

GIUSEPPE MACINO*

Silenziamento genico, da un fenomeno inizialmente incomprensibile al premio Nobel 2006**

Introduzione

La storia del silenziamento genico iniziò nei primi anni Novanta del secolo scorso, quasi per caso. Con l'avvento della Tecnologia del DNA Ricombinante e della Ingegneria Genetica, la manipolazione del DNA di organismi modello nei laboratori di ricerca divenne una pratica comune. Nonostante si fosse ancora lontani dal sequenziamento di interi genomi e dalla approfondita conoscenza della funzione dei geni, molti laboratori iniziarono a sfruttare questa tecnologia per introdurre artificialmente sequenze di DNA nel genoma di organismi modello. In particolare, un approccio che fu applicato in diversi organismi modello (lieviti, muffe, piante) fu quello di introdurre copie in soprannumero (transgeni) di geni già presenti nel genoma. Un tale approccio aveva lo scopo di rendere più evidenti tratti fenotipici di questo o quell'organismo, per fini di ricerca scientifica o con scopi tecnologici o commerciali (produzione di fiori più colorati, incremento della produzione di molecole di interesse farmacologico o commerciale, produzione di peptidi ricombinanti).

Tra gli altri esperimenti si tentò di esprimere in modo massiccio l'enzima chalcone sintetasi, necessario per la sintesi degli antociani, responsabili della pigmentazione dei fiori nella petunia. Il risultato ottenuto fu esattamente opposto all'atteso: invece di fiori più colorati si ottennero piante con fiori bianchi [1]. Un evento tanto inatteso tuttavia non era destinato a rimanere una pura curiosità, ma fu presto affiancato da un fenomeno analogo osservato presso il nostro laboratorio all'Uni-

^{*} Socio XL. Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sapienza Università di Roma. E-mail: macino@bce.uniroma1.it

^{**} Prolusione tenuta durante l'Assemblea dei Soci del 10 dicembre 2009, presso la Biblioteca dell'Accademia.

versità «La Sapienza» di Roma nella muffa *Neurospora crassa*. In quel periodo stavamo studiando la sintesi dei carotenoidi nella muffa. Tentammo di ottenere, con tecniche di ingegneria genetica, una maggiore produzione di queste molecole attraverso l'introduzione di un maggior numero di copie dei geni codificanti per gli enzimi necessari alla loro sintesi. Questo progetto nasceva dal fatto che il b-carotene ha importanti applicazioni sia mediche, come farmaco antitumorale, che industriali, come colorante dei cibi.

Il risultato ottenuto fu, come nel caso della petunia, l'esatto opposto di quello atteso. I ceppi transgenici di *Neurospora crassa*, sebbene contengano molte copie del gene necessario alla sintesi dei carotenoidi, non producono carotenoidi [2]. In qualche modo la *Neurospora crassa* percepisce che del DNA esogeno si è integrato nel suo genoma e innesca un meccanismo capace di inattivare il DNA invasore; tuttavia, anche il gene endogeno, identico alla sequenza introdotta artificialmente, è inattivato. Questo fenomeno fu successivamente chiamato silenziamento genico, ad indicare che nonostante il gene endogeno sia presente e intatto nel genoma, il fenotipo dei ceppi «silenziati» per un dato gene è indistinguibile da quello di ceppi che abbiano perduto il gene.

Il silenziamento genico è altamente specifico: solamente il DNA transgenico e quello cellulare a sequenza corrispondente sono silenziati. Il silenziamento indotto da un transgene avviene con un processo successivo alla sua trascrizione in RNA. L'RNA transgenico, così come quello endogeno, sono trascritti; tuttavia non si accumulano ma sono invece rapidamente degradati. Il meccanismo quindi è in grado di riconoscere sequenze specifiche ed agire solamente su di esse.

Nel frattempo il fenomeno fu osservato anche in altre piante nelle quali si tentava di introdurre geni usando vettori transgenici ottenuti attraverso la manipolazione di un particolare tipo di virus. Ci si accorse che le piante trattate diventavano resistenti all'infezione di quel tipo di virus ma non di altri [3]. Di nuovo un organismo mostrava la capacità di riconoscere sequenze di DNA specifiche e di inattivarle.

Gli studi proseguirono a lungo sulle piante e in *Neurospora crassa*, con l'isolamento di ceppi mutanti incapaci di effettuare il silenzamento genico e successivamente l'identificazione dei geni necessari per tale meccanismo. Solo successivamente si scoprì che anche gli animali possiedono un meccanismo simile. Fu allora che l'attenzione del mondo scientifico ed industriale divenne massima.

