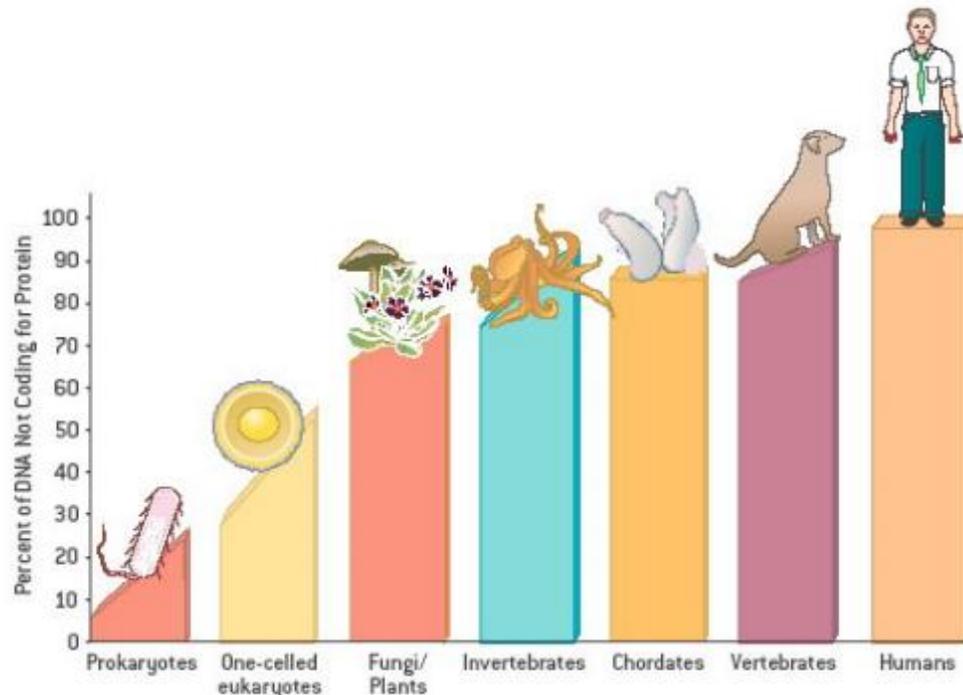
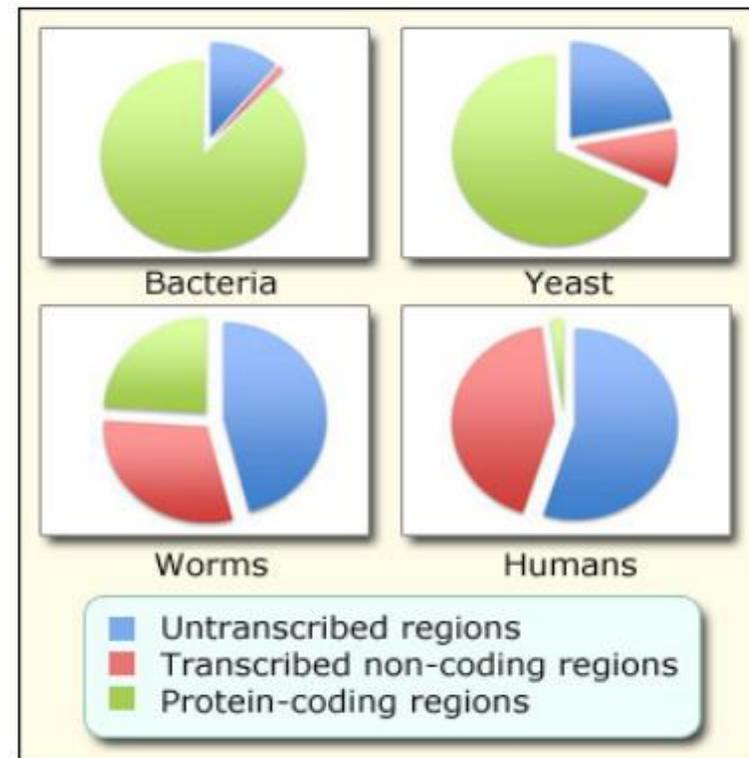


Il DNA non codificante aumenta con la complessità dell'organismo



NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

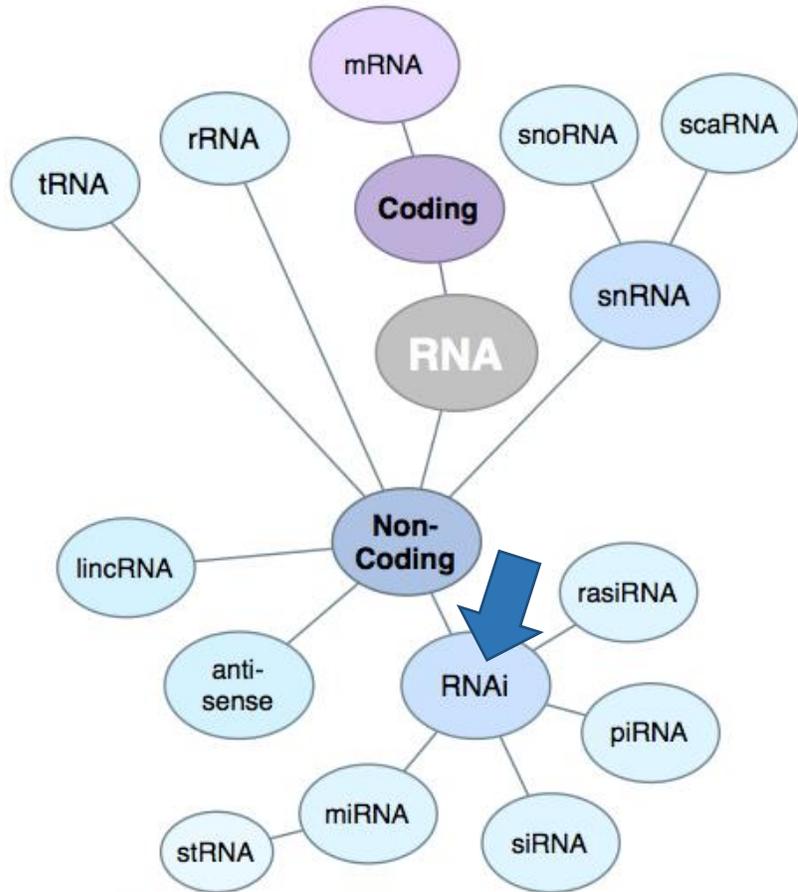


Il DNA «spazzatura» serve

- Più del 90% dell'intero genoma è composto da sequenze che **non esprimono proteine**, e per questo motivo è stato considerato per lungo tempo privo di qualsiasi funzione
- DNA spazzatura considerato come una sorta di relitto dell'evoluzione
- Il progetto internazionale Encode ha permesso di attribuire una **funzione al DNA non codificante**
- Il DNA non codificante funge da **modulatore della trascrizione genica, ma anche della traduzione**

