

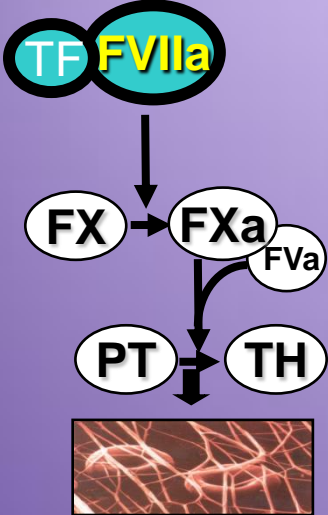


Università degli Studi di Ferrara

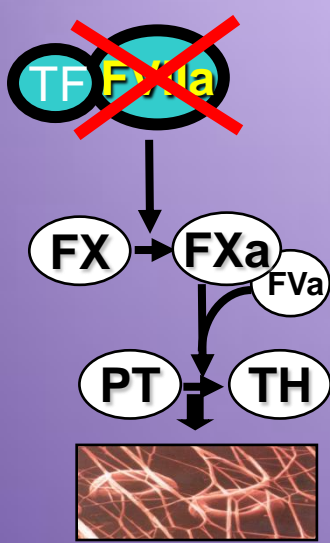


**UTILIZZO DI U1-snRNA PER LA
CORREZIONE DEL DIFETTO
SEVERO DI FATTORE VII DELLA
COAGULAZIONE**

FVII

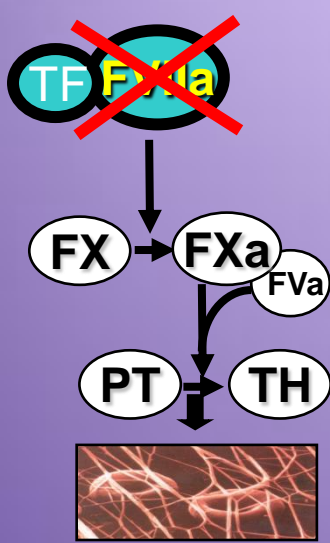


FVII



Deficienza congenita di FVII

FVII

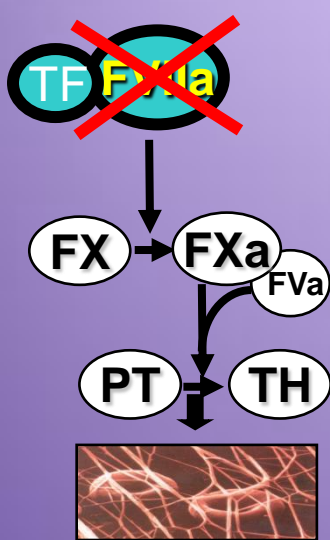


Deficienza congenita di FVII



**mutazione nel
gene del FVII**

FVII



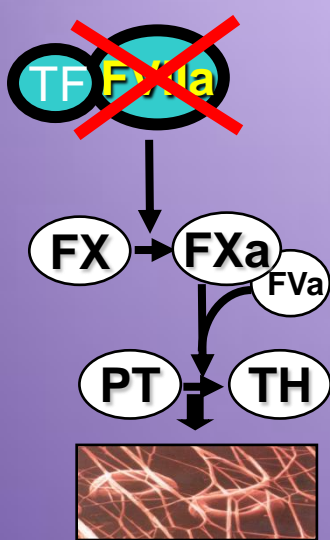
Deficienza congenita di FVII



**mutazione nel
gene del FVII**

**malattia autosomica recessiva a penetranza variabile
con frequenza 1/500.000**

FVII



Deficienza congenita di FVII



mutazione nel
gene del FVII

malattia autosomica recessiva a penetranza variabile
con frequenza 1/500.000



FVII Deficiency

- FVII def. is associated to bleeding tendency.
- Complete def. is virtually lethal.

Bleeding

TERAPIE

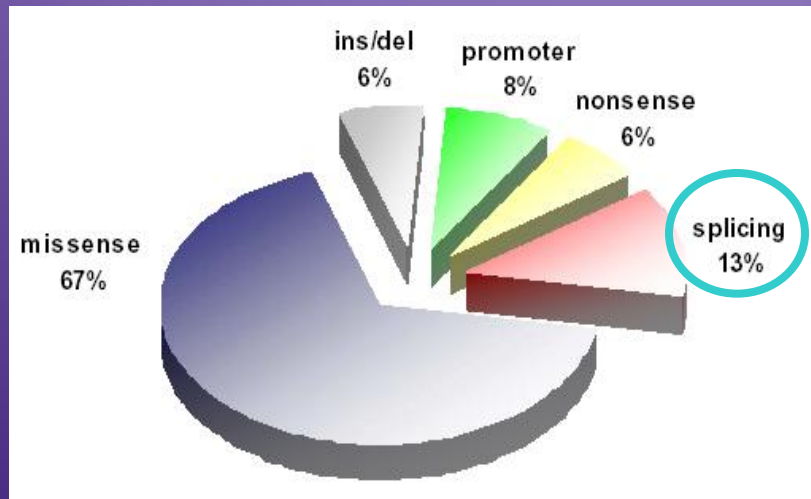
Concentrati del FVII derivati dal plasma: rischio trasmissione patogeni