Fire e Mello nel loro laboratorio a Baltimora studiavano lo sviluppo del nematode C. elegans cercando di inibire l'azione di geni specifici attraverso l'uso di RNA antisenso (ovvero RNA complementari all'RNA messaggero). Questa tecnica era nota da tempo, anche se l'esatto meccanismo attraverso cui agisse un RNA antisenso era sconosciuto. Fire e Mello apportarono alcune modifiche al protocollo, producendo un risultato eccezionale. Invece di usare l'RNA antisenso da solo i due ricercatori lo mescolarono con RNA complementare (cosiddetto di senso) creando una molecola di RNA a doppio filamento. Questa molecola mostrò di avere un'attività silenziante molto maggiore di quella dell' RNA antisenso da solo. Avevano

scoperto l'RNA interference (RNAi). Il loro lavoro fu pubblicato su Nature nel 1998 [4] e fu così importante da meritare il Premio Nobel 2006 per la Medicina. In breve questa scoperta venne accettata da tutti e rese il silenziamento genico molto popolare tra i ricercatori. Alla fine dell'anno 2000, venne pubblicato un lavoro in cui per la prima volta si riusciva a silenziare un gene in un embrione di topo alle primissime fasi dello sviluppo [5]. Questo esperimento dimostrò che i mammiferi, e quindi anche l'uomo, posseggono il meccanismo di silenziamento genico indotto da RNA a doppia elica e rappresentò una tappa storica. Sarà ricordato come l'esperimento che ha aperto la strada ad applicazioni terapeutiche sull'uomo con la tecnologia dell'interferenza da RNA a doppia elica.

Il ruolo dell'RNAi

Oggi sappiamo che l'RNAi è un fenomeno analogo a quello osservato nelle piante e nelle muffe. La sua conservazione evolutiva dimostra che è un meccanismo molto antico che si è mantenuto fino ai nostri giorni. Sebbene esistano piccole varianti il meccanismo è basato sulla capacità delle cellule eucariotiche di riconoscere molecole di RNA a doppia elica come molecole estranee.

Quale può essere la funzione naturale di questo meccanismo?

Le sequenze dei genomi ci hanno rivelato che il numero dei geni presenti in organismi semplici come i lieviti, le muffe, il moscerino della frutta Drosophila melanogaster, il nematode Caenorhabditis elegans e i mammiferi, tra cui l'uomo non è molto diverso e va dai 14000 geni della Drosophila ai 20-25000 geni per l'uomo. La sequenza dei genomi ci ha rivelato inoltre che solo il 3% del genoma dell'uomo contiene l'informazione genetica per tutte le proteine umane e che il restante 97% è formato da DNA ripetitivo e da DNA di origine virale o trasposonica. È noto che questi elementi hanno l'abilità di moltiplicarsi ed espandersi nei genomi producendo un aumento delle dimensioni del genoma stesso. Molti trasposoni e virus hanno come intermedio obbligato di replicazione una molecola di RNA a doppia elica. È ormai dimostrato che il meccanismo dell'RNAi si è sviluppato come meccanismo di difesa per proteggere il genoma dall'eccessiva espansione di elementi invasori [6, 7, 8].

Il meccanismo dell'RNAi

Oggi sappiamo molto sul funzionamento dell'RNAi attraverso gli studi condotti sia sulla *Neurospora crassa* che su piante ed animali. I primi studi portarono all' individuazione di due famiglie di proteine coinvolte nel processo: le RNA Polimerasi RNA dipendenti e la famiglia Argonauta. Mentre le prime generano le molecole di RNA a doppio filamento partendo da RNA bersaglio, le seconde sono richieste per il silenziamento post-trascrizionale in tutti gli organismi studiati.

Inoltre, Andrew Hamilton al John Innes Center lavorando sulle piante di

tabacco scoprì che gli RNA transgenici che si accumulavano negli organismi silenziati sono degradati a frammenti di dimensioni ridottissime, circa 23-25 nucleotidi, e che erano presenti sia nella sequenza di senso che di antisenso [9].

Questo dato confermava i nostri dati ricavati dallo studio della Neurospora crassa sull'accumulo di RNA transgenico ma metteva in evidenza la caratteristica ridottissima dimensione di queste molecole che è diventata il tratto più importante per comprendere la funzione dl silenziamento genico nelle cellule eucariotiche. Subito dopo Greg Hannon nel laboratorio del Cold Spring Harbor scoprì un enzima che era capace di tagliare RNA a doppia elica in frammenti da 21-23 coppie di basi e lo chiamò dicer [10].