Nuove forme di RNA - ncRNA (non coding)

un nuovo strumento per la modulazione genica: silenziamento genico

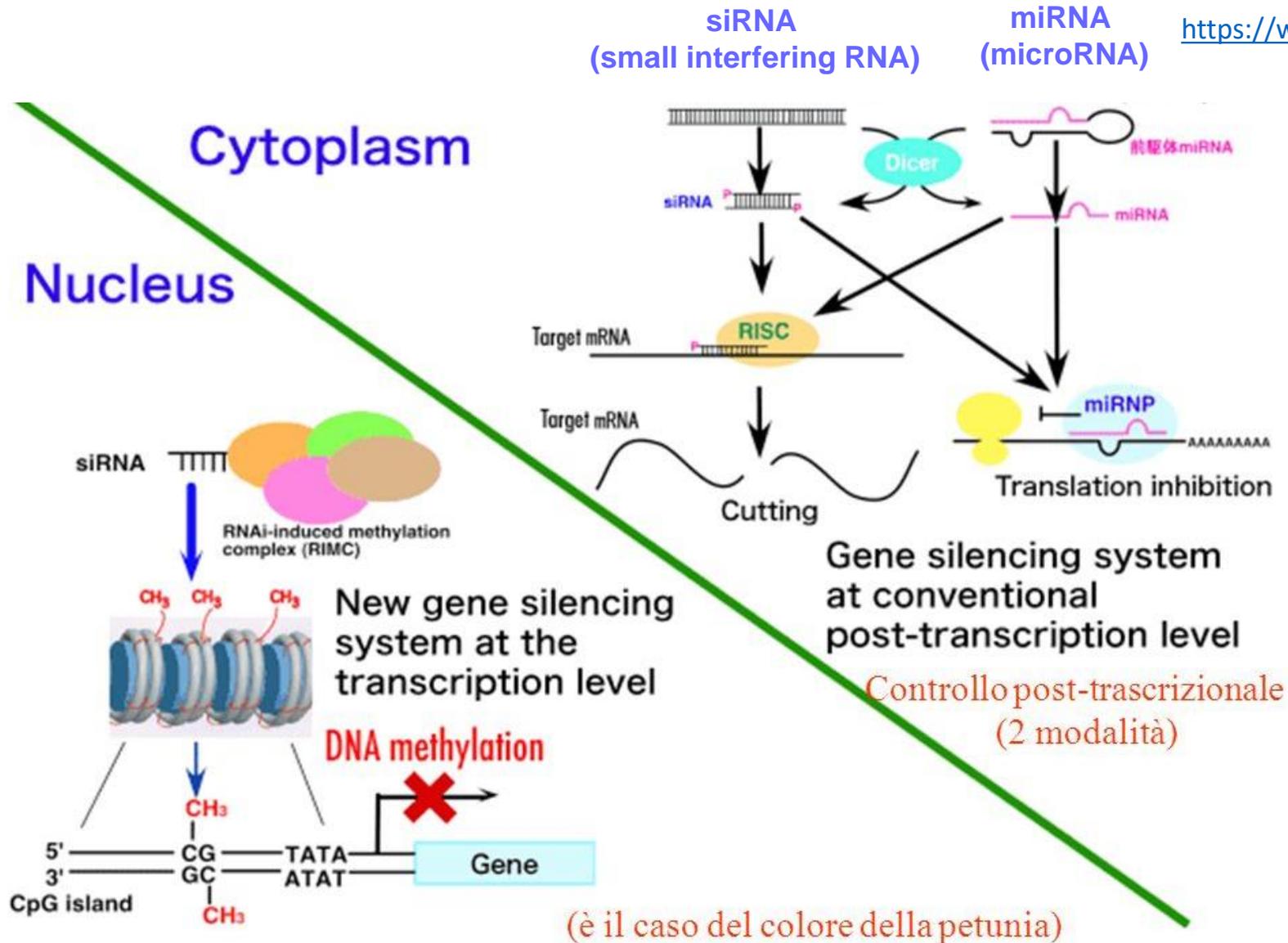


E' uno strumento per:

- identificazione e conferma di target biologici
- generazione di modelli *knockout*
- funzione di un determinato gene

I meccanismi del silenziamento genico

<https://www.youtube.com/watch?v=t5jroSCBBwk>



Interferenza a RNA

Comprendere la funzione di un gene può essere più facile se si osserva l'effetto a livello cellulare (**fenotipo**) causato dalla **mancata espressione** del gene di interesse.

L'inibizione dell'espressione di un gene viene detta **silenziamento genico** o **knock down**.

È possibile silenziare uno specifico gene all'interno del genoma grazie alla tecnologia dell' **interferenza a RNA** (*RNA interference*, **RNAi**).

Gli effetti del silenziamento genico per interferenza a RNA possono essere **macroscopici**, come nel caso del colore del fiore delle petunie. A sinistra la varietà di partenza, a destra gli effetti del silenziamento di alcuni geni coinvolti nella pigmentazione delle petunie transgeniche.



Cenni storici

- Piante

Anni '90, un'osservazione sorprendente

- Obiettivo: aumentare la pigmentazione viola nelle petunie utilizzando un sistema d'espressione
- Risultato: colorazione variegata o completamente bianca



Al fenomeno è stato dato il nome di 'silenziamento genico post trascrizionale'

Richard A. Jorgensen e Joseph Mol della Libera Università di Amsterdam inserirono in piante di petunia dai fiori violacei copie aggiuntive del gene responsabile del loro pigmento originario. Le piante che ospitavano diverse copie del gene del pigmento producevano addirittura corolle con ampie chiazze bianche.

- Vermi (*Caenorhabditis elegans*)

1998

- Fire & Mello iniettarono RNA senso, RNA antisenso e siRNA in *C. elegans* (Fire A et al. *Nature*; 391: 806-811)
- Prima evidenza che il siRNA conduce al silenziamento genico



Questa importantissima osservazione portò a coniare il termine "RNA interference"



Premio Nobel 2006

Nematodi+siRNA: mostravano spasmi incontrollabili, qualcosa aveva iniziato a interferire con l'espressione del gene *unc-22*. Fire e Mello osservarono lo stesso effetto di silenziamento su qualunque gene preso a bersaglio, dai geni attivi nel tessuto muscolare a quelli coinvolti nella fertilità.

