

Molecole Antisenso

REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE

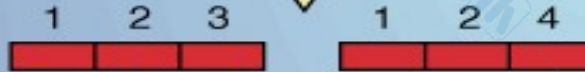


Nascent RNAs

Exon 1 Exon 2 Exon 3 Exon 4

Trascritto primario

REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONE



REGOLAZIONE TRADUZIONALE

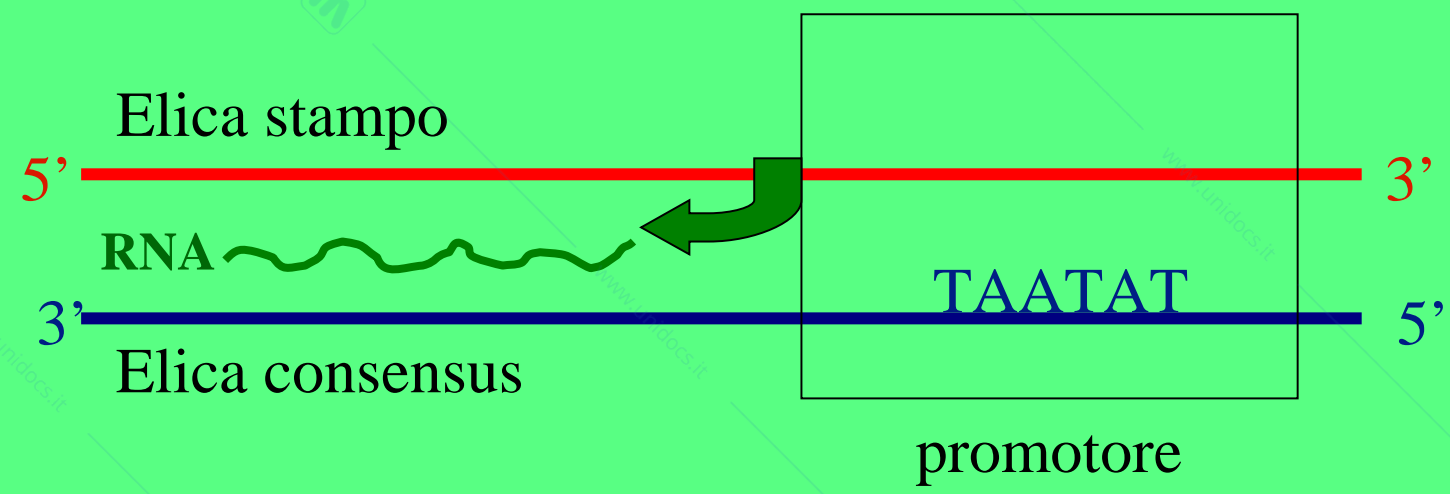
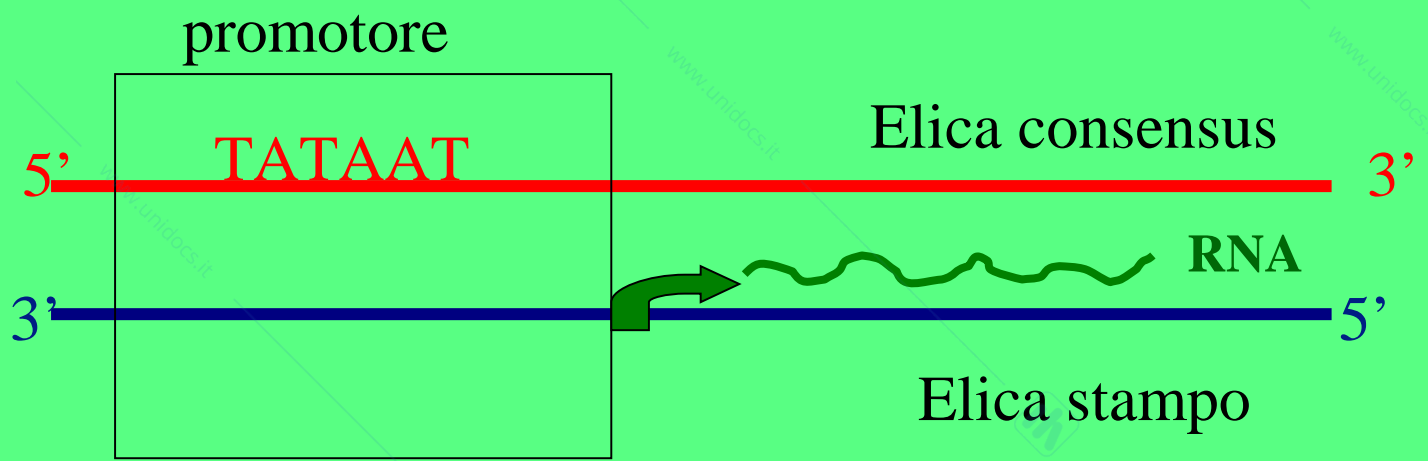
inibitori