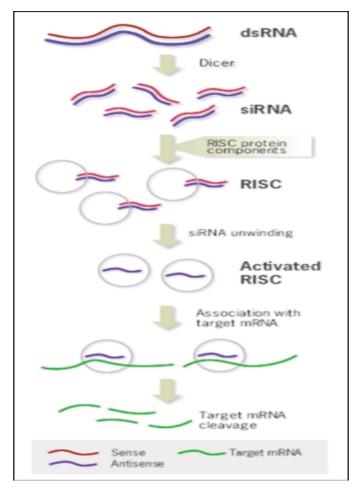
Le molecole di RNA a doppio filamento sono al centro del meccanismo di silenziamento. In piante e in funghi, oltre che essere generate come intermedi di replicazione di virus e trasposoni, possono essere prodotte da enzimi del tipo RNA polimerasi RNA dipendente, in seguito a segnali cellulari non ancora completamente compresi. Gli RNA a doppio filamento sono riconosciuti specificamente da Dicer che li taglia in frammenti da 21 coppie di basi. Da ogni molecola a doppio filamento si ottengono centinaia di siRNA. Queste molecole da 21 nucleotidi non hanno di per se capacità di degradare sequenze omologhe ma sono incorporate in un complesso proteico detto RISC (RNA Induced Silencing Complex o complesso del silenziamento indotto da RNA) che svolge diverse attività enzimatiche [11].

Gli siRNA nel complesso RISC sono associati ad una proteina della famiglia Argonauta in un solco della proteina stessa. In questo solco avviene il riconoscimento di molecole di RNA bersaglio con il frammento di siRNA. La proteina Argonauta stessa possiede una attività nucleasica che taglia l'RNA appaiato. Da notare che viene tagliato solamente l'RNA bersaglio mentre il siRNA rimane intatto e può essere utilizzato di nuovo per il riconoscimento di altre molecole.

Ora che conosciamo con quale meccanismo avviene la distruzione dell'RNA invasore possiamo spiegare anche la grandissima specificità del silenziamento. Le molecole effettrici del silenziamento sono gli siRNA. La loro sequenza è sufficientemente lunga da permettere appaiamenti altamente specifici, infatti 21 nucleotidi rappresentano una sequenza unica in una sequenza casuale di quattro miliardi di nucleotidi. Questo spiega il perchè della alta specificità del meccanismo di silenziamento.

Il meccanismo sin qui descritto agisce su RNA che sono stati già trascritti. Tuttavia è stato dimostrato che un meccanismo simile agisce anche per reprimere la trascrizione di particolari loci genomici. Questi studi sono stati condotti inizialmente nelle cellule di lievito S. pombe [13]. In questo organismo, ma non solo, i centromeri dei cromosomi (regioni a cui aderisce il fuso per la segregazione dei cromosomi durante la mitosi) non vengono trascritti ed hanno una struttura della cromatina molto compatta (eterocromatina).

Si è visto che il complesso proteico contenente gli siRNA è localizzato anche nel nucleo e che per il corretto funzionamento dei centromeri durante la mitosi sono necessarie le stesse proteine richieste per il silenziamento post trascrizionale, come la RNA polimerasi RNA dipendente e l'enzima dicer.



Modello schematico del silenziamento genico.

Questi studi suggeriscono che gli siRNA possano essere coinvolti nel processo di formazione della eterocromatina. Studi successivi hanno effettivamente dimostrato che nella cellula sono presenti piccoli RNA corrispondenti alle sequenze nucleotidiche dei centromeri e che il complesso proteico contenente i piccoli RNA è localizzato sulle sequenze eterocromatiche. Oggi si ritiene che i piccoli RNA funzionino da guida per il riconoscimento di sequenze di DNA che devono essere trascrizionalmente silenziate (eterocromatina) [14].

Studi ulteriori su piante hanno dimostrato che questo meccanismo è utilizzato dalle piante per modificare chimicamente il DNA attraverso la metilazione nelle regioni che non devono essere trascritte nell'adulto (per esempio geni embrionali) o durante lo sviluppo. Inoltre si è potuto dimostrare che i trasposoni e le sequenze

dei virus integrati nel genoma sono metilati come meccanismo di difesa che riesce a silenziare in questo modo specificamente questi elementi tendenzialmete pericolosi e mutageni. Successivamente le regioni della cromatina contenenti il DNA metilato vengono rese più compatte e trasformate in eterocromatina determinandone un silenziamento ancora più efficiente.