Plasma fresco congelato: pro → poco costoso, facilmente reperibile

contro → patogeni/virus, rischio trombotico

rFVIIa: è il preparato più sicuro, ma molto costoso

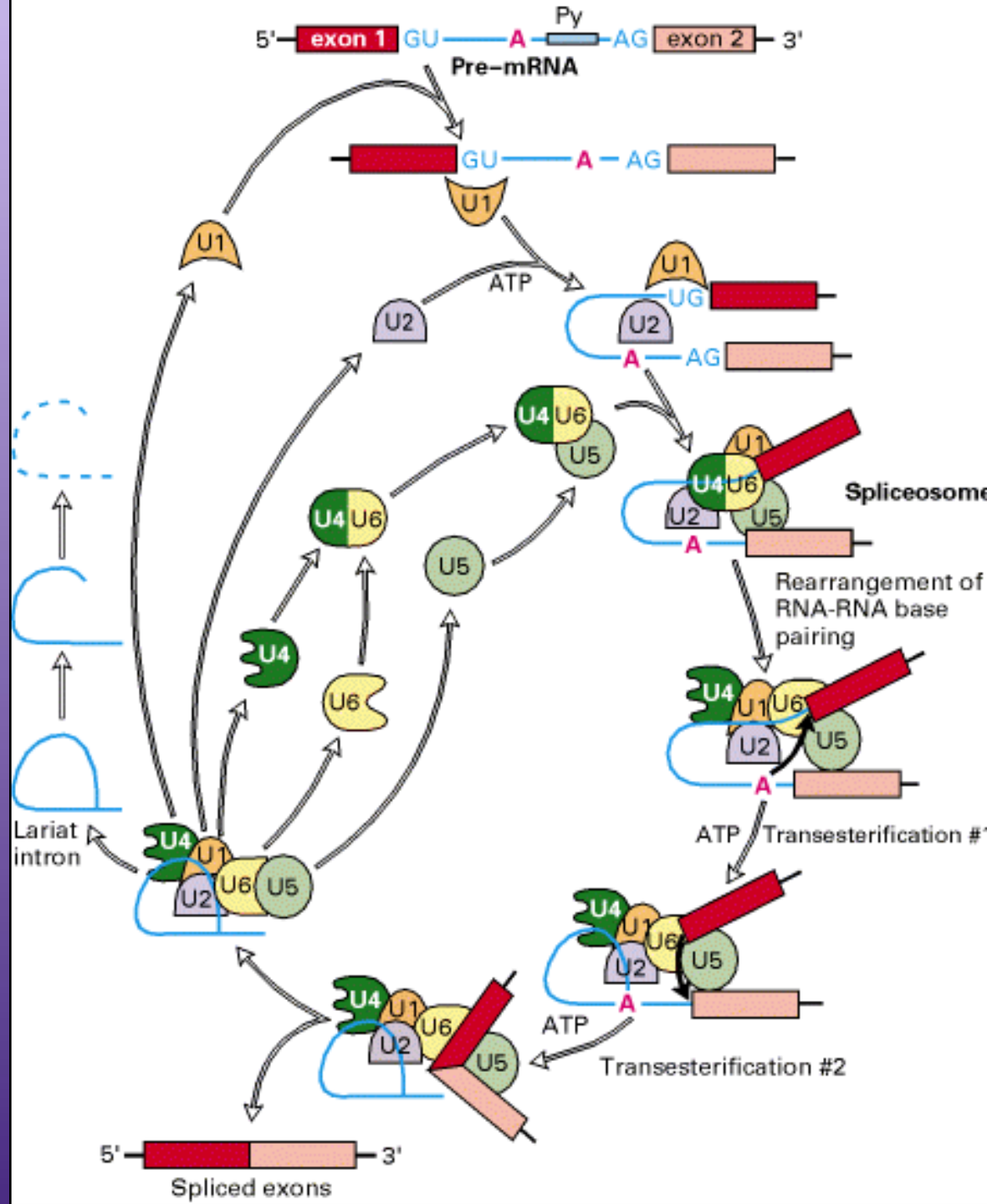
CAUSE

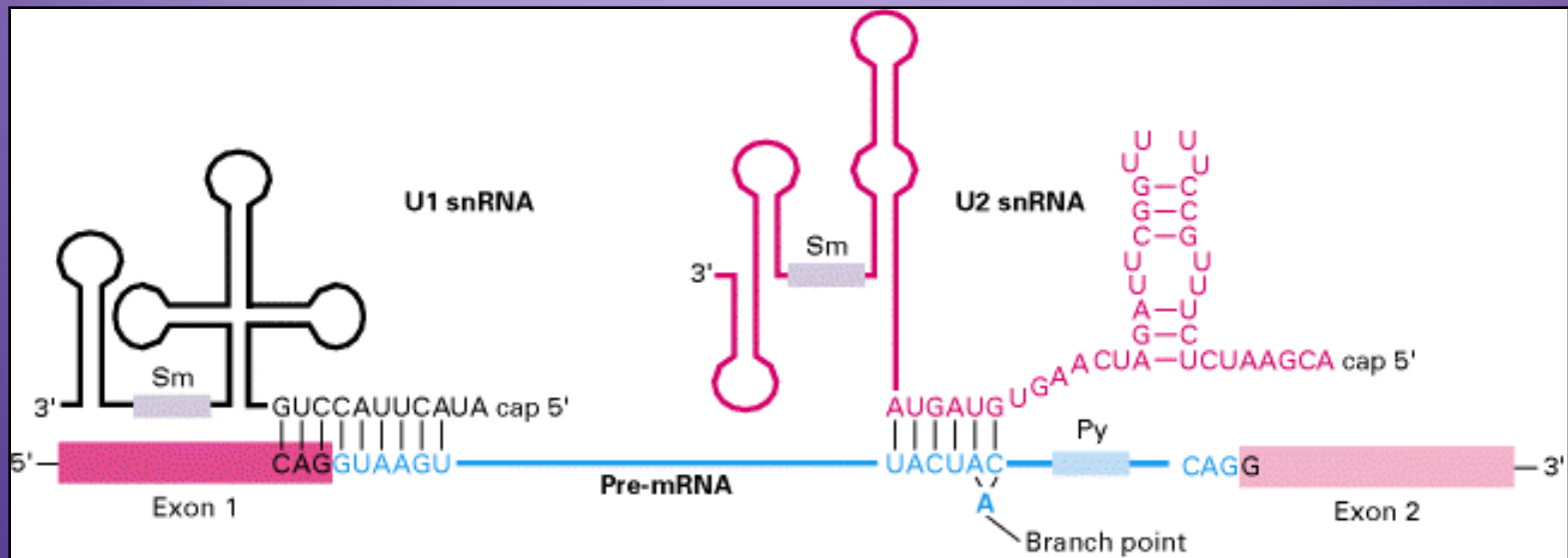


**Mutational Pattern
in FVII def.**

(IRF7 data base)

The spliceosomal cycle.
 The splicing snRNPs (U1, U2, U4, U5, and U6) associate with the pre-mRNA and with each other in an ordered sequence to form the spliceosome.





Interactions between pre-mRNA, U1- and U2-snRNAs in splicing.

The 5' region of U1 snRNA initially base-pairs with nucleotides at the 5' end of the intron and 3' end of the exon of the pre-mRNA; U2 snRNA base-pairs with a sequence that includes the branch-point A, although this residue is not base-paired.

IVS7 +5G→A (FVII Lazio)



A



TGG / GTGGGTACC

Exon 6

Exon 7

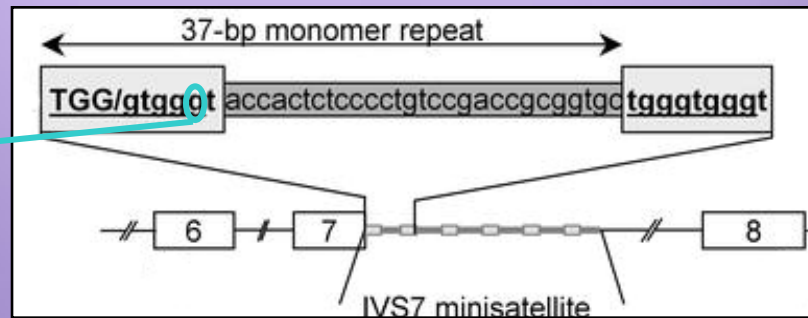
Exon 8



* * * * *

IVS7 5'ss is in the 1st of highly homologous 37bp repeats containing identical **cryptic 5'ss** (*)

La mutazione è situata nel primo dei repeats di 37bp



Analisi informatica dei siti critici per lo splicing

Wt

ex7	POS.	DONOR SITES:		SCORE
		EXON	INTRON	
█	427	GAG	GTGAAC	81.
█	807	TGG	GTGGGT	83.
█	844	TGG	GTGGGT	85.
█	881	TGG	GTGGGT	85.
█	918	TGG	GTGGGT	85.
█	955	TGG	GTGGGT	85.