Polipeptidi nascenti

REGOLAZIONE POST-TRADUZIONALE

Ipotesi sull'esistenza di trascritti antisenso

- Negli anni '70 analizzando la disposizione delle regioni promotrici sul genoma si ipotizzò che una regione di DNA potesse essere trascritta in entrambi i sensi: mRNA anti-mRNA
- Le prime prove sperimentali per l'identificazione degli anti-trascritti vennero da studi di complementazione degli mRNA tardivi del fago T4



Quale ruolo per gli anti-trascritti?

- Regolazione dell'espressione genica: un anti-mRNA complementandosi con l'mRNA ne impedisce la traduzione



Alla ricerca degli anti-trascritti

- Analisi delle sequenze genomiche
- Estrazione dell'RNA
- Northern blot con sonde che siano complementari al trascritto
- Northern blot con sonde che siano complementari all'antitrascritto
- Analisi di librerie di cDNA con sonde per trascritti ed antitrascritti
- Saggi di protezione da RNAsi agenti su RNA a singola elica

mRNA ed anti-trascritti

- **Anti c-Myc** (proto-oncogene)
- **Anti N-Myc** (proto-oncogene)
- **Anti bFGF** (fattore di crescita)
- **Anti IGF II** (fattore di crescita)
- **Anti SMAD5** (proteina di trasduzione del segnale)
- **Anti GNAS1** (proteina di trasduzione del segnale)
- **Anti L7** (proteina ribosomiale)

Esempio di caratterizzazione di un antisenso endogeno: c-Myc gruppo del Prof. R. Casero, John Hopkins Inst. Baltimora

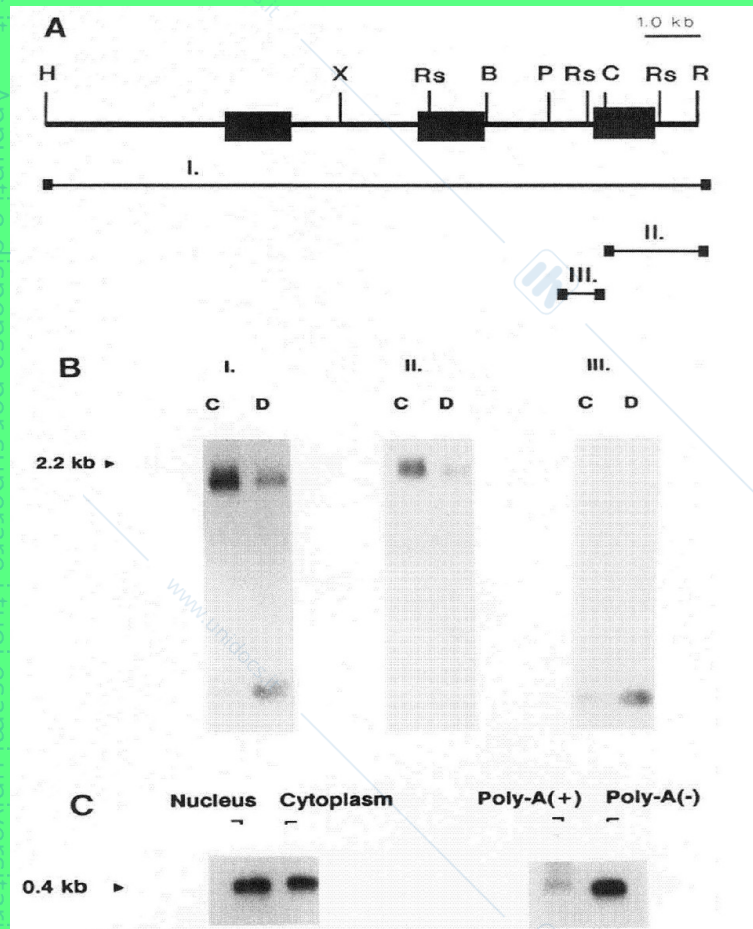
- Gene c-Myc ha 3 esoni e 2 introni e produce un trascritto di circa 2,2 Kb