L'importanza dell'RNAi nella ricerca scientifica

La tecnologia genomica degli anni novanta ha permesso di conoscere la sequenza del genoma di moltissime specie ma non la funzione della maggior parte dei geni di ogni organismo. Uno degli approcci più informativi che vengono usati per avere un'idea del ruolo di un dato gene consiste nell'inattivare il gene in esame e poi analizzarne le conseguenze a livello fenotipico. Ad esempio, l'inattivazione di un dato gene di pianta che determina un difetto nella formazione delle foglie è rivelatore che una delle funzioni del gene in esame è legata al differenziamento di quest'organo. Una delle tecniche di inattivazione genica più diffuse prima dell'avvento dell'RNAi consiste nel rimpiazzare la sequenza del gene con altro DNA e conseguentemente di inibire la funzionalità del gene stesso. Sebbene questo approccio sia molto efficace, una delle controindicazioni è quella che, specialmente in organismi complessi, questa tecnica risulta costosa e piuttosto complicata. L'RNAi invece, permette di silenziare un qualsivoglia gene in tutti gli organismi e di scoprire quale funzione il gene silenziato possa avere in modo molto facile. Infatti pochi mesi dopo la scoperta dell'RNAi fu possibile silenziare tutti i 18000 geni del nematode C. elegans e acquisire molte informazioni sulla loro funzione. Un progetto di questa portata sarebbe stato impensabile prima della scoperta dell'RNAi.

Uno strumento per lo studio del genoma

Come già ricordato, pochi mesi dopo la pubblicazione del lavoro di Fire e Mello, vennero pubblicati lavori in cui si riportava che tutti i geni del genoma di C. elegans erano stati silenziati. Una importante svolta nella possibilità dell'utilizzo dell'RNAi nei mammiferi è venuta dall'osservazione che introducendo in una cellula direttamente i prodotti dell'enzima DICER cioè i siRNA, si induce il silenziamento sequenza specifico.

Questa iniziale osservazione ha quindi aperto la strada per l'uso dei siRNA come strumento standard nella biologia molecolare. I siRNA possono essere introdotti in cellule di mammifero in coltura o in pianta usando delle tecniche di trasfezione. L'efficienza e la durata dell'effetto di silenziamento dipendono da una serie di parametri che vanno dalla tecnica di trasfezione utilizzata, al tipo di cellula usato come recipiente, dalla quantità di siRNA che effettivamente entra nella cellula, al livello di espressione del gene bersaglio. La principale limitazione di questo approccio è che l'effetto del silenziamento è transiente. Questo come conseguenza sia del

fatto che i siRNA hanno una vita media limitata all'interno di una cellula, sia dell'effetto di diluizione dei siRNA quando le cellule si replicano. Inoltre, è difficile immaginare di estendere questo sistema, studiato e sperimentato su colture cellulari direttamente sull'animale.

Un metodo alternativo di introduzione dei siRNA nelle cellule si basa sull'idea di mimare le modalità di espressione e processamento dei miRNA (vedi paragrafo successivo). I miRNA sono funzionalmente equivalenti ai siRNA in quanto sono incorporati negli stessi complessi RISC e possono indurre la degradazione del mRNA bersaglio qualora abbiano una sequenza perfettamente complementare. Sono stati prodotti, a questo proposito, dei vettori transgenici a DNA in grado di esprimere, una volta introdotti nelle cellule, una piccola molecola di RNA a forcella (shRNA, short hairpin RNA) in qualche modo simile al precursore di un miRNA, che riesce ad essere processata da DICER e a dare un siRNA come prodotto finale. Questo sistema offre importanti vantaggi rispetto alla trasfezione di molecole di siRNA. Non solo i metodi di introduzione nelle cellule di DNA rispetto alla trasfezione di RNA sono molto più flessibili ed efficienti, ma possono, essere usati vettori retrovirali che hanno una grandissima efficienza di trasferimento del DNA esogeno e che sono in grado di essere integrati in modo stabile nel genoma permettendo di ottenere un silenziamento sostenuto nel tempo. Inoltre, vettori che esprimono shRNA sono stati usati per creare piante ed animali transgenici in cui un dato gene può essere silenziato in modo inducibile o tessuto specifico.

I micro-RNA

Mutazioni che colpiscono funzioni dell'apparato di silenziamento genico nelle piante le rendono più sensibili alle infezioni virali ed alla espansione dei trasposoni indicando che una delle funzioni naturali di questo meccanismo è la difesa del genoma. Ma recentemente si è scoperto che questo meccanismo è coinvolto anche nella regolazione dell'espressione dei geni cellulari e di conseguenza in tutti i processi cellulari più importanti sia nelle piante che negli animali.

Furono inizialmente isolati due piccoli RNA codificati da due geni cellulari nel nematode C.elegans [15]. Questi due piccoli RNA da 23 nucleotidi sono coinvolti in processi di regolazione dell'espressione genica durante lo sviluppo. La loro ridottissima dimensione suggerì che potessero essere prodotti con un meccanismo simile a quello usato per produrre gli siRNA. Infatti fu possibile dimostrare che sono prodotti dall'enzima Dicer, lo stesso che produce gli siRNA, a partire da un RNA cellulare con una struttura a parziale doppia elica. Nelle piante si era osservato che mutazioni a carico di Dicer producevano un fenotipo con profonde alterazione nello sviluppo dei fiori. Queste due osservazioni suggerirono un ruolo molto importante per i piccoli RNA endogeni che vennero chiamati microRNA (miRNA).