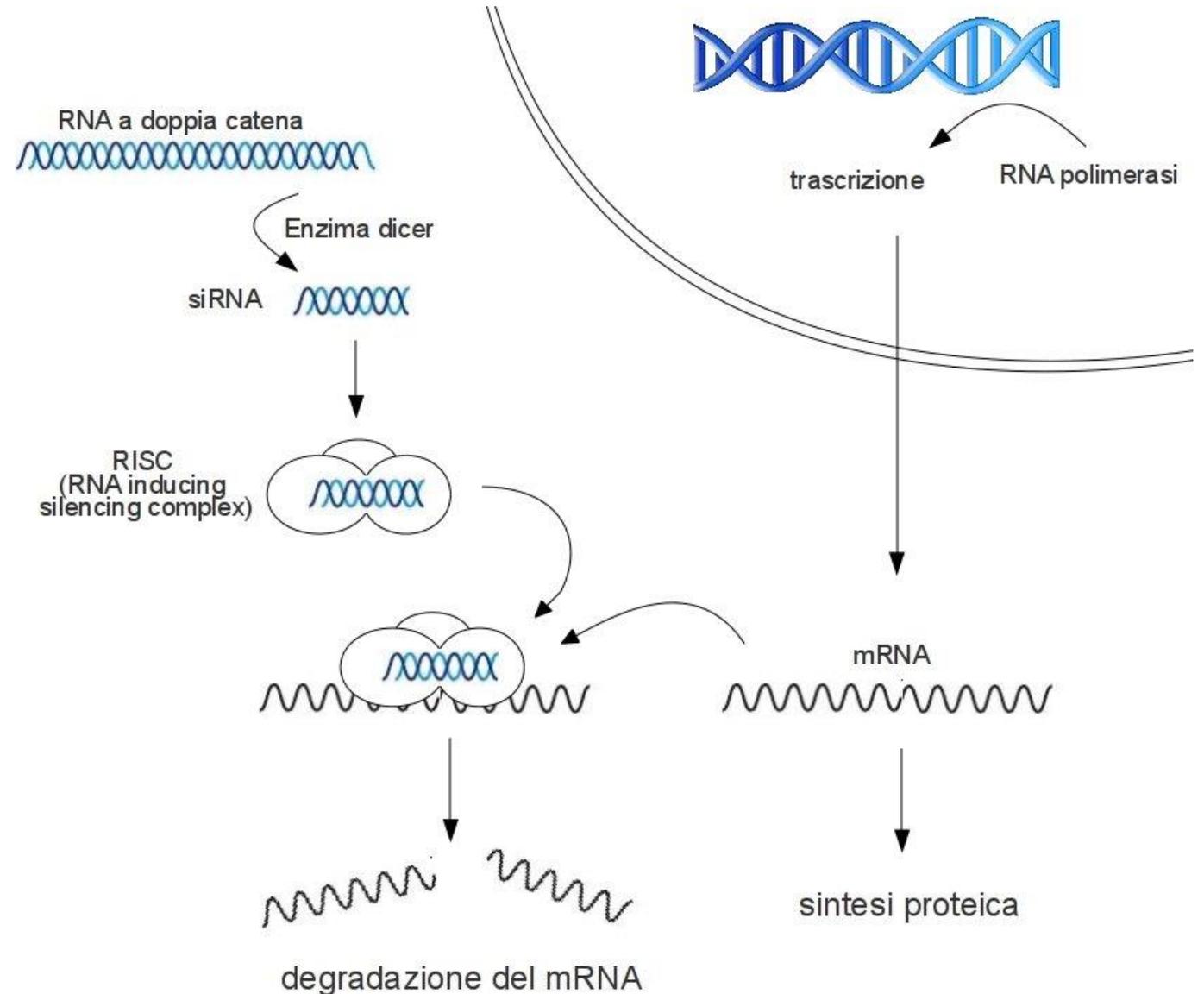
Interferenza a RNA

Fenomeno osservato in differenti organismi (da protozoi a mammiferi), conservatosi durante l'evoluzione come **meccanismo di difesa contro i virus**.

L'RNAi è un **processo naturale** usato dalle cellule per **regolare l'espressione genica**.

La cellula esprime RNA che non servono a codificare proteine, ma che sono **processati da una serie di enzimi per generare dei corti RNA (20-30 nt)** detti **siRNA** (*small interfering RNA*, piccoli RNA interferenti).

Ciascun siRNA è complementare alla sequenza di un mRNA. Il suo appaiamento porta alla degradazione specifica dell'mRNA prima che venga tradotto.



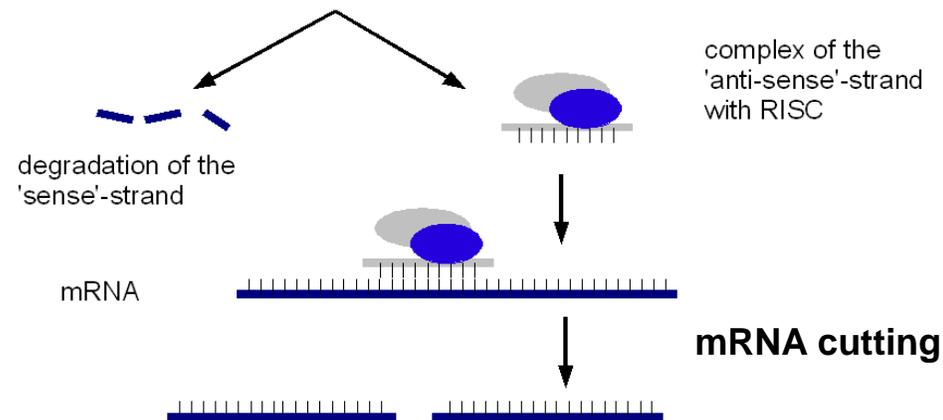
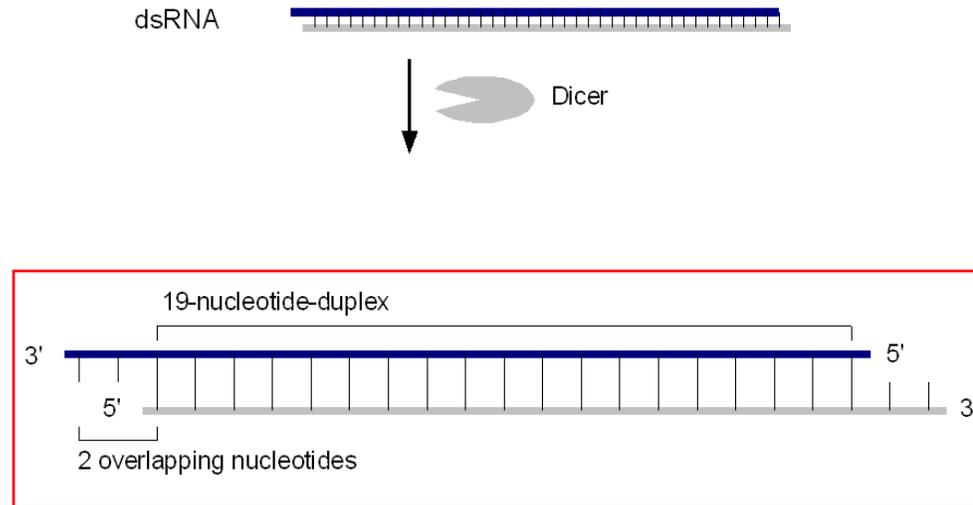
Interferenza a RNA: meccanismo biochimico dell'iRNA

1. **DICER** digerisce il dsRNA frammenti da ~21bp (short interfering RNAs → siRNAs)

DICER:

- RNase III ribonuclease family
- Specifico per dsRNA
- Altamente conservato in insetti, piante, vermi, umani

2. **Produzione di siRNA 21-22 dsRNA, con 5'-P, 2nt sporgenti**



3. **Gli siRNA subiscono separazione delle eliche e vengono integrati nel RISC** (RNA Induced Silencing Complex)

RISC:

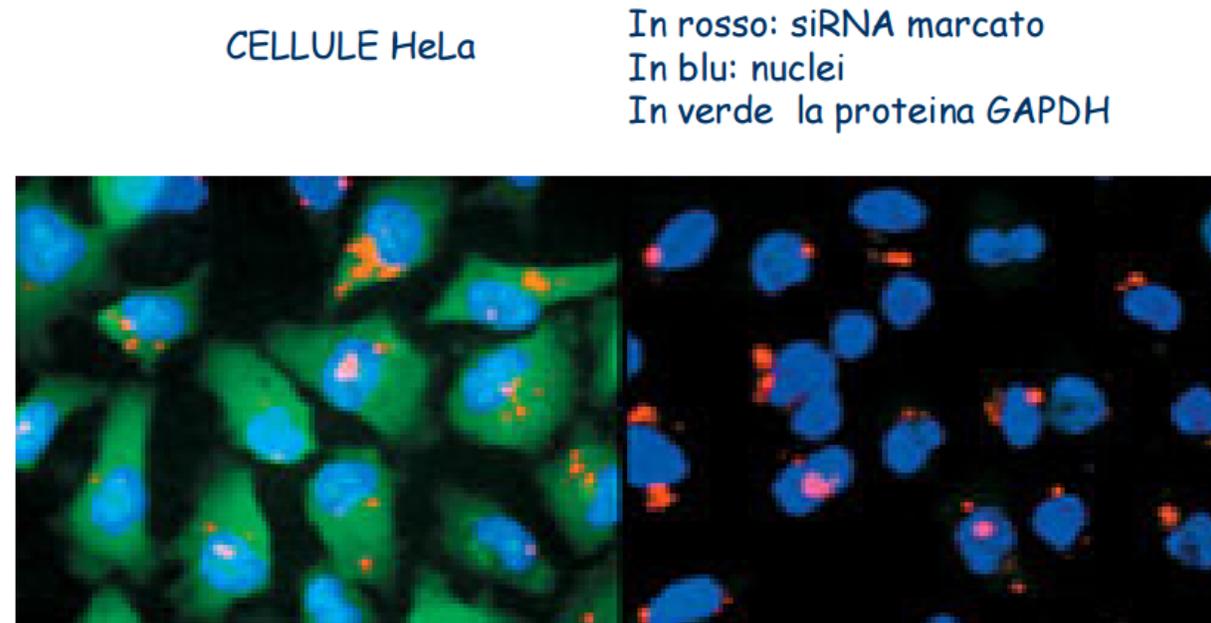
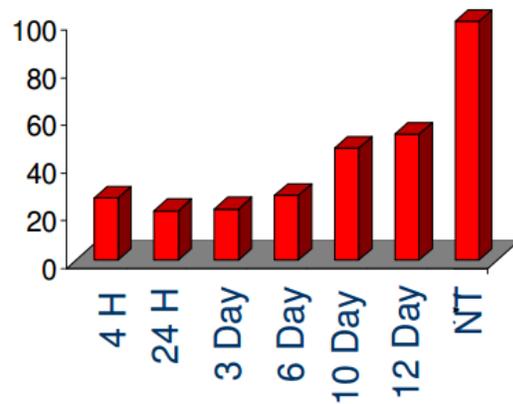
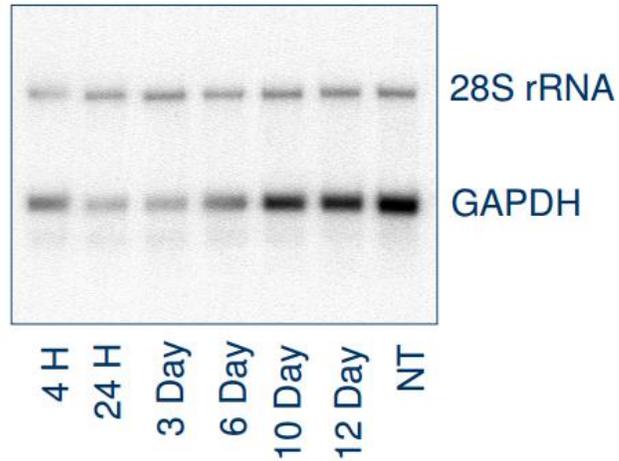
- **SLICER** viene co-purificata con
- **ARGONAUTE** e **EIFC2** (elongation factor)
- **l'elicasi**

4. **Riconoscimento e taglio endonucleasico del mRNA target:** il siRNA si lega all'mRNA complementare (target) e l'attività nucleasica (**Slicer**) di RISC degrada l'mRNA.

5. Le ribonucleasi cellulari completano la degradazione dell'mRNA target.

Durata del silenziamento transiente coi siRNA

Trattamento di cellule HeLa, estrazione di RNA e Northern blotting



si RNA non specifico

si RNA contro GAPDH

Trattamento: 48h



Trasfezione con siRNA: le condizioni devono essere ottimizzate per ciascuna linea cellulare

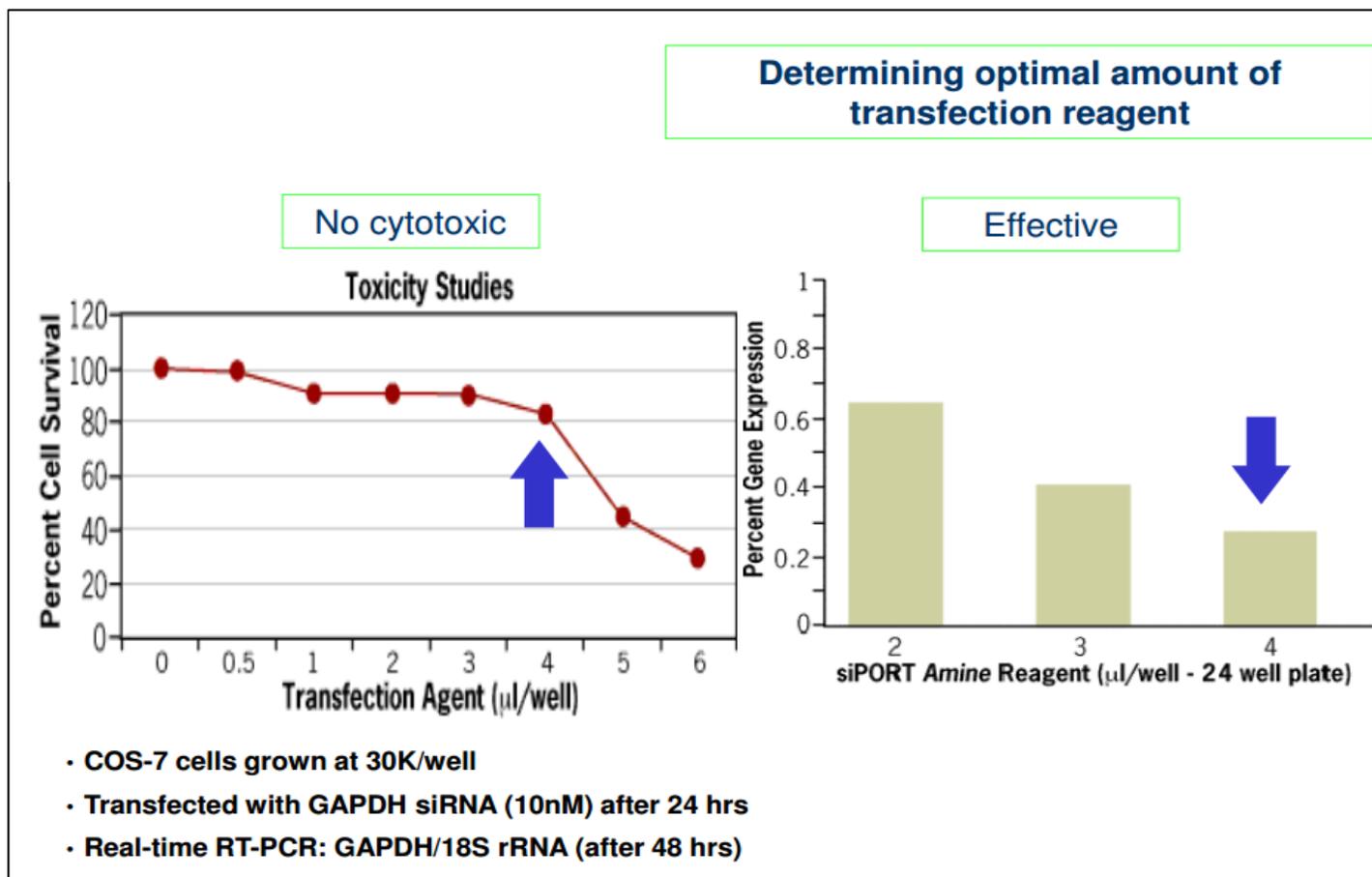


Prevenire effetti di spegnimento del target:

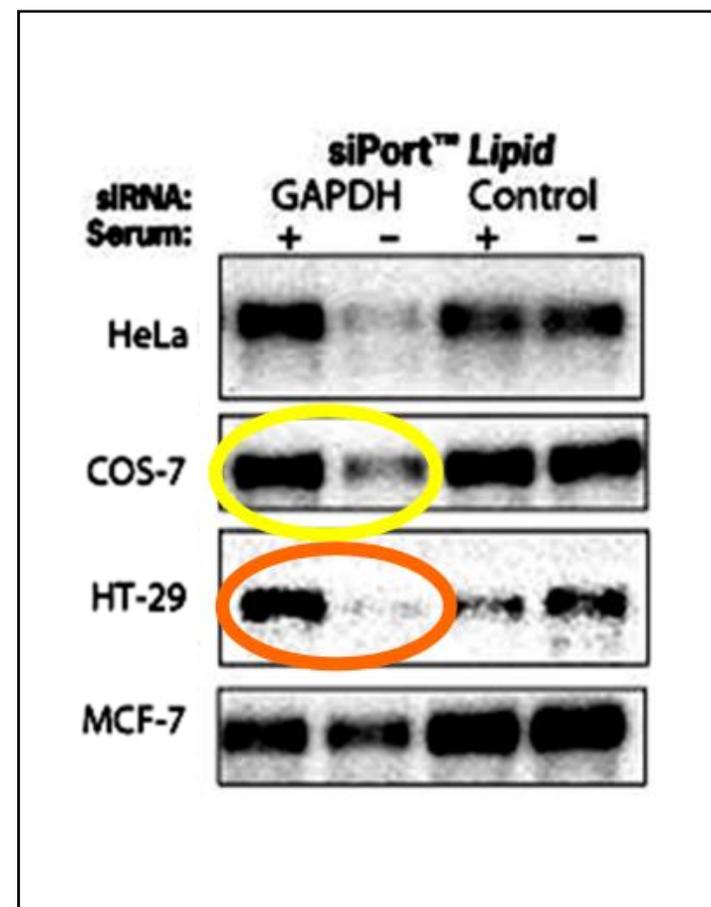
- Basse concentrazioni** (~5-30 nM) di siRNA per minimizzare l'attivazione l'**interferon pathway** come risposta anti-virale
- E' preferibile usare un solo siRNA molto efficiente piuttosto che una miscela di siRNA meno potenti, la MIXTURE fa aumentare la concentrazione totale
- Usare RNAi specifici, dopo aver effettuato test di siRNA differenti sullo stesso mRNA bersaglio

Trasfezione con siRNA

Scelta del reagente trasfettante

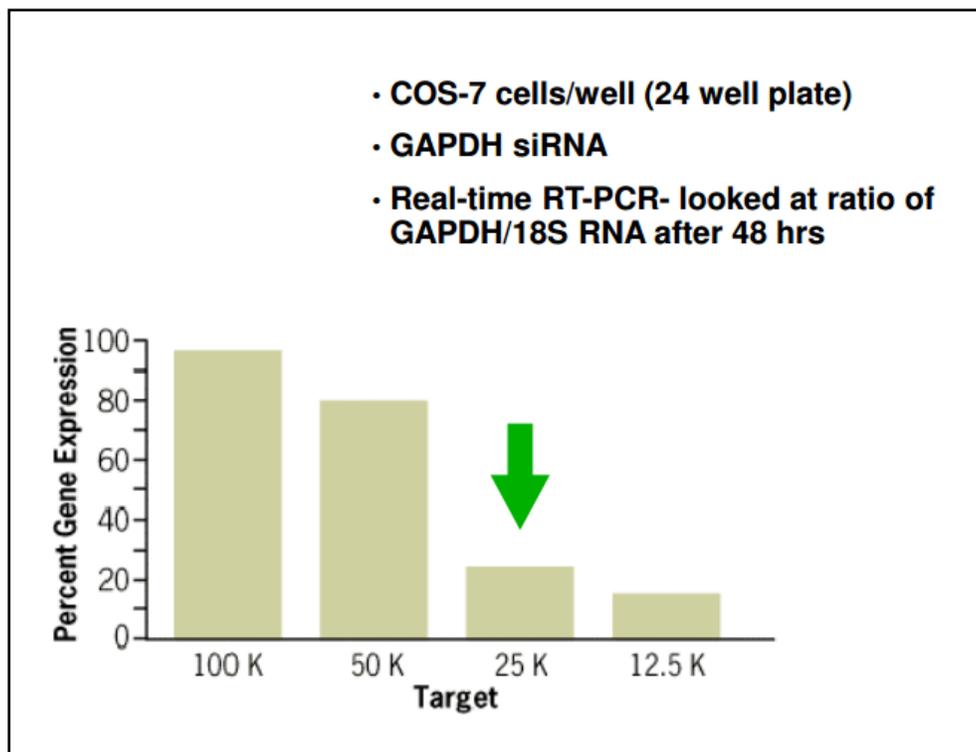


Presenza ed assenza di siero

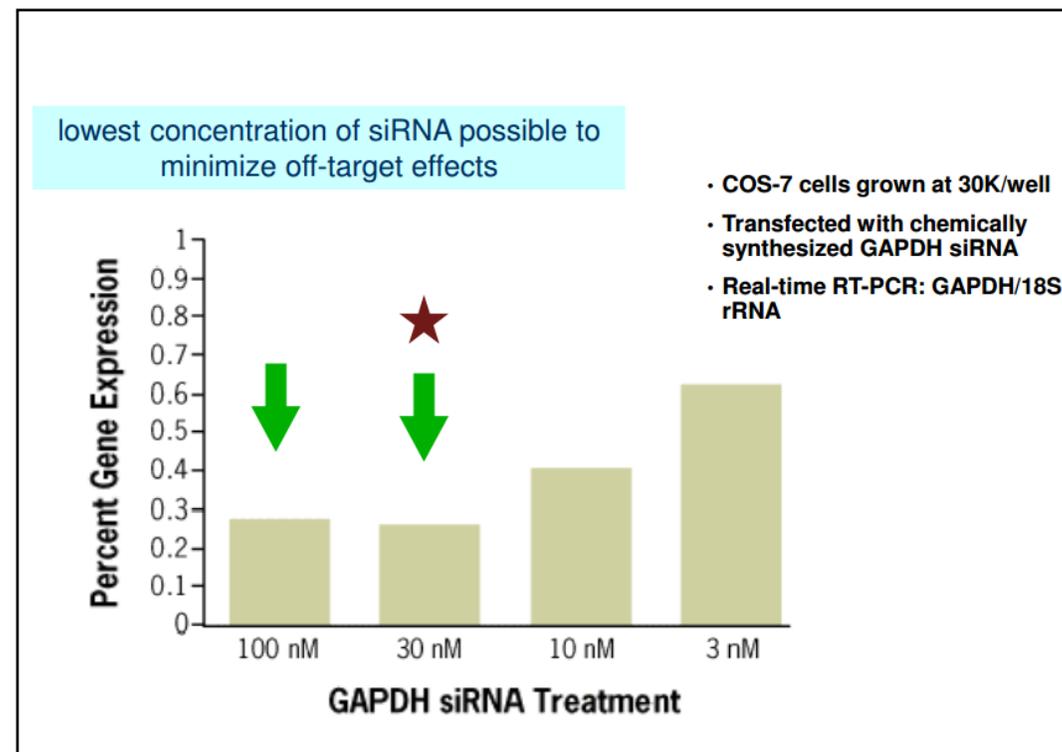


Trasfezione con siRNA

Determinare la densità di semina delle cellule



Concentrazione di siRNA



Interferenza a RNA: trasfezione con siRNA

introduzione nella cellula di dsRNA per il Silenziamento Genico Post-Trascrizionale (PTGS)