In Cellule tumorali COLO320 trattate con inibitori della Ornitina decarb. si riduce c-Myc

In cellule trattate con inibitore e cellule di controllo si effettuarono Northern blot con sonde a doppia elica capaci quindi di identificare sia trascritti senso che antisenso

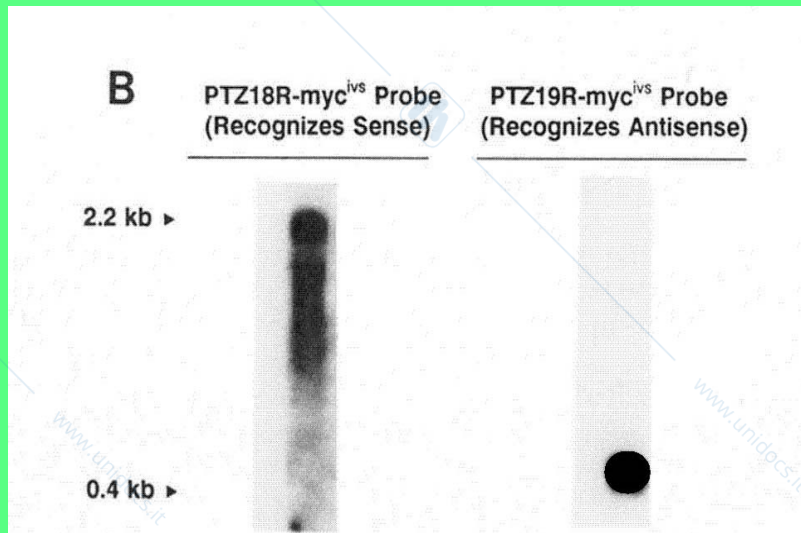
Nelle cellule trattate con inibitore diminuiva il livello di c-Myc e si osservava un trascritto di circa 400 nucleotidi.

Questo frammento di 400 nucleotidi era un prodotto di degradazione? E come mai si osservava ibridando con una sonda che riconosceva la regione intronica?



Esempio di caratterizzazione di un antisenso endogeno: c-Myc

gruppo del Prof. R. Casero, John Hopkins Inst. Baltimora



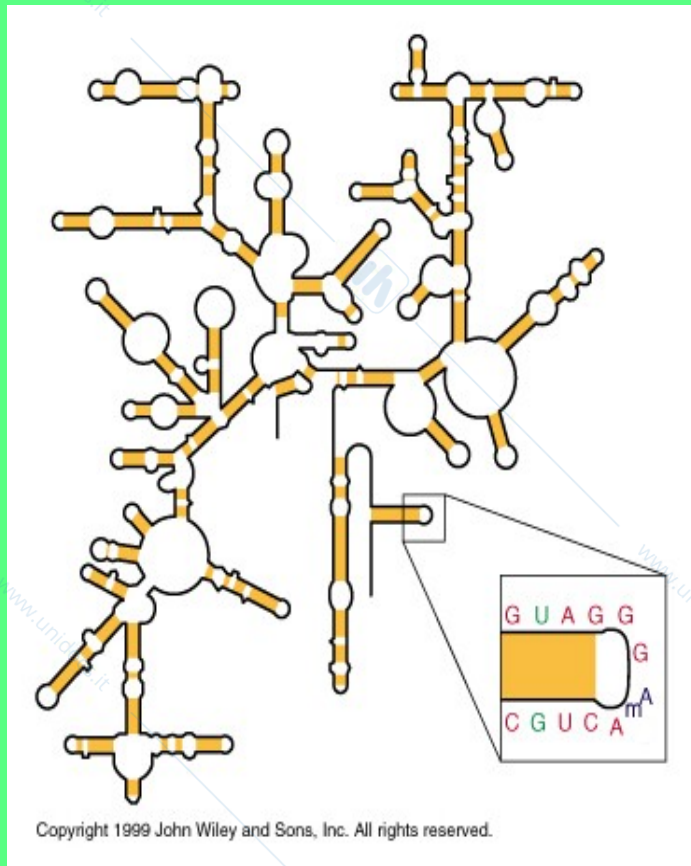
- Ibridando gli estratti di RNA con sonde specifiche per identificare mRNA ed antisenso si dimostrò che la molecola di 400 nucleotidi era trascritta in maniera antisenso.
- Saggi di protezione da RNasi A dimostrarono l'esistenza di un ibrido mRNA-antimRNA