Presto si trovò il modo di clonarli e sequenziarli. Si scoprì che sono presenti sia nelle piante che negli animali, anche nei mammiferi come l'uomo. Attualmente il loro numero è molto grande. Nell'uomo ne sono stati trovati 500 diversi ed il loro numero è destinato ad aumentare. Molti miRNA sono conservati evolutivamente tra specie anche lontane, con la stessa sequenza e talvolta con gli stessi RNA bersaglio.

Nonostante le modalità di produzione siano simili a quelle descritte per gli siRNA il meccanismo di azione dei miRNA è diverso. Mentre gli siRNA sono utilizzati per degradare gli RNA bersaglio che hanno una sequenza perfettamente complementare, i miRNA invece si legano ad RNA che hanno una parziale complementarietà formando quindi un doppio filamento imperfetto. In questo caso, negli animali, la capacità della proteina Argonauta di idrolizzare l'RNA bersaglio non viene attivata. Si ottiene invece il blocco della sintesi della traduzione del messaggio in proteina. Le due classi di piccoli RNA quindi producono lo stesso effetto, la mancata sintesi della proteina codificata dall'RNA ma con meccanismi diversi [16].

Con grande sorpresa è stato sperimentalmente verificato che il numero di nucleotidi dei miRNA che devono essere perfettamente complementari ad una sequenza bersaglio sono molto pochi. Solamente 7 o 8 localizzati alla estremità 5' del miRNA. Naturalmente questo fa aumentare grandemente il numero dei possibili RNA bersaglio e calcoli conservativi propongono mediamente circa duecento bersagli per ogni miRNA [17].

Naturalmente più microRNA possono avere bersagli in comune. Nonostante questa molteplicità il numero di RNA che possono essere riconosciuti da miRNA corrisponde a circa la metà dei geni di un organismo. Questa ipotesi, che comincia ad essere verificata sperimentalmente, cambia completamente le nostre idee sulla regolazione dell'espressione dei geni negli eucarioti.

La ragione per cui la scoperta di regolatori tanto importanti del metabolismo cellulare è stata così tardiva risiede nella ridottissima dimensione dei microRNA. Si è infatti trovato che molti di loro sono codificati in regioni intergeniche (ovvero tra un gene e l'altro) ma circa il 25% sono presenti in Introni (ovvero in regioni dei geni che vengono rimosse dall'RNA dopo la trascrizione per la produzione di RNA messaggeri maturi). Alcuni miRNA sono conservati non solamente come sequenza ma addirittura come localizzazione genomica. Per esempio il miR-7 è codificato dallo stesso introne nello stesso gene l'hnRNP K (coinvolto in alcuni tipi di cancro) sia nell'uomo che nella mosca *D. melanogaster*.

I geni bersaglio dei microRNA negli animali sono coinvolti in tutti i processi cellulari fondamentali come la proliferazione cellulare, il differenziamento neuronale nel midollo spinale, la morte cellulare programmata, lo sviluppo, l'ematopoiesi e la secrezione dell'insulina nel pancreas. Nelle piante i geni bersaglio dei miRNA sono in generale le proteine regolatrici come i fattori trascrizionali dimostrando il ruolo regolatorio centrale dei miRNA. Quasi tutti i fattori trascrizionali regolati dai miRNA sono coinvolti nello sviluppo della pianta e nella identità cellulare delle cellule staminali.

Per poter svolgere tali e tante funzioni diverse i miRNA devono essere accuratamente regolati. Da una analisi della loro presenza in diversi tessuti umani ci si è

accorti che molti miRNA sono espressi in alcuni tessuti e non in altri ed in alcuni casi solamente in un tessuto. Per esempio il miR-1 è presente solamente nel muscolo cardiaco, il miR-122 solamente nel fegato, il miR-124 nel cervello, il miR-7 nella ghiandola pituitaria, il miR-142 nei linfociti.

La loro espressione è strettamente regolata anche durante lo sviluppo e, come dimostrato in Zebrafish, sono espressi in momenti diversi nei diversi stadi dello sviluppo. Infine mentre alcuni sono presenti in piccole quantità altri sono piuttosto abbondanti.

Molti studi saranno necessari per comprendere la loro funzione generale ma alcuni esperimenti hanno lasciato intravedere quali possano essere le loro funzioni sulla regolazione della espressione dei geni nei vari tipi cellulari. Si è visto, per esempio, che la espressione forzata di un miRNA in cellule in coltura fa cambiare l'espressione di molti geni, circa un migliaio [18]. Nelle piante il risultato della espressione forzata di miRNA è ancor più evidente. Le piante transgeniche mostrano dei fenotipi aberranti molto evidenti che vanno dalla mancata dominanza apicale, all'aumento del numero delle foglie, alla non corretta morfologia delle foglie alla mancata separazione degli stami, dalla ridotta altezza della pianta, alla ridotta fertilità.