PRO

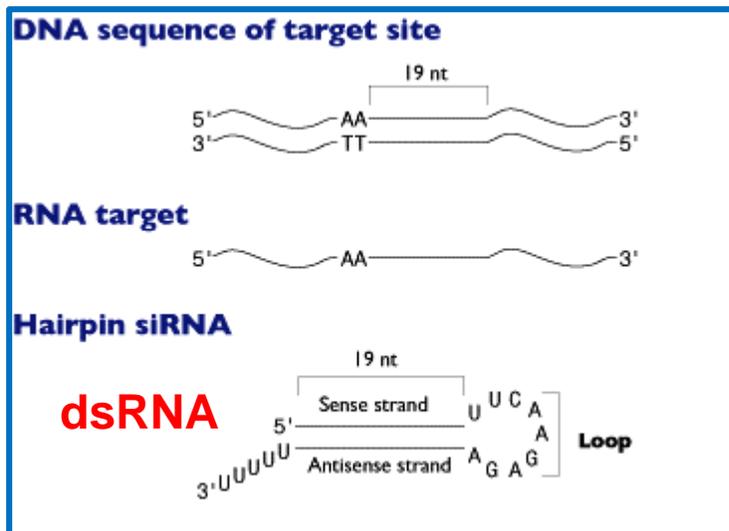
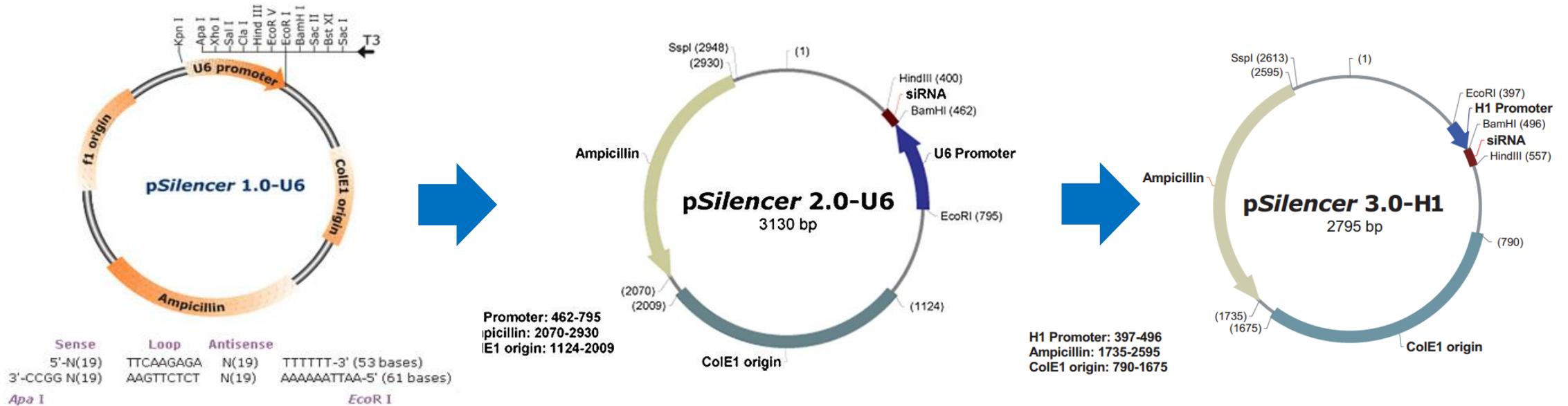
- ❑ La trasfezione con siRNA è davvero molto efficiente in molti tipi di cellule
- ❑ Coi siRNA il silenziamento è immediato

CONTRO

- ❑ Alcune cellule sono refrattarie alla trasfezione e la loro elettroporazione spesso causa morte cellulare
- ❑ I siRNA sono stabili, **ma la trascrizione può risultare transiente se le cellule si duplicano molto in fretta** diluendo il silenziamento e la vita media della proteina

Superamento del problema mediante.....

Silenziamento tramite vettori a DNA

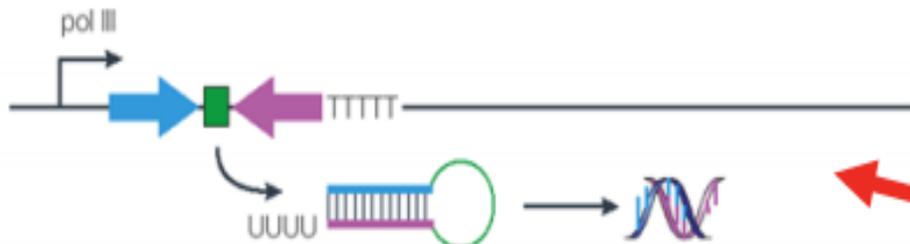
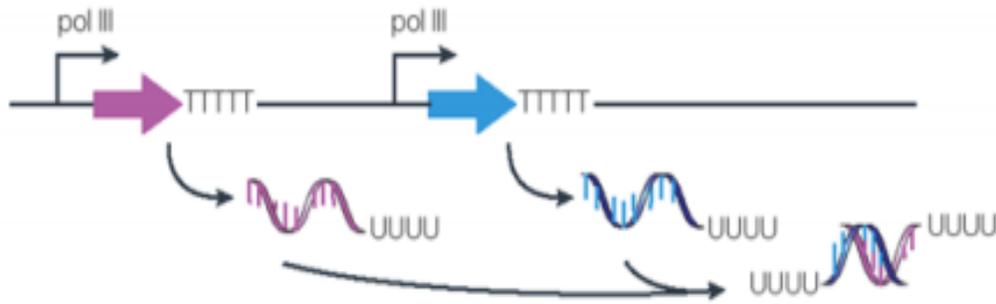


- Una sequenza stampo per un “hairpin siRNA” viene clonata in un opportuno vettore per trascrivere una molecola di RNA
- Produzione di siRNA *in vivo direttamente* nelle cellule trasfettate
- Trasfezione stabile nella linea cellulare di cui si vuol silenziare il gene target dell’RNAi
- Silenziamento a lungo termine del gene target**