Utilizzare il meccanismo di regolazione antisenso per modulare artificialmente l'espressione genica

Inibire l'espressione di un gene tramite tecnica antisenso

- Primi tentavi di inibire l'espressione di un gene vennero effettuati mediante l'utilizzo di plasmidi trascriventi un cDNA in maniera antisenso.
- La molecola antisenso artificiale dovrebbe complementarsi con l'mRNA ed impedirne la traduzione.
- Tuttavia in molti casi questa metodica si è rivelata inefficace: perché?

Struttura tridimensionale di un RNA



- Ogni RNA assume una specifica conformazione nell'ambiente cellulare.
- Non sempre un mRNA con una specifica struttura spaziale si rende disponibile all'ibridazione con un anti-messaggio, che peraltro ha anch'esso una specifica disposizione nello spazio.

Molecole antisenso sintetiche

- Produzione di corte molecole di DNA (oligodeossinucleotidi) complementari ad una regione di un RNA bersaglio
- Somministrare gli oligodeossinucleotidi antisenso a colture cellulari o ad animali modello e verificare l'effetto biologico
- In molti casi questa metodica si è rivelata efficace

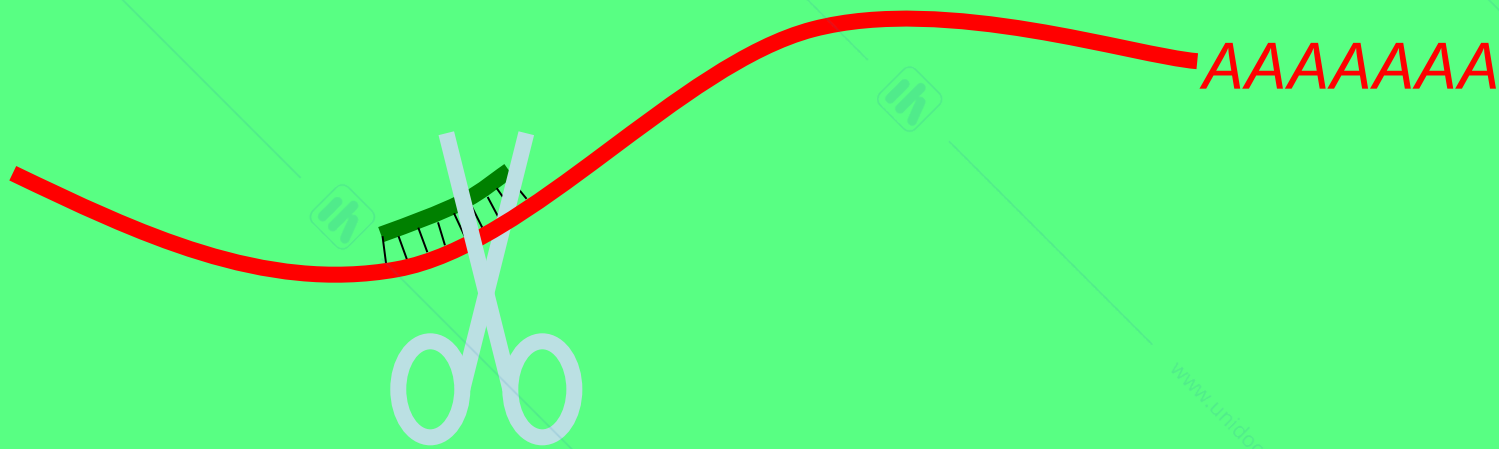
Come funzionano gli oligo Antisenso?