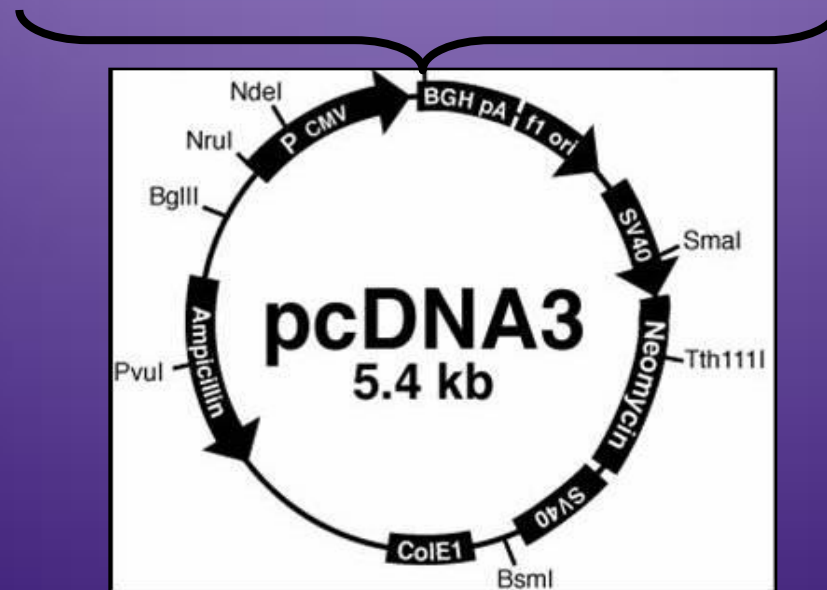
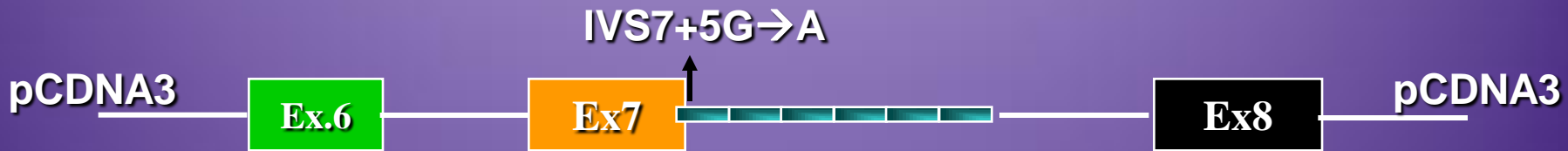
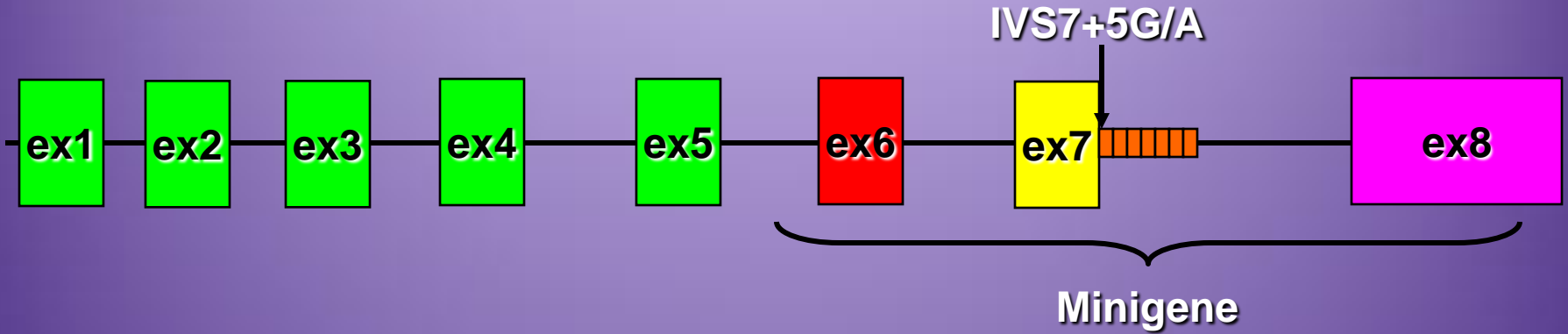
IVS7+5G/A

ex7	POS.	DONOR SITES:		SCORE
		EXON	INTRON	
█	427	GAG	GTGAAC	81.
█	807	TGG	GTGGGT	83.
█	844	TGG	GTGGGT	85.
█	881	TGG	GTGGGT	85.
█	918	TGG	GTGGGT	85.
█	955	TGG	GTGGGT	85.

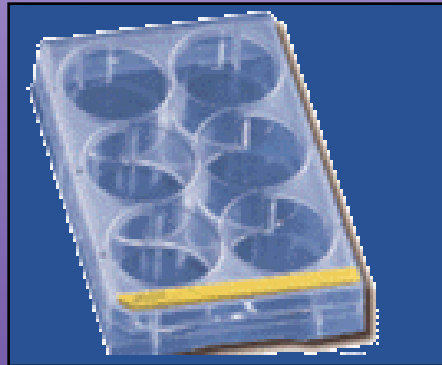
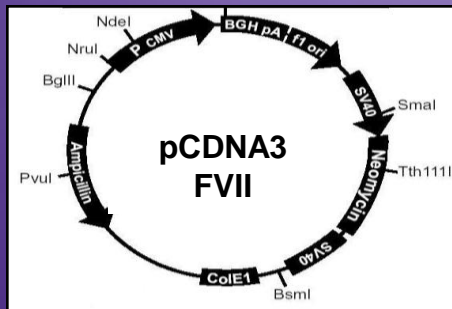
+ 37bp

Perdita del sito canonico e utilizzo del sito a +37bp

Effetti della mutazione sullo splicing del FVII mRNA: strategia dei minigeni

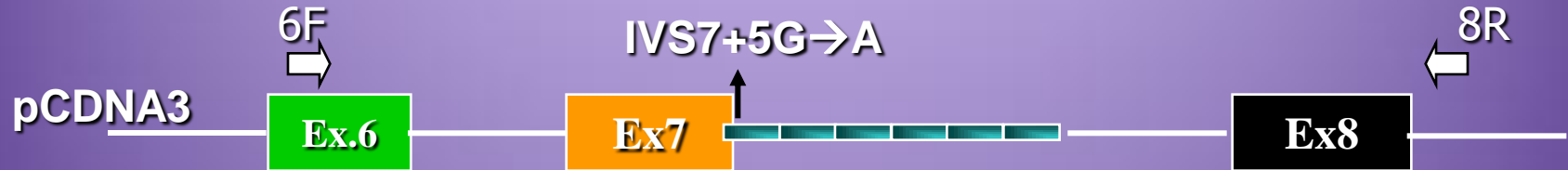


ESPRESSIONE IN CELLULE EUCARIOTICHE

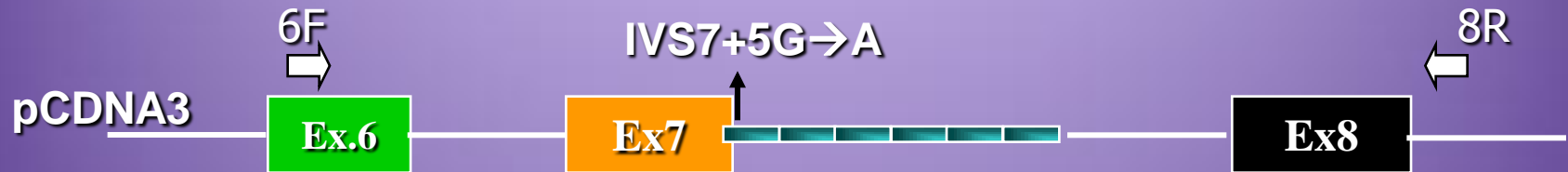


Estrazione RNA
ed RT-PCR

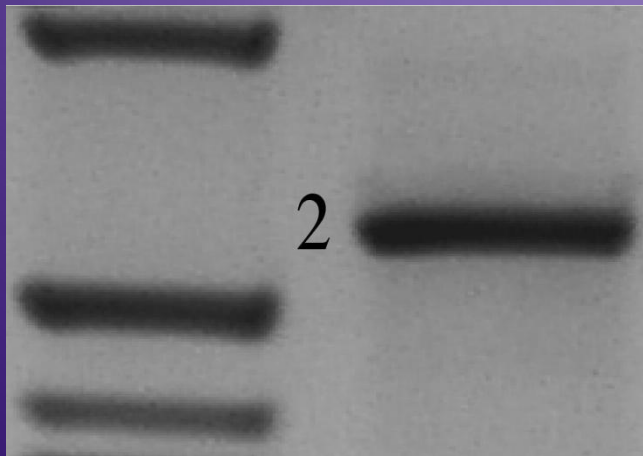
EFFETTI DELLA MUTAZIONE IVS7+5G/A SUL PROCESSAMENTO DELL'mRNA:



EFFETTI DELLA MUTAZIONE IVS7+5G/A SUL PROCESSAMENTO DELL'mRNA:



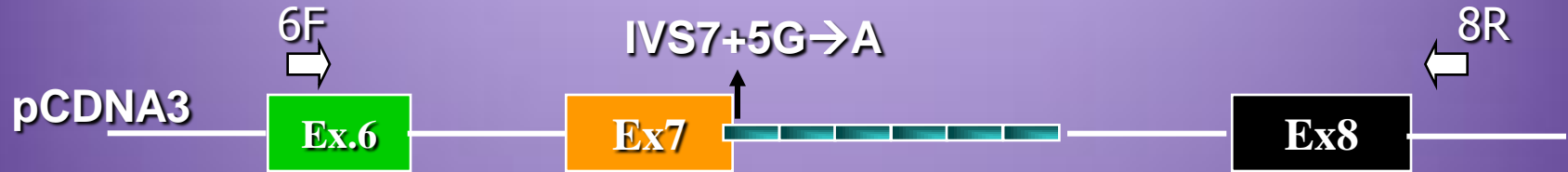
Wt



RT-PCR 6F-8R

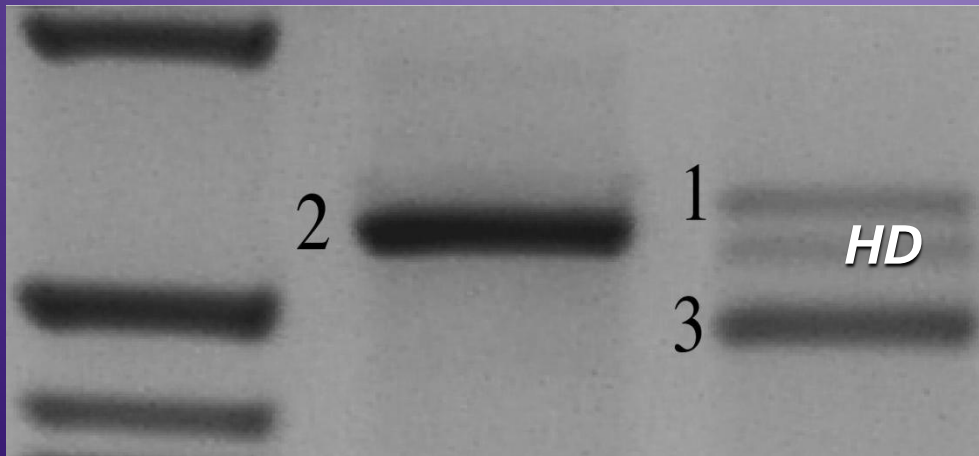
2 Ex.6 Ex.7 Ex.8 600 bp

EFFETTI DELLA MUTAZIONE IVS7+5G/A SUL PROCESSAMENTO DELL'mRNA:

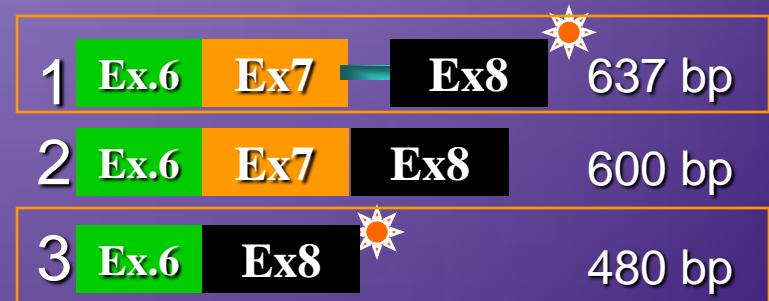


Wt

IVS7+5A

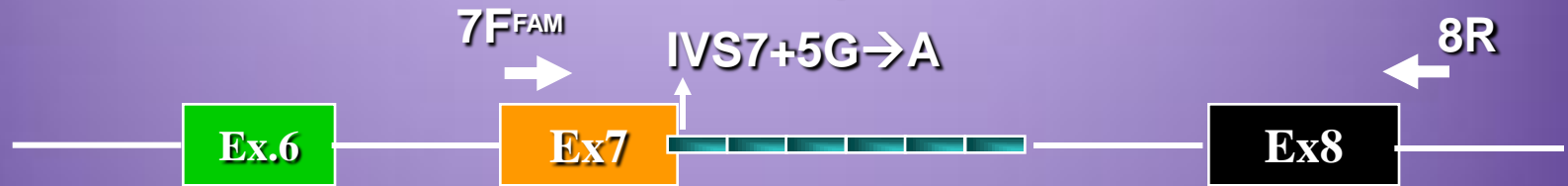


RT-PCR 6F-8R

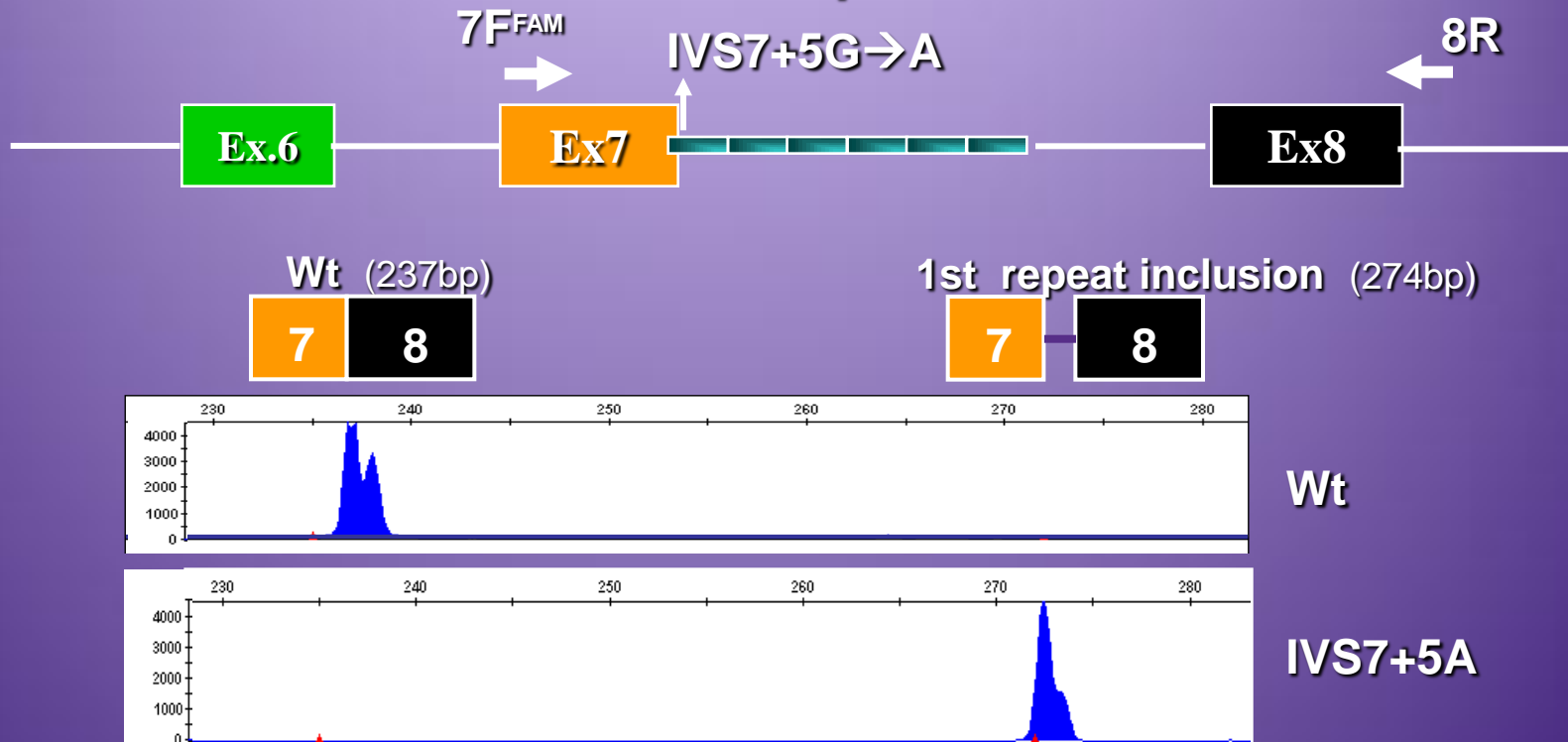


☀️ provoca frameshift e
prematura terminazione della traduzione

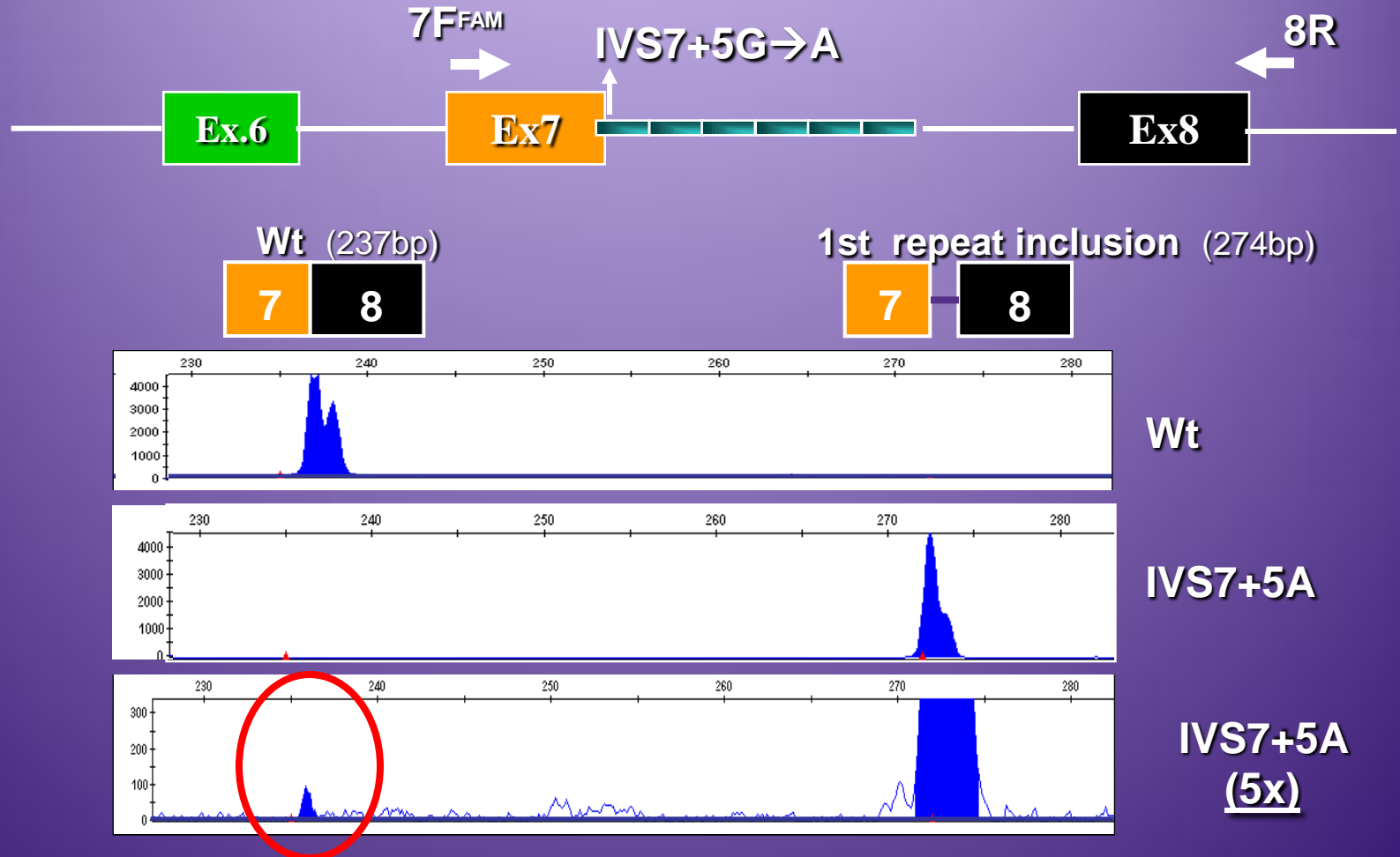
La presenza di trascritti correttamente processati è stata evidenziata attraverso marcatura con primer fluorescenti ed elettroforesi capillare



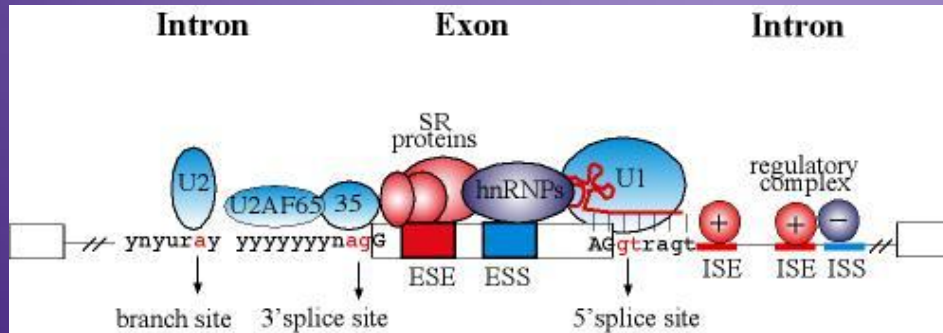
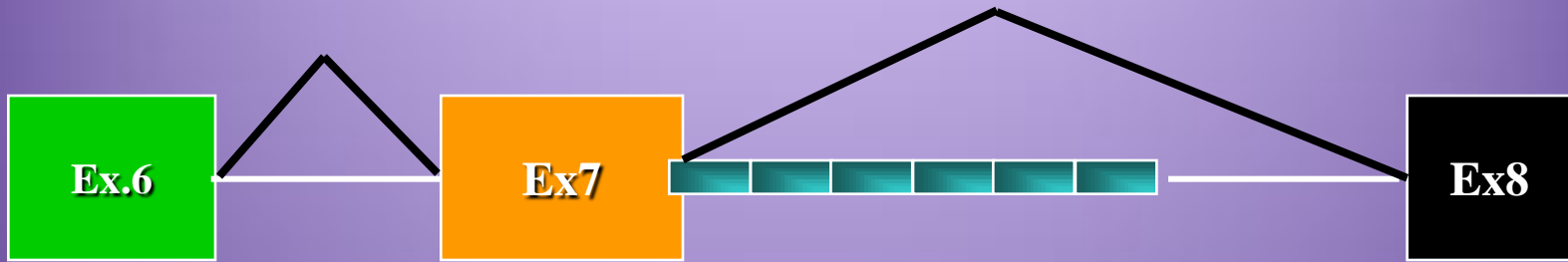
La presenza di trascritti correttamente processati è stata evidenziata attraverso marcatura con primer fluorescenti ed elettroforesi capillare

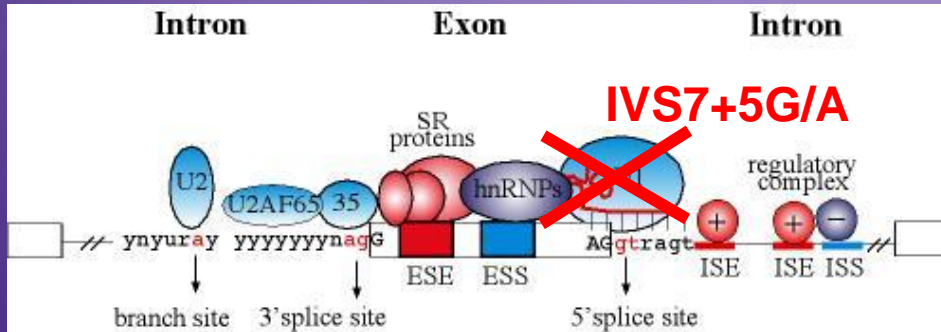
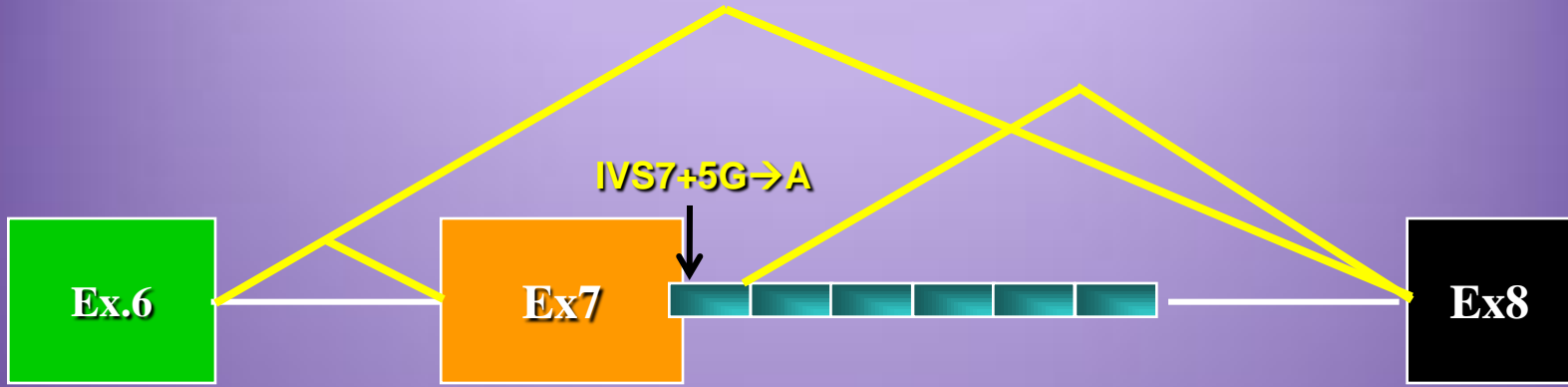


