

Le molecole antisenso

- Furono ipotizzate negli anni '70 quando analisi dei promotori dei geni consentirono di ipotizzare che alcune regioni del DNA potessero essere trascritte usando entrambi i filamenti di DNA e dando quindi mRNA senso e mRNA antisenso
- Un antisenso endogeno fu identificato da un gruppo di ricerca di Baltimore ed era relativo al gene per c-Myc (proto-oncogene). → trattarono delle cellule tumorali con Ornitina decarbossilasi e i livelli di espressione di c-myc si abbassarono. Alle analisi compariva una ulteriore banda corrispondente ad un frammento di circa 400 bp che non sembrò derivare da alcun processo di degradazione. Risultò essere presente sia nel nucleo che nel citoplasma. Il suo ruolo era l'ibridazione in un punto preciso di c-myc così che potesse fungere da blocco per lo scorrimento del ribosoma. Questo perché **un anti-mRNA, complementandosi con un mRNA, ne impedisce la traduzione**
- Iniziò quindi la ricerca degli antisenso endogeni e inoltre si fece strada l'idea di poter sintetizzare antisenso in vitro e utilizzare questi antisenso esogeni per modulare artificialmente l'espressione genica. Questo prevede:
 - 1) Sintesi di piccole molecole antisenso in vitro
 - 2) Somministrazione di tali molecole

Sintesi di piccole molecole antisenso in vitro

Dovevano essere utilizzate piccole molecole di DNA (15-18 nt) complementari ad una sequenza target nell'mRNA bersaglio

Dovevano essere di DNA e non RNA perché in questo modo potevano essere meno esposte all'azione di nucleasi dal momento che le RNasi sono più frequenti.

Per ridurre ulteriormente l'esposizione alle nucleasi, inoltre, questi nucleotidi generalmente sono modificati chimicamente. Queste modifiche possono riguardare sia i gruppi fosfato (Metilfosfonati – sostituzione di O con CH₃, Fosfortioati – sostituzione di O con tioati) che gli zuccheri.

Dovevano inoltre essere molecole non troppo piccole (sarebbero state ASPECIFICHE) né particolarmente lunghe (perché avrebbero potuto autostrutturarsi e non essere dunque più disponibili per il legame con la molecola target)

COME FUNZIONANO?

Esiste una modalità di funzionamento specifica che prevede l'appaiamento dell'oligoantisenso con la molecola di mRNA ed è detta modalità ANTISENSO e una modalità ASPECIFICA.

La modalità aspecifica può essere:

- 1) Interazione sequenza specifica con proteine nella cellula (Es. con fattori di trascrizione)

- 2) Interazione non sequenza specifica con proteine nella cellula, con modalità più generali come la conformazione spaziale, il contenuto in basi (cioè quantità di GC e non la sequenza) oppure interazione tra cariche dell'oligo e delle proteine

Per quanto riguarda il funzionamento della modalità specifica possiamo avere:

1) Meccanismo Passivo : la molecola antisenso si lega alla molecola target per complementarità e questo tipo di legame comporta il blocco dei ribosomi e dunque della traduzione

2) Meccanismo Attivo: in seguito all'appaiamento tra l'oligonucleotide antisenso e la molecola si viene a formare una regione ibrida che può richiamare l'RNasi H. Essendo una RNasi questa degrada la porzione ad RNA e rompe così la molecola del trascritto

IN ENTRAMBI I CASI NON C'E' SINTESI PROTEICA

L'utilizzo di molecole antisenso comporta una serie di problematiche:

- 1) Regioni bersaglio → In TEORIA si devono scegliere regioni bersaglio a singolo filamento, quelle nelle quali cioè si ha la minore probabilità che vengano a formarsi strutture secondarie per appaiamenti interni. SPERIMENTALMENTE si è visto che le migliori sono :
 - Regione AUG
 - Giunzione Esone-Esone
 - 3'UTR (nelle vicinanze della coda di PoliA)
- 2) Scelta di Oligonucleotidi di Controllo, molecole non complementari all'mRNA target che quindi non devono inibirlo (serve negli esperimenti). Questi infatti in fase sperimentale consentono di vedere se l'effetto è dovuto a
 - Ibridazione con l'mRNA bersaglio (effetto antisenso)
 - Alla struttura spaziale (non antisenso)
 - Alla composizione in basi (non antisenso)
- 3) Modalità di somministrazione (uptake) :
 - Possono essere somministrati Nudi e verranno poi captati dalle cellule grazie al processo di endocitosi mediata da recettore
 - Possono anche essere inseriti in miscele liposomiche per facilitare il processo