Proteina incompleta o nessuna sintesi

MECCANISMO PASSIVO

Come funzionano gli oligo antisenso?



Degradazione dell'RNA bersaglio

Assenza di sintesi proteica

RNA è idrolizzato
Dall'enzima Rnase H

MECCANISMO ATTIVO

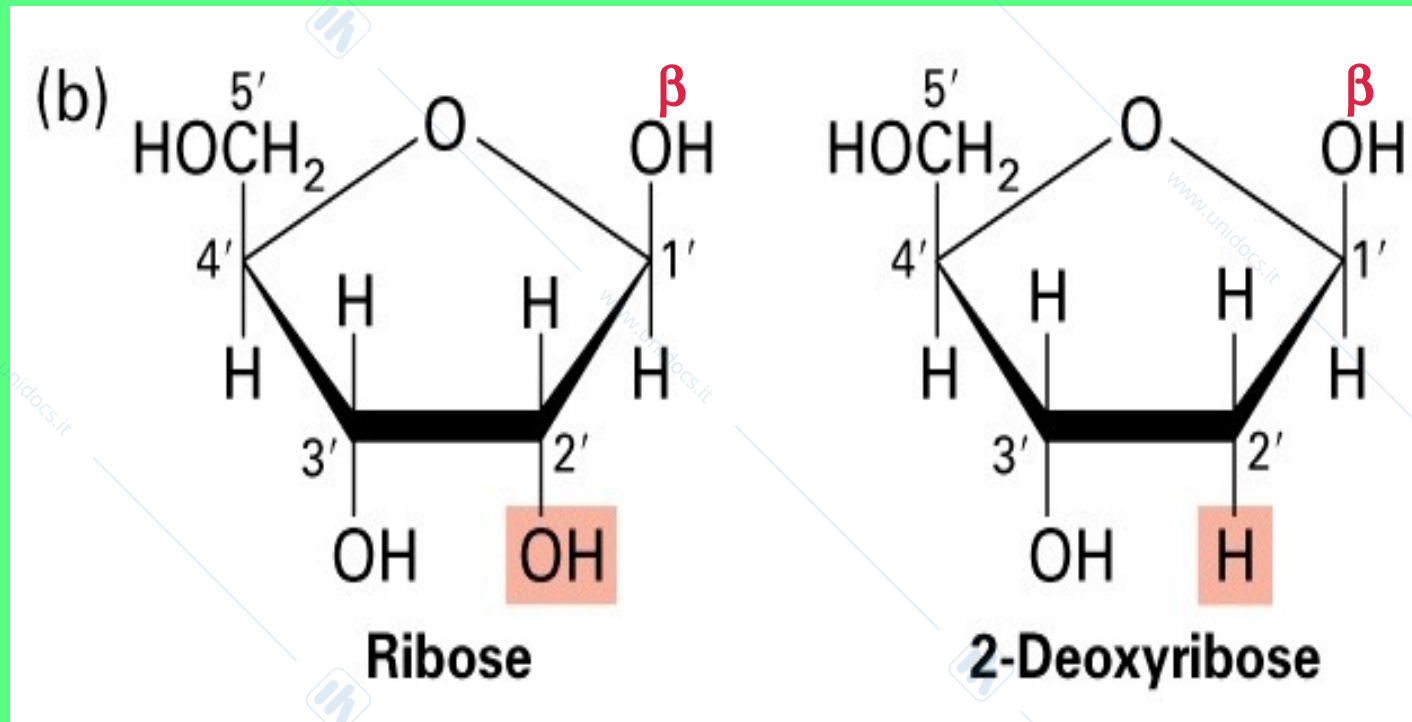
Risultato:

Qualunque sia il meccanismo di funzionamento:

Non si avrà traduzione dell'mRNA in proteina

Oligonucleotidi Antisenso

- Corte molecole di DNA (15-18 nucleotidi) complementari ad un mRNA bersaglio
- **Perchè molecole di DNA e non di RNA?**



Oligonucleotidi Antisenso

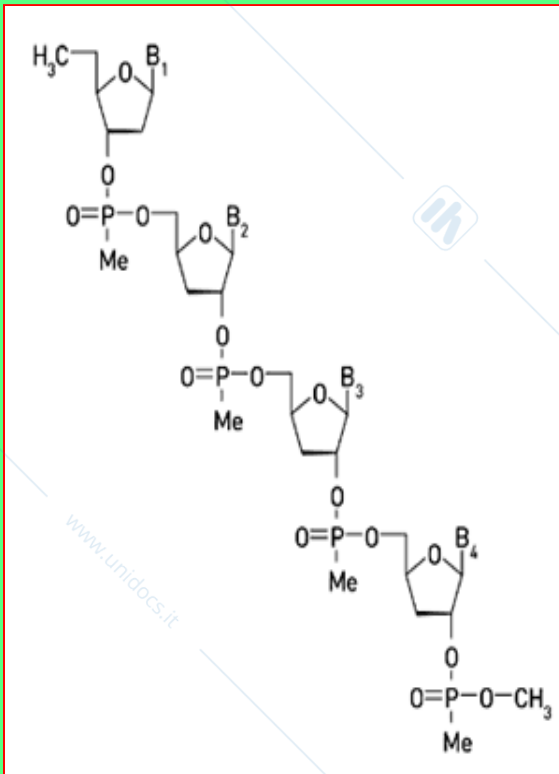
- **Perché la lunghezza degli oligo è mediamente 15-18 basi?**
- Oligo troppo corti riconoscerebbero più di una sequenza bersaglio nel “pool” degli mRNA prodotti da una cellula
- Oligo troppo lunghi potrebbero facilmente formare strutture tridimensionali (ad es. gambo ed ansa) che riducono l’associazione con la molecola bersaglio

Oligonucleotidi Antisenso

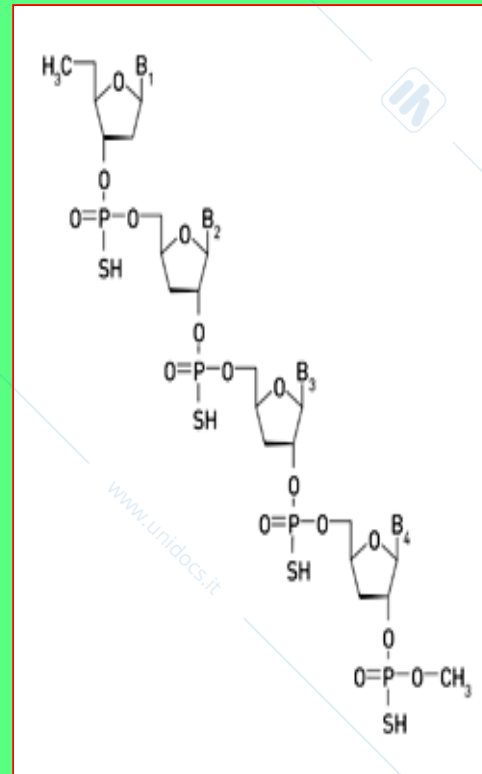
Presentano una serie di modifiche chimiche della struttura per aumentarne la stabilità *in vitro* ed *in vivo* ed anche per modificare la specificità