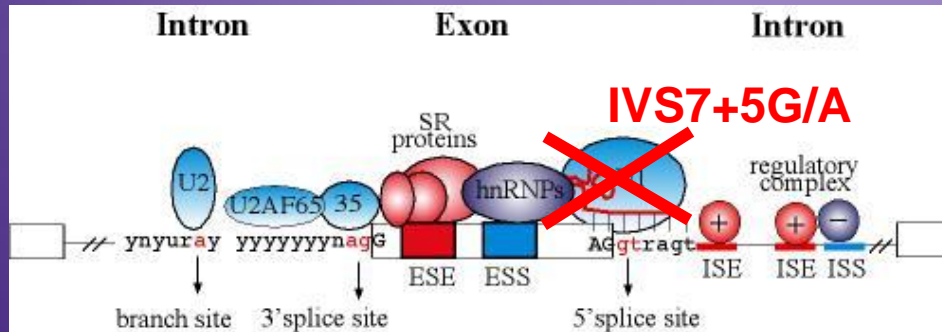
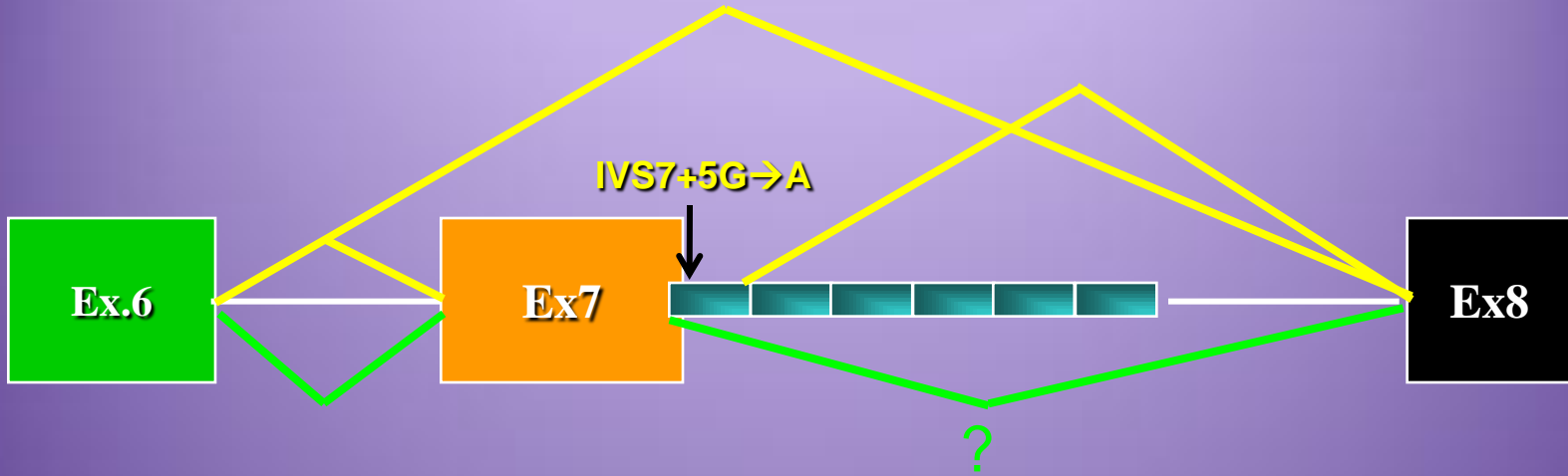
La presenza di trascritti correttamente processati è stata evidenziata attraverso marcatura con primer fluorescenti ed elettroforesi capillare



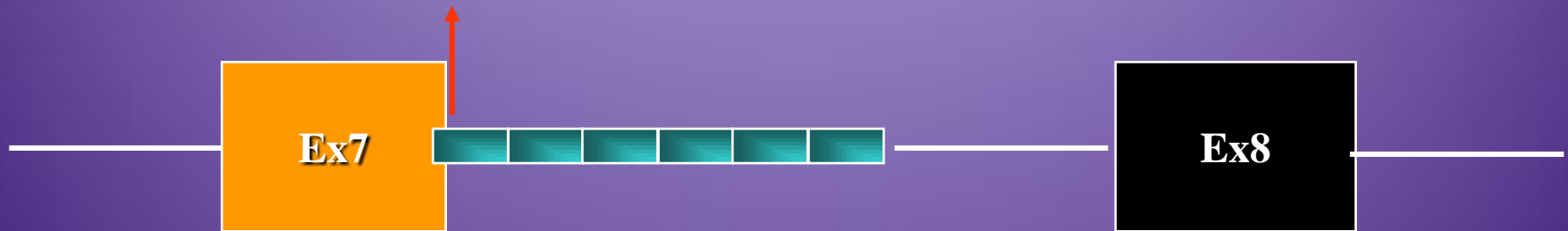
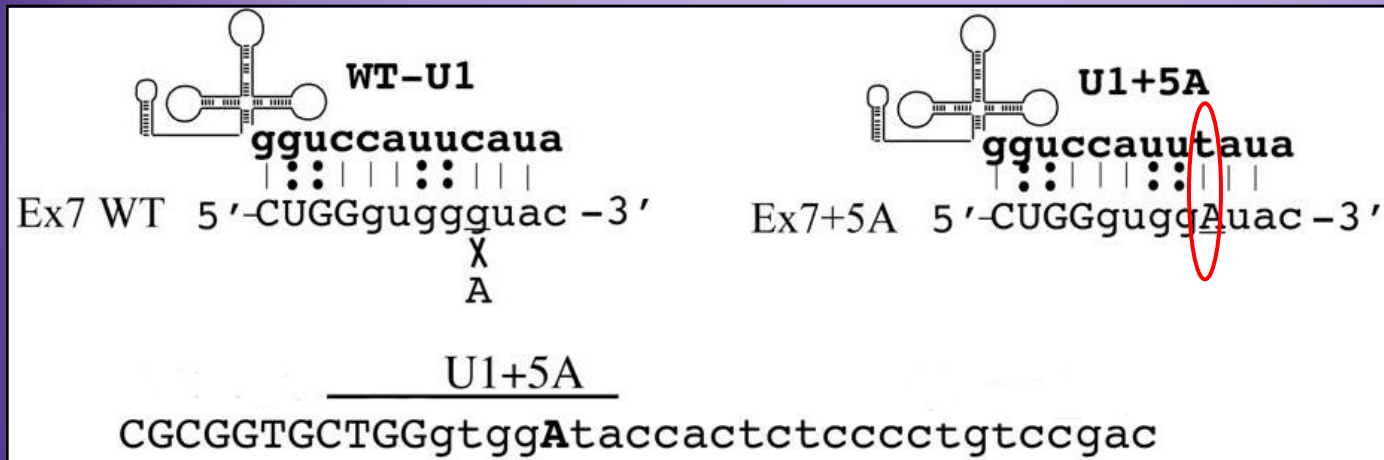
La mutazione sembra essere compatibile con la presenza di un messaggero normale (0.2%)