Nelle stesse cellule l'espressione forzata di un microRNA diverso fa cambiare l'espressione di molti altri geni diversi. Sembra quindi che ci siano delle risposte cellulari diverse a seconda del tipo di microRNA che viene espresso nelle cellule.

Come e quando sono apparsi i micro RNA durante l'evoluzione?

Utilizzando un punto di vista evolutivo si capisce che l'apparsa dei miRNA è stata una facile invenzione con profonde implicazioni sul funzionamento cellulare. La loro piccola dimensione e la semplicità dei loro geni (in fondo bastano pochi nucleotidi organizzati in una sequenza palindromica che viene maturata dalle RNAsi di tipo III come Drosca e Dicer) suggerisce che possano essere sorti in modo relativamente facile nei genomi degli animali e delle piante (apparentemente sono assenti nei batteri). Ma quando sono apparsi i miRNA? Si può identificare un antenato comune alle piante ed agli animali in cui sono già presenti i miRNA? Osservando la modalità di funzionamento dei miRNA in pianta ed in animali si notano grandi differenze sia per quanto riguarda le modalità di funzionamento che la loro biogenesi lasciando ipotizzare che possano essere apparsi almeno due volte durante l'evoluzione.

La loro apparsa indipendente si evince inoltre dalla grande differenza tra le famiglie di miRNA e dalla mancanza di sovrapposizioni nella sequenza dei miRNA degli animali e delle piante.

Piccoli cambiamenti di sequenza nella porzione chiamata «nucleo» del miRNA può cambiare drasticamente il repertorio dei loro geni bersaglio. In parallelo singoli geni per proteine possono diventare bersaglio di miRNA con piccoli cambiamenti

nella sequenza del DNA corrispondente alla regione del 3' non tradotto. Singoli miRNA possono quindi regolare centinaia di geni e l'effetto combinatorio di più miRNA può regolare migliaia di geni. Il controllo contemporaneo di così tanti geni potrebbe essere indispensabile per il mantenimento dell'identità di ogni tipo cellulare e per il loro differenziamento. Inoltre la presenza dei miRNA con il loro effetto di repressione potrebbe servire per ridurre le fluttuazione dei livelli di espressione dei geni determinando una maggiore stabilità del livello delle proteine che potrebbe essere necessario per mantenere le cellule nello stato differenziato.

Due dati corroborano questa ipotesi. Primo i geni che non necessitano di regolazione, come i geni house keeping espressi in tutte le cellule per la loro funzione basilare ed indispensabile, hanno una sequenza al 3' non tradotto molto corta e praticamente priva di siti di riconoscimento per miRNA. Invece i geni specifici per i vari tipi cellulari hanno una sequenza al 3' non tradotto molto più lunga e posseggono molti siti di legame per miRNA. Tra tutti spiccano i geni che sono espressi nel cervello che hanno una sequenza al 3' non tradotta molto più lunga della media con un numero di siti per miRNA ancora maggiore. Il secondo punto deriva da uno studio bioinformatico che ha confrontato il livello di espressione di ciascuno di 19000 geni umani in 79 tessuti e tipi cellulari diversi per verificare se la presenza di miRNA specifici per i vari tipi cellulari determinava un livello di espressione differenziale per i geni bersaglio di ogni miRNA. I risultati hanno mostrato che la presenza di singoli miRNA in un determinato tipo cellulare abbassa il livello di espressione dei geni bersaglio del singolo miRNA. Questo dato suggerisce fortemente che i miRNA determinano e mantengono l'identità cellulare e quindi le differenze tra cellule diverse.

Il modello di apparsa dei miRNA e della successiva formazione di sequenze bersaglio sugli mRNA sin qui esposto permette di fare delle predizioni. I miRNA più antichi (quelli che sono rimasti identici tra tutti gli animali, dal nematode fino all'uomo e che quindi sono apparsi prima) dovrebbero avere un numero elevato di bersagli mentre quelli più recenti (che sono tipici di ogni specie, per esempio l'uomo) dovrebbero avere un numero piccolo di bersagli. Sembra proprio che questa predizione sia vera, più antichi sono i miRNA più elevato è il numero di geni bersaglio e viceversa. Addirittura si trovano miRNA evolutivamente recenti che apparentemente non hanno geni bersaglio.