Oligonucleotidi Antisenso

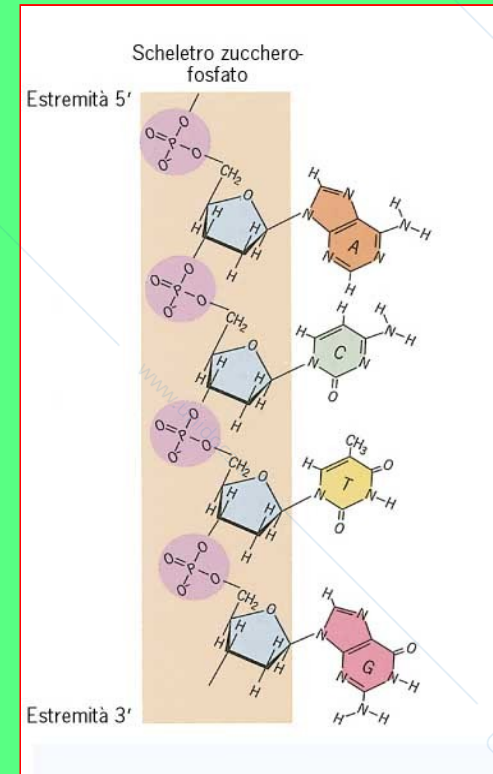
- Presentano una serie di modifiche chimiche della struttura



Metilfosfonati



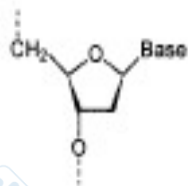
Fosforotioati



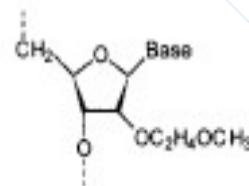
Non modificati

Oligonucleotidi Antisenso

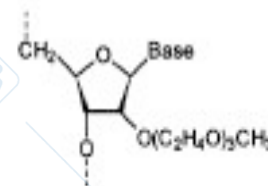
Modifiche dello zucchero



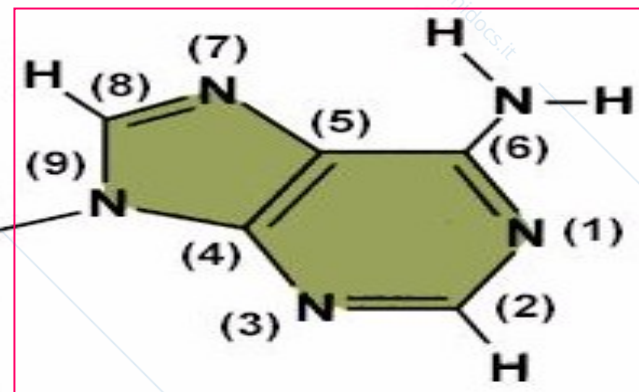
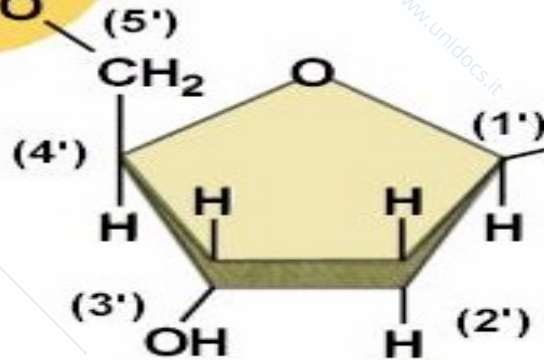
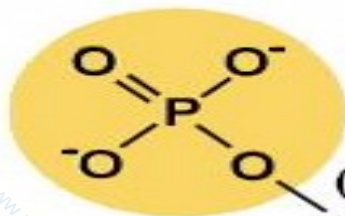
2' - deoxy
ribose



2' - methoxyethoxy
ribose



2' - methoxytriethoxy
ribose



Modalità di funzionamento degli oligo

antisenso Modalità Antisenso

- **Ibridazione con l'mRNA bersaglio**

Modalità Non antisenso

- **Interazione sequenza specifica con proteine nella cellula (es. Fattori di trascrizione)**
- **Interazione non sequenza specifica mediata con proteine nella cellula tramite:**
 - 1) **conformazione spaziale (una regione ansa e gambo è riconosciuta da una proteina)**
 - 2) **composizione in basi (oligo ricchi in CG sono immunomodulatori)**
 - 3) **le cariche negative dell'oligo possono interagire con domini proteici carichi positivamente**

Problematiche connesse all'utilizzo di molecole antisense

- **Regioni bersaglio**
- **Scelta oligonucleotidi di controllo**
- **Affinità**
- **Selettività**
- **Modalità di somministrazione**
- **Stabilità della molecola**

Oligonucleotidi di controllo

- **Cosa sono gli oligonucleotidi di controllo?**

Sono molecole che, non essendo complementari all'mRNA bersaglio, quando somministrate a colture cellulari od animali modello non devono inibire l'espressione del gene oggetto di studio.