Sintesi di siRNA *in vivo*

❏ Nessuna sequenza richiesta dopo start site per la trascrizione

❏ TTTT: sufficiente per terminazione



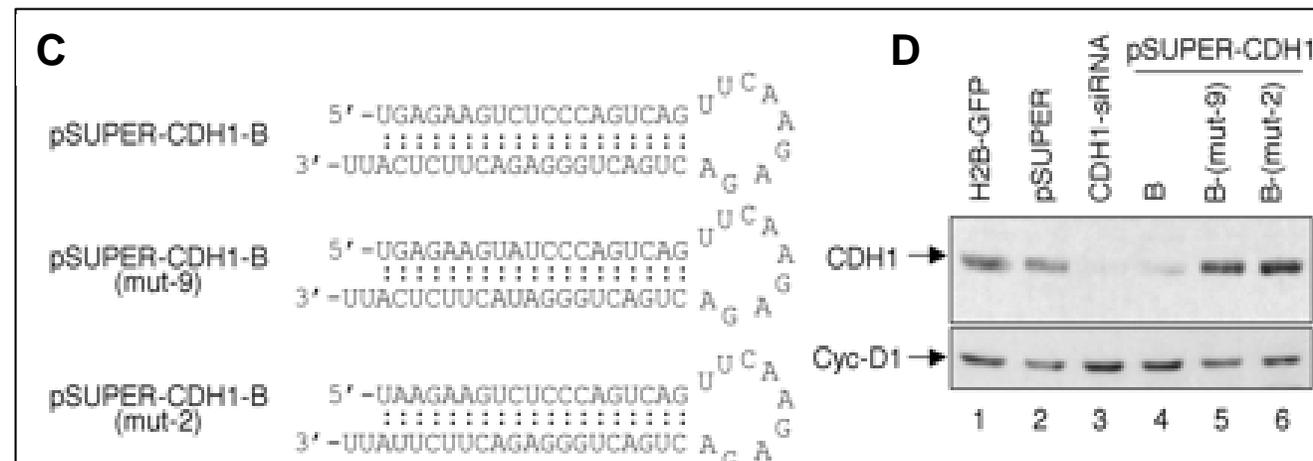
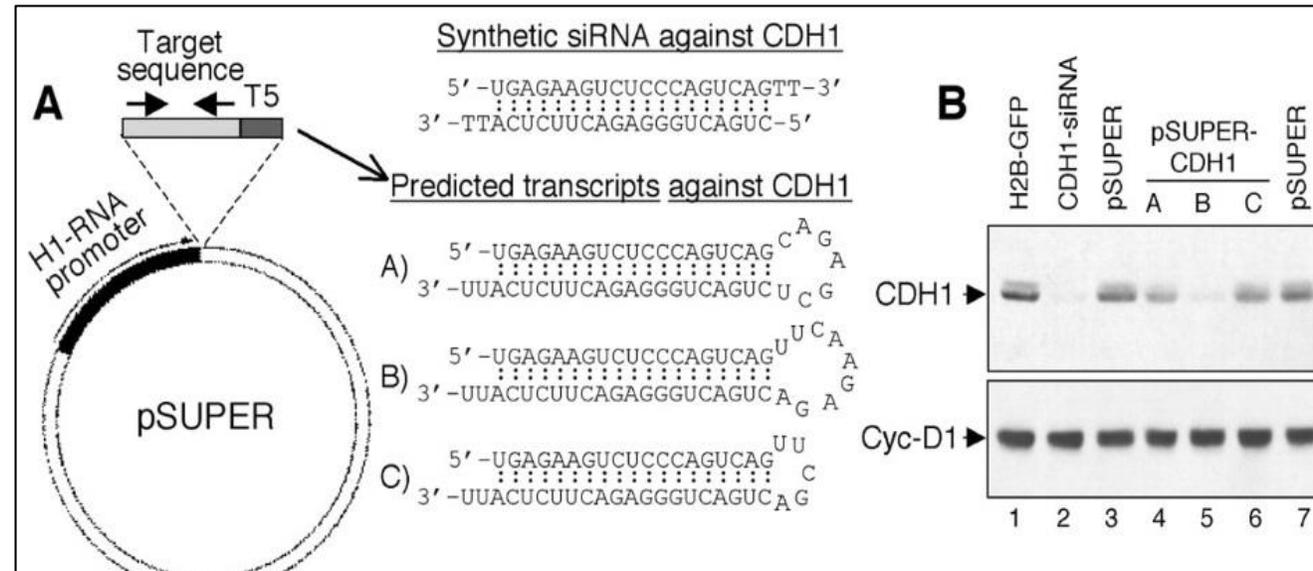
More efficiently processed by DICER!!

❏ **Clonati in vettori plasmidici**
con promotori adatti per la
produzione di RNA

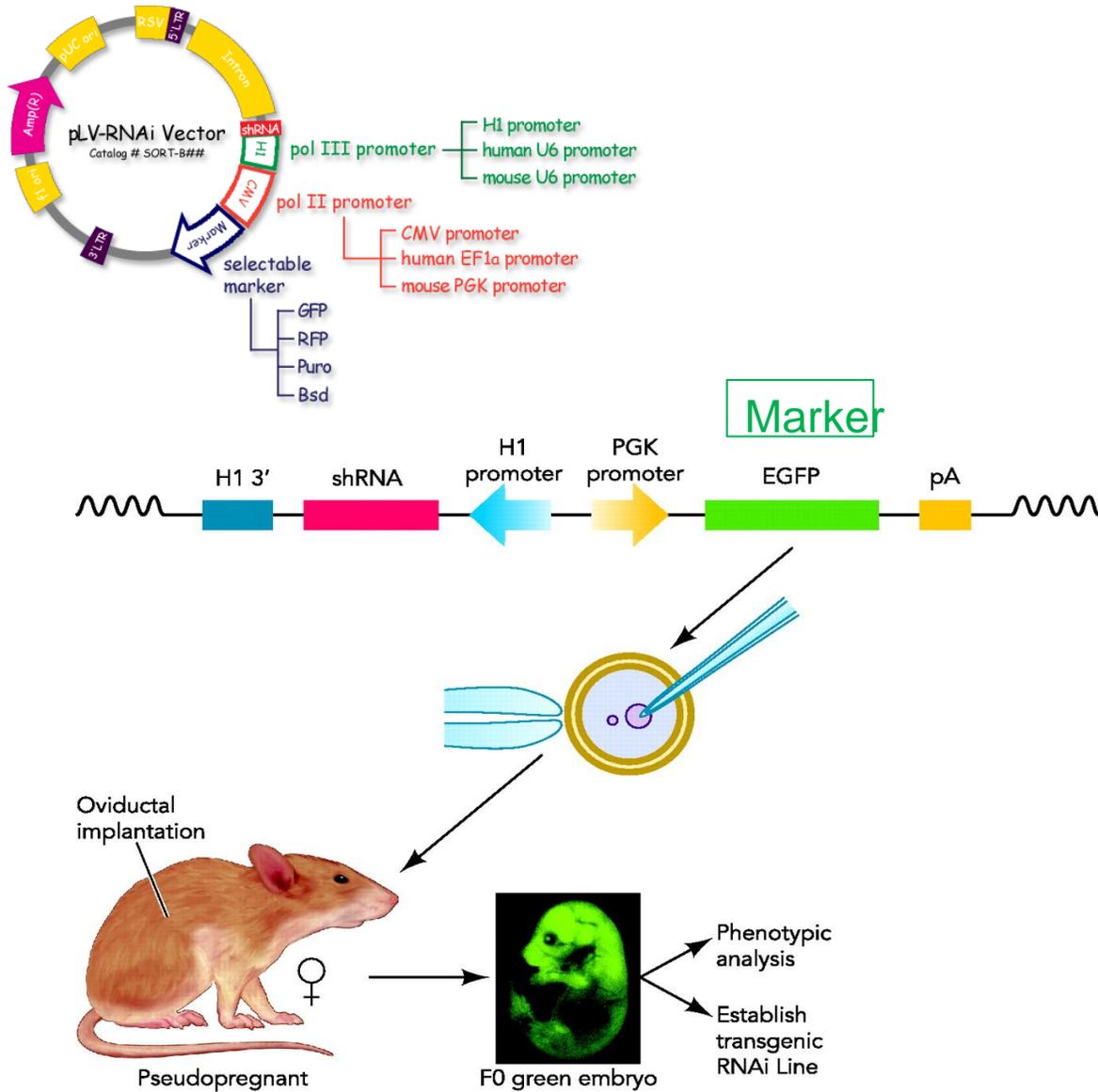
❏ **Clonati in vettori virali**

- **Oncoretrovirus:** MoMuLV o MSCV, le cellule devono duplicanti per poter essere infettate
- **Lentivirus:** HIV-1, per infettare cellule quiescenti

Un sistema per l'espressione stabile di *short interfering RNA* in cellule di mammifero: vettore plasmidico



Espressione di siRNA *in vivo*



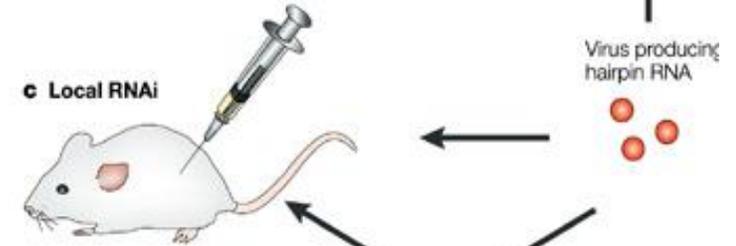
a Knockout



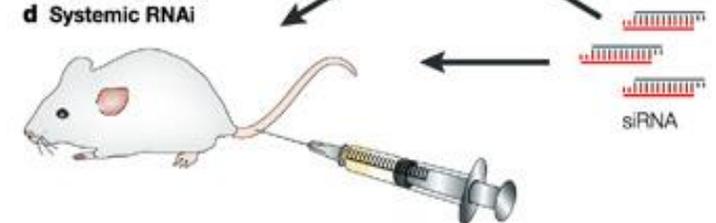
b Transgenic RNAi



c Local RNAi



d Systemic RNAi



Trasfezione con siRNA: applicazioni

- ❑ Silenziamento genico specifico, efficiente e stabile nel tempo (economico e veloce)
- ❑ È un approccio di «genetica inversa»
- ❑ Screening delle funzioni genomiche (Genome-wide functional screenings)
- ❑ Terapia genica (es. antitumorale)
- ❑ Creazione di modelli per lo studio di agenti farmacologici (es. murini)
- ❑ Rivoluzione nello studio dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica

siRNA Library Design

1. Grazie ai siRNA è possibile **silenziare uno alla volta** tutti i geni di un organismo.
2. Una tipica applicazione consiste **nell'identificare quali geni sono coinvolti in un certo processo**
3. Il punto di partenza è una **libreria di siRNA, specifica per un singolo gene del genoma**. Oggi esistono librerie in grado di coprire la maggior parte dei geni umani (≈ 20.000 siRNA).

siRNA "potenzialmente" funzionale:

- La regione target deve essere a valle del codone di inizio, ad una distanza che varia da 50 a 100bp.
- Lunghezza compresa fra 19-22 bp.
- Contenuto in GC fra il 35-55%
- 2-nt 3' overhangs di residui di uridina
- 5'-phosphate and 3'-hydroxyl group.

- **Stability**
- **Access to RISC**

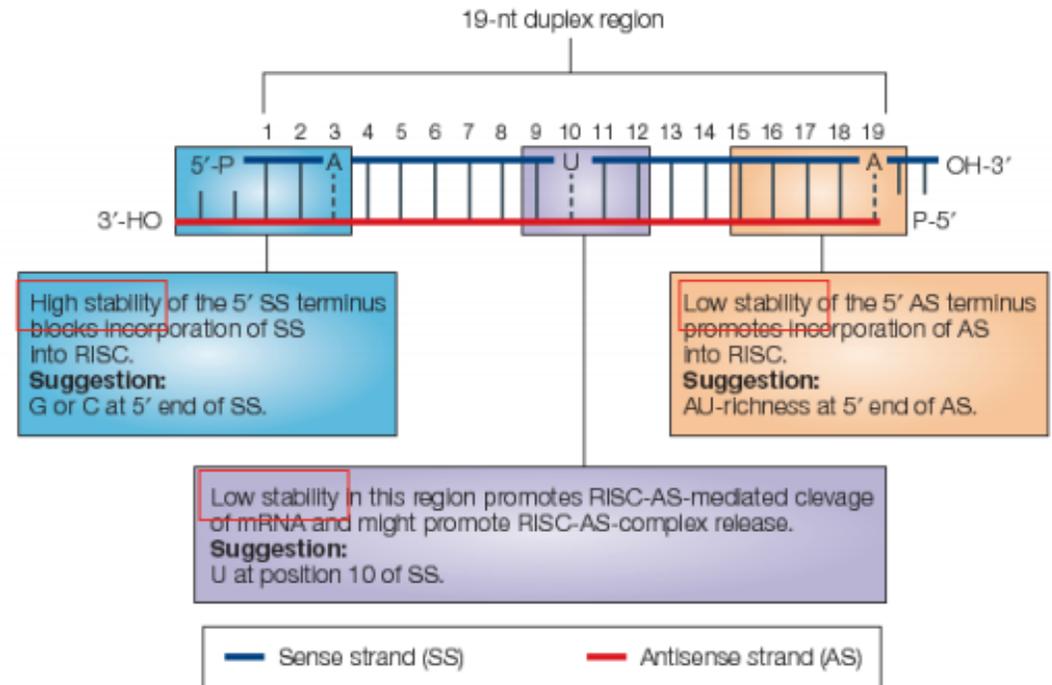
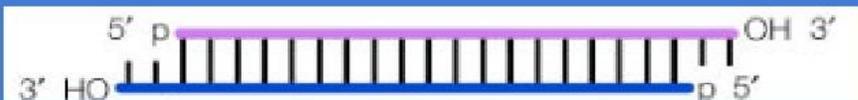
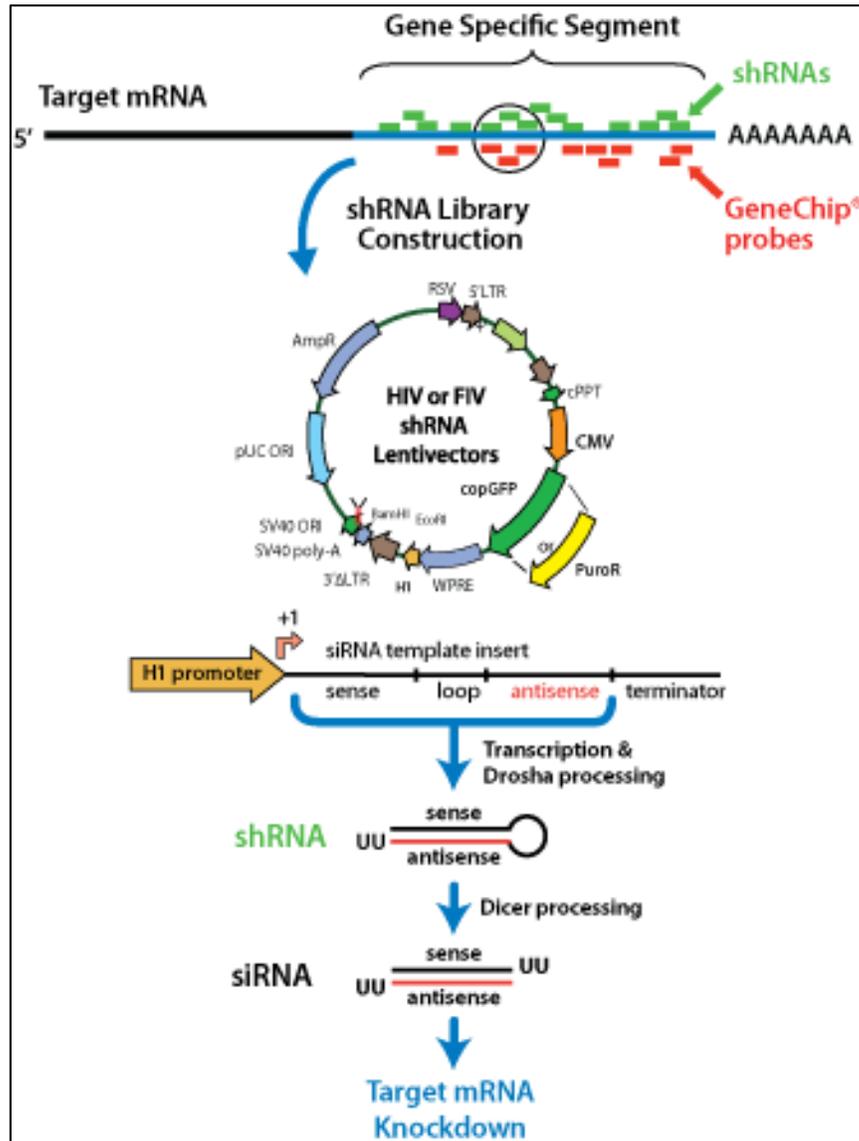