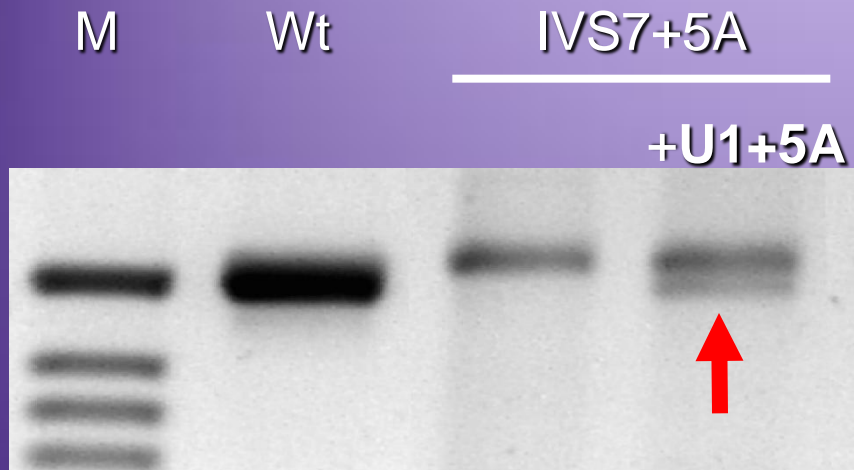


L'utilizzo di una snRNA-U1 modificata può ripristinare il corretto splicing del messaggero?



Costruzione di un vettore di espressione per la U1snRNA modificata appositamente per riconoscere il mutato 5'ss

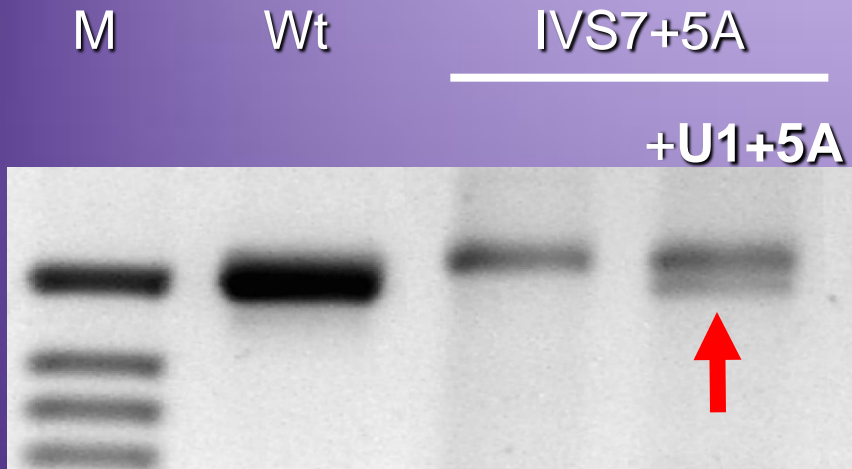
Ripristino parziale dello SPLICING mediante snU1+5A



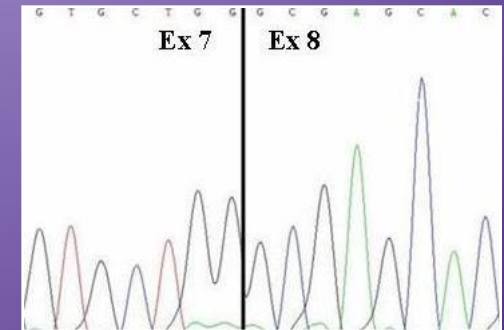
RT-PCR 7F-8R



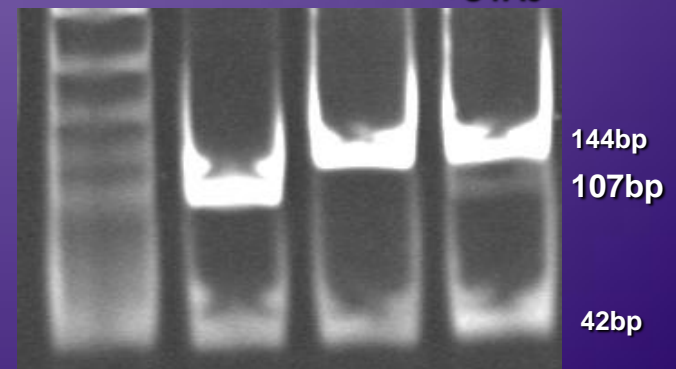
Ripristino parziale dello SPLICING mediante snU1+5A



RT-PCR 7F-8R



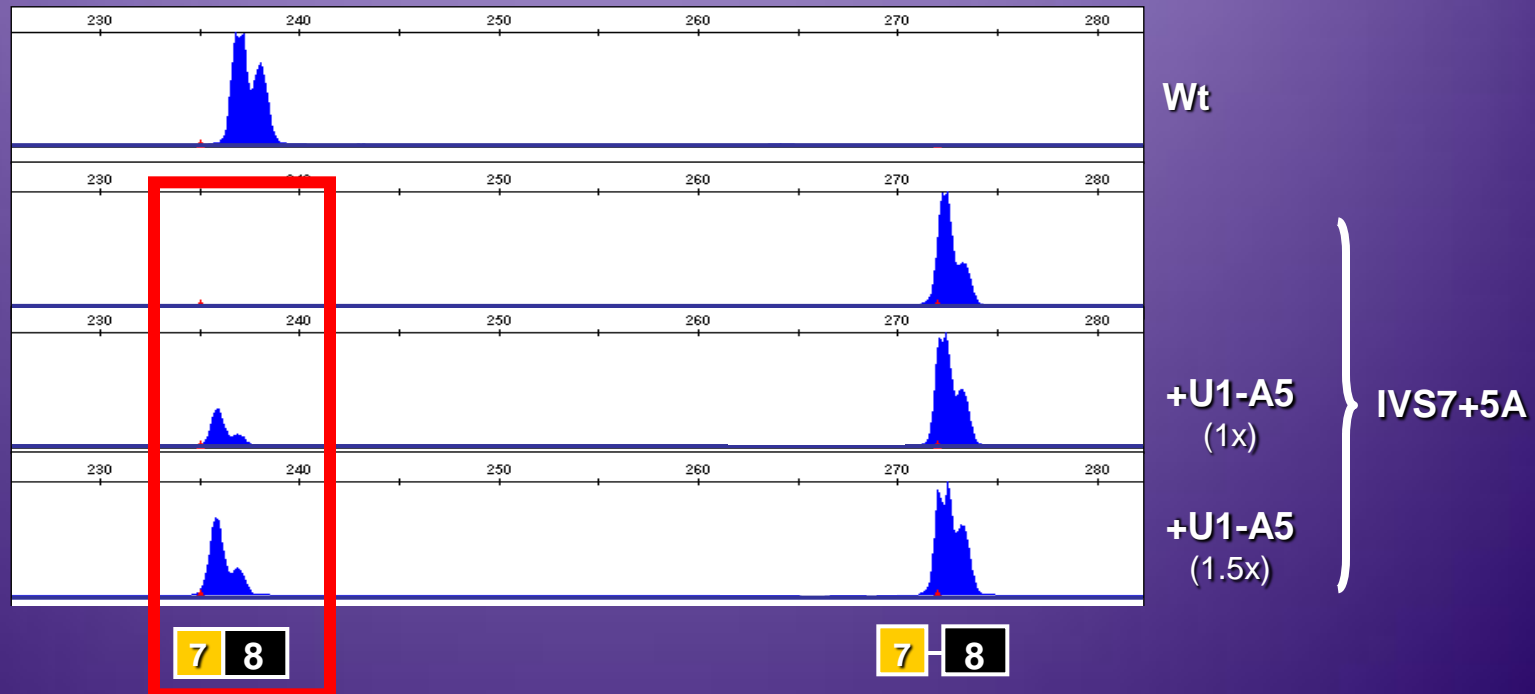
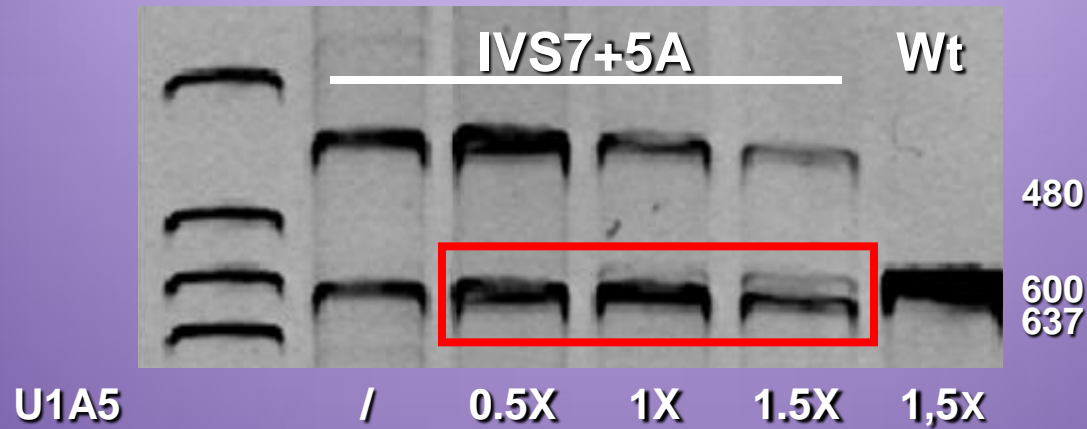
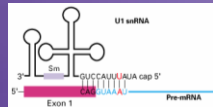
M Wt IVS7+5A +U1A5