Progettare un esperimento antisenso

- Progettare e sintetizzare oligonucleotidi antisenso diretti contro un gene di interesse
- Progettare oligo di controllo
- Organizzare due gruppi di colture cellulari (o di animali) e somministrare oligo antisenso e di controllo, rispettivamente
- A tempi diversi (a partire da 24 ore fino ad un massimo di 72 ore) estrarre RNA e proteine da cellule e/o tessuti
- Eseguire northern blot e/o western blot per verificare l'inibizione dell'espressione del gene di interesse unicamente nelle cellule trattate con le molecole antisenso

Oligonucleotidi di controllo

- Target 5'-xx-CAA TAT CCT AGT GGT-xx-3'
- **Antisenso** 5'-ACC ACT AGG ATA TTG-3'
- **Senso** 5'-CAA TAT CCT AGT GGT-3'
- **Reverse** 3'-ACC ACT AGG ATA TTG-5'
- **Mismatched** 5'-AC_g ACT tGG AgA T_cG-3'
- **Scrambled** 5'-CCA ATC GAG TTA TAG-3'

Perchè tanti tipi di oligonucleotidi di controllo?

I diversi oligonucleotidi di controllo consentono di verificare se l'effetto biologico osservato somministrando oligo antisense è:

- 1) dovuto all'ibridazione con l'mRNA bersaglio (effetto antisense)
- 2) dovuto alla struttura spaziale (effetto non antisense)
- 3) dovuto alla composizione in basi (effetto non antisense)

**Controllo
in basi**

struttura

composizione

SENSO

SI

NO

SCRAMBLE

NO

SI

MISMATCHED

dipende

dipende

REVERSE

SI

SI

“Uptake” degli oligonucleotidi

- Gli oligo possono essere somministrati “nudi” alle colture cellulari o agli animali da laboratorio e verranno captati dalle cellule mediante un processo di endocitosi-recettore dipendente
- Per facilitare l’introduzione degli oligo si può anche ricorrere all’utilizzo di miscele liposomiche o alla tecnica dell’elettroporazione

Vitravene®(fomivirsen):

Il primo farmaco basato sulla tecnologia antisense



Vitravene® (fomivirsen) is a registered trademark of of Novartis AG

Vi saranno altri farmaci antisenso?

Product (form)	Target	Lead Indication	Partner	Pre-Clinical	Phase 1	Phase 2	Phase 3	On Market	
Vitravene® (I)	CMV	CMV Retinitis	Novartis	█					
Affinitak™ (P)	PKC-α	Cancer - NSCLC, others	Lilly	█					
Alicaforsen (P) (ISIS 2302)	ICAM-1	Crohn's Disease	Isis	█					
Alicaforsen (T) (ISIS 2302)	ICAM-1	Psoriasis, others	Isis	█					
Alicaforsen (E) (ISIS 2302)	ICAM-1	Ulcerative Colitis	Isis	█					
ISIS 14803 (P)	HCV	Hepatitis C	Isis	█					
ISIS 2503 (P)	H-ras	Cancer - pancreatic, other	Isis	█					
ISIS 104838 (P, O)	TNF-α	Rheumatoid Arthritis	Isis	█					
ISIS 104838 (T)	TNF-α	Psoriasis	Isis	█					
OGX-011 (P) (ISIS 112989)	Clusterin	Cancer - prostate, others	OncoGenex	█					
ISIS 113715 (P)	PTP-1B	Diabetes	Isis	█					
ISIS 13650 (I)	c-raf	Diabetic Retinopathy, AMD	Isis	█					
ISIS 107248 (P)	VLA-4	Multiple Sclerosis, others	ATL	█					
ISIS 23722 (P)	Survivin	Cancer	Lilly	█					

I = Intravitreal
P = Parenteral
E = Enema
T = Topical
O = Oral



1st generation chemistry

2nd generation chemistry

Vitravene® is a registered trademark of Novartis AG

Affinitak™ is a trademark of Eli Lilly and Company