Al lettore probabilmente a questo punto è sorta la domanda, ma perché tanta complessità, perché c'era bisogno di altri regolatori della funzione di geni? Non bastava che ogni gene fosse regolato trascrizionalmente, post trascrizionalmente, traduzionalmente? Probabilmente i livelli di regolazione sin qui scoperti aumenteranno per una ragione molto semplice. Per poter strutturare un organismo multicellulare complesso è necessario aumentare o il numero dei geni necessari, oppure i livelli di regolazione e la coordinazione dell'espressione dei vari gruppi di geni. Sembra che l'evoluzione non abbia generato un numero molto più grande di geni dal moscerino della frutta (14000 geni), al nematode C. elegans (18000 geni),

all'uomo (circa 20-25000 geni). Ha generato invece reti di regolazione differenziale dei singoli geni in cui sia i fattori che regolano la trascrizione che i miRNA cooperano per generare una grande varietà di tipi cellulari durante lo sviluppo.

I micro RNA sono implicati nelle patologie?

Il possibile coinvolgimento dei miRNA in processi cellulari fondamentali come la proliferazione cellulare e la morte cellulare programmata ha fatto subito ipotizzare che i miRNA fossero coinvolti in patologie importanti come il cancro. I primi data sembrano confermare questa ipotesi.

È noto che, in alcuni tipi di linfoma, determinate regioni del genoma sono presenti in più copie generate da meccanismi patologici di amplificazione. In una di queste regioni sono codificati diversi miRNA [20]. Come risultato dell'amplificazione genomica si è trovata una maggiore concentrazione dei miRNA codificati in questa regione nelle cellule tumorali. Per poter dimostrare che una possibile causa della patologia potesse essere l'eccesso di questi miRNA nelle cellule si è introdotta la regione genica implicata in cellule normali di topo. L'espressione forzata di questi specifici miRNA ha prodotto il linfoma nei topi trattati. È stato inoltre possibile identificare il gene bersaglio di questi miRNA. Si tratta del gene E_2F_1 , normalmente deputato alla regolazione della progressione del ciclo cellulare. Un eccesso di miRNA ne impedisce l'espressione e di conseguenza induce lo sviluppo della patologia [21].

Questo è stato il primo caso studiato di miRNA che agiscono come oncogeni. Altri lavori hanno dimostrato che miRNA diversi sono implicati in altri tipi di tumore. Per esempio il miR-21 e implicato in alcuni casi di glioblastoma dove è stato dimostrato che l'eccessiva espressione di miR-21 impedisce alle cellule di morire producendo quindi un tumore [22].

Un caso opposto è quello del miRNA let-7 la cui espressione è molto ridotta alcuni casi più aggressivi di cancro del polmone. Il difetto di let-7 determina l'eccessiva espressione del gene RAS (suo putativo bersaglio), noto come uno dei più potenti oncogeni.

Molto deve essere ancora studiato ma questi primi lavori cominciano a dimostrare che un eccesso od un difetto nella concentrazione di alcuni micro RNA, alterando profondamente la regolazione dell'espressione genica, produce effetti disastrosi come le patologie oncologiche [23].

In conclusione il silenziamento genico, scoperto per caso, si stà rivelando di estrema importanza perché permette di studiare la regolazione dell'espressione dei geni in piante ed animali, di capire quali meccanismi riescono a determinare l'identità cellulare e come venga mantenuta ed eventualmente alterata nelle patologie oncologiche. La facilità con cui il silenziamento genico può essere utilizzato stà determinando la conoscenza rapida della funzione di geni in tutti gli organismi e comincia a permettere applicazioni biotecnologiche su piante e animali modello.

Una scoperta fatta per caso ha cambiato radicalmete il mondo della biologia e finirà con l'avere importanti ripercussioni economiche nel nostro mondo in rapida crescita.

Macino Giuseppe (Roma, 1947) Professore ordinario di Biologia cellulare presso la Facoltà di Medicina della Università di Roma «La Sapienza». Membro dell'EMBO (European Molecular Biology Organization), Membro del Human Frontier Science Program Organization. Macino è stato un pioniere nell'utilizzazione delle metodiche di sequenziamento del DNA negli anni Settanta, che lo hanno portato alla scoperta della non universalità del codice genetico nei mitocondri. Il suo interesse principale è sempre stato rivolto al controllo trascrizionale della espressione genica indotta dalla luce in sistemi modello come le muffe. Ha isolato e studiato il fotorecettore che controlla la regolazione del ciclo circadiano da parte della luce. Negli anni Novanta ha scoperto il sistema di difesa che usa piccoli RNA contro trasposoni e virus nelle muffe ed i meccanismi molecolari che lo guidano. Questi lavori hanno dato un grande contributo alla comprensione dell'analogo meccanismo di difesa cellulare delle cellule animali. Attualmente lavora sulla funzione dei piccoli RNA nelle patologie umane.

