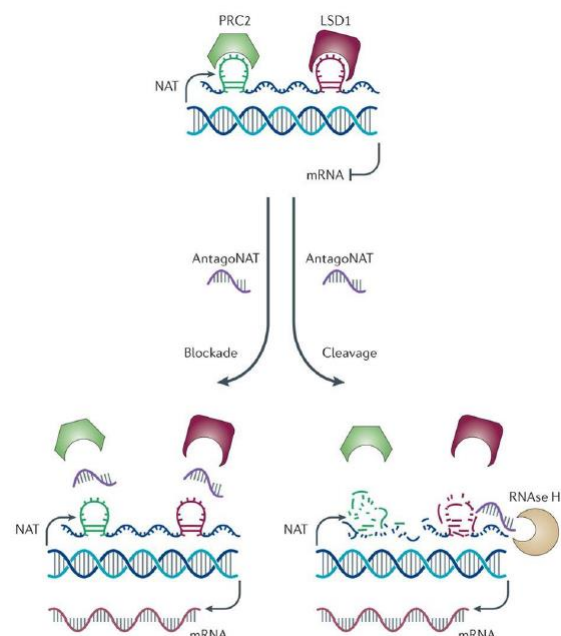
Le neurotrofine come BDNF appartengono ad una classe di fattori di crescita essenziali per il mantenimento, la differenziazione e la crescita neuronale. I livelli di espressione delle neurotrofine sono alterati in alcune patologie neurodegenerative, e si pensa che l'upregolazione di queste molecole possa avere un effetto terapeutico nei confronti di questi disordini.

Per il gene codificante BDNF è presente un NAT, trascritto in direzione opposta rispetto al gene codificante per la neurotrofina stessa. Per aumentare il livello di BDNF gli autori hanno pensato di bloccare il NAT diretto contro BDNF. Così facendo si è visto un aumento del livello di mRNA per BDNF con relativo aumento della traduzione, con relativa differenziazione neuronale sia in vitro che in vivo.

Per bloccare il NAT sono stati disegnati e sintetizzati 14 oligonucleotidi antisenso che portavano le modificazioni che conferiscono resistenza alle eso ed endonucleasi, quali le modificazioni LNA e 2'O-metile.

Sono anche stati utilizzati due nucleotidi di controllo, cioè che non si appaiano a nessuna regione.

Si è visto che alcuni degli antagoNATs testati causano una effettiva diminuzione della quantità del NAT BDNF-AS ed un aumento di BDNF.



Sembra che almeno in vitro anche gli siRNA possono essere utilizzati per indurre la derepressione da blocco dei NATs, quando la regione complementare sul NAT non si sovrappone con il trascritto senso.

Small molecules

I ncRNA formano strutture secondarie che possono fungere da siti di legame per composti chimici, che legandosi al lncRNA possono causarne l'attivazione o l'inibizione.