Il sequenziamento e la digestione enzimatica confermano la presenza del trascritto corretto in seguito a trattamento con U1+5A



Ripristino mediato dall' U1-A5 è dose dipendente



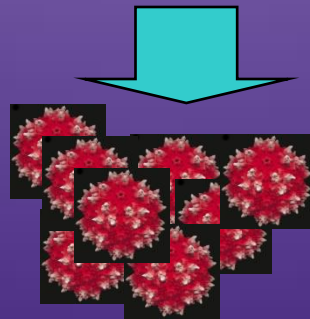
In seguito a trattamento con U1A5 compare un messaggero normale ($53 \pm 5\%$ della forma aberrante), in relazione dose-risposta alla quantità di U1A5 aggiunta.

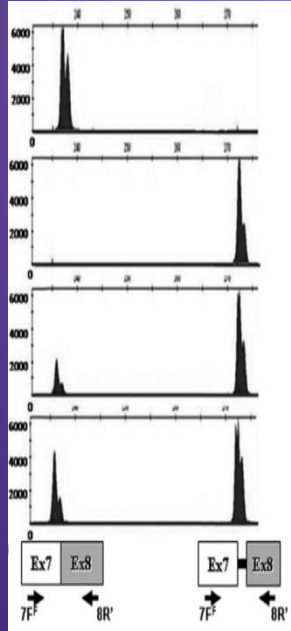
CONCLUSIONI

- La strategia dei minigeni e l'utilizzo dell' U1snRNAs spiegano i meccanismi che stanno alla base della deficienza severa di FVII.
- La mutazione FVII Lazio è associata a livelli residui di messaggero Wt, ciò potrebbe spiegare la sopravvivenza dei pazienti omozigoti per la mutazione
- L' utilizzo di una U1 modificata è in grado di ripristinare parzialmente, ed in modo dose dipendente, il corretto processamento del messaggero del FVII. L'efficienza di correzione (15%) sarebbe superiore alla soglia terapeutica.
- Le U1snRNAs modificate possono rappresentare un approccio terapeutico mutazione-specifico nella deficienza di FVII così come per altre patologie causate da mutazioni di splicing.**

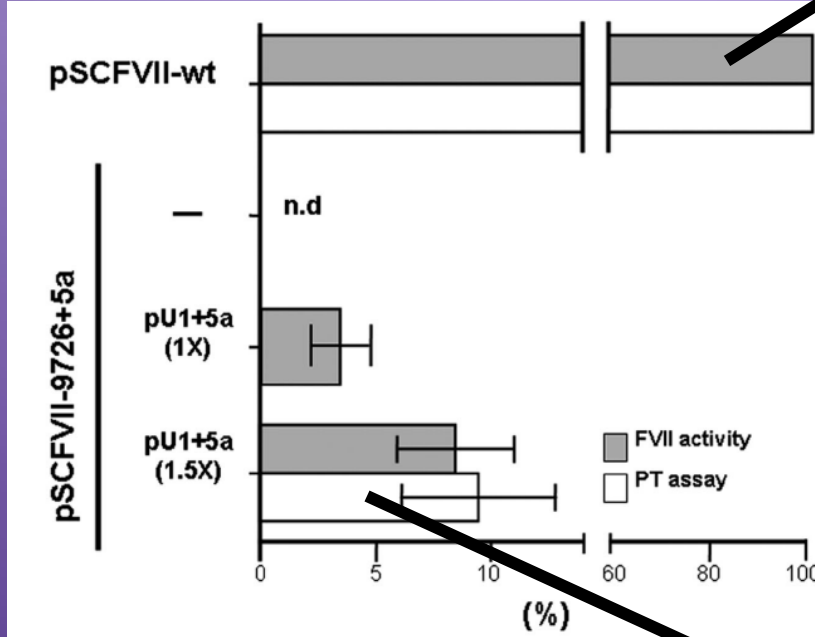
CONCLUSIONI

- La strategia dei minigeni e l'utilizzo dell' U1snRNAs spiegano i meccanismi che stanno alla base della deficienza severa di FVII.
- La mutazione FVII Lazio è associata a livelli residui di messaggero Wt, ciò potrebbe spiegare la sopravvivenza dei pazienti omozigoti per la mutazione
- L' utilizzo di una U1 modificata è in grado di ripristinare parzialmente, ed in modo dose dipendente, il corretto processamento del messaggero del FVII. L'efficienza di correzione (15%) sarebbe superiore alla soglia terapeutica.
- Le U1snRNAs modificate possono rappresentare un approccio terapeutico mutazione-specifico nella deficienza di FVII così come per altre patologie causate da mutazioni di splicing.**



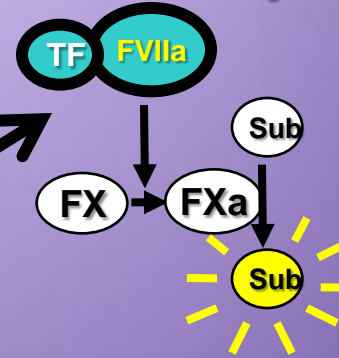


Confermati i dati precedentemente ottenuti



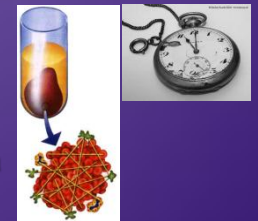
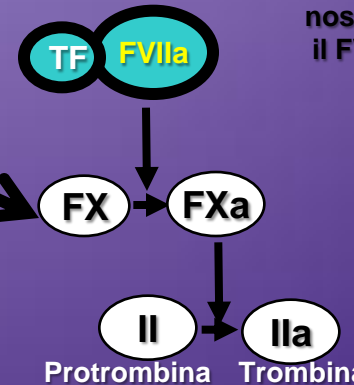
FVII assay

Misurazione indiretta dell'attività del FVII



PT assay

Misura in quanto tempo si forma il coagulo in un plasma privo di FVII a cui è stato addizionato il nostro campione contenente il FVII



La correzione mediante U1+5a avviene anche a **livello proteico**