Riassunto – L'RNA interference (RNAi) è un meccanismo molecolare atto a preservare la integrità genomica. È presente in tutti gli organismi superiori dai funghi all'Uomo; la sua scoperta ha avuto enormi ripercussioni nei campi della ricerca bio-molecolare, della medicina e delle biotecnologie ed è valsa l'assegnazione del premio Nobel 2006 per la medicina a Andrew Fire e Craig Mello.

Vi è un sostanziale accordo nella comunità scientifica circa il fatto che l'RNAi sia comparso e si sia conservato nel corso della evoluzione per contrastare l'azione alcuni tipi di virus e trasposoni capaci di integrarsi nel genoma dell'organismo ospite. Il meccanismo di difesa si basa su di un processo in due fasi. La prima fase consiste nel riconoscimento di molecole di RNA a doppio filamento e nella loro degradazione in frammenti lunghi 21 coppie di basi chiamati small interfering RNA (siRNA); gli siRNA che derivano da questo primo processo sono poi utilizzati dalla cellula per il riconoscimento specifico e la degradazione di molecole di RNA a singolo filamento.

Tale meccanismo può essere indotto facilmente ad agire anche contro geni endogeni: è possibile degradare specificamente qualsiasi RNA messaggero introducendo in piante, in cellule in coltura ed in animali da esperimento molecole di RNA sintetiche a doppio filamento lunghe 21 coppie di basi e con sequenza omologa a quella del gene di interesse. L'RNAi ha trovato immediate applicazioni in moltissimi campi della biologia e della medicina. L'uso di questa tecnologia ha generato immediatamente notevoli risultati nello studio di geni coinvolti nelle patologie umane più importanti.

Una delle ricadute più importanti dello studio della funzione dei piccoli RNA è stata la scoperta che gli animali e le piante posseggono dei piccoli RNA endogeni detti microRNA (miRNA) codificati dal genoma. Attualmente sono noti circa 500 miRNA nell'uomo ed altri se ne vanno via via scoprendo. La loro funzione è quella di modulare l'espressione di geni

implicati in processi cellulari come il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi, lo sviluppo neuronale, il cancro e lo sviluppo nelle piante. Alcuni microRNA sono a tutti gli effetti degli oncogeni o degli oncosoppressori. Gran parte dei geni è sotto il controllo diretto o indiretto dei miRNA che agiscono regolando il livello di traduzione dei messaggeri e la loro vita media. Ogni miRNA ha un effetto pleiotropico poiché regola contemporaneamente diverse centinaia di geni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 1990 Apr;2(4):279-289.
- [2] Romano, N. & Macino, G., Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**, 3343-3353 (1992).
- [3] Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. & Dougherty, W.G., Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759 (1993).
- [4] Fire, A. et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391, 806-811 (1998).
- [5] Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. & Schultz, R.M. (2000), Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference *Development* Vol. 127, Issue 19 4147-4156.
- [6] Sijen, T. and Plasterk, R.H. (2003). Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi. Nature, 426, 310-314.
- [7] Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101, 533-542.
- [8] Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, 11, 1207-1216.
- [9] Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 1999 Oct 29;286(5441):950-2.
- [10] Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.
- [11] Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. Genes Dev. 2002 Nov 1;16(21):2733-42. Review.
- [12] Cogoni, C., Macino, G., Gene silencing in Neurospora crassa requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. Nature. 1999 May 13;399(6732):166-9.
- [13] Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297, 1833-1837.
- [14] Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I., and Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. Science 303, 672-676.
- [15] Ambros V., The functions of animal microRNAs. Nature. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.
- [16] Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N., Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet. 2005 May;37(5):495-500.

- [17] Rajewsky, N., microRNA target predictions in animals. Nat Genet. 2006 Jun;38 Suppl:S8-13.
- [18] Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. & Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- [19] Pranidhi Sood, Azra Krek, Mihaela Zavolan, Giuseppe Macino, and Nikolaus Rajewsky Celltype-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression PNAS [February 21, 2006] vol. 103 [no. 8] 2746-2751.
- [20] He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., Hammond, S.M., A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature. 2005 Jun 9;435(7043):828-33.
- [21] Kathryn, A., O'Donnell, Erik, A., Wentzel, Karen, I., Zeller, Chi, V., Dang and Joshua, T. Mendell, c-Myc-regulated microRNAs modulate E₂F₁ expression *Nature* 435, 839-843 (9 June 2005).
- [22] Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S., MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005 Jul 15;65(14):6029-33.
- [23] Jun Lu, Gad Getz, Eric A. Miska, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Justin Lamb, David Peck, Alejandro Sweet-Cordero, Benjamin L. Ebert, Raymond H. Mak, Adolfo A. Ferrando, James R. Downing, Tyler Jacks, H. Robert Horvitz and Todd R. Golub MicroRNA expression profiles classify human cancers *Nature* 435, 834-838)9 June 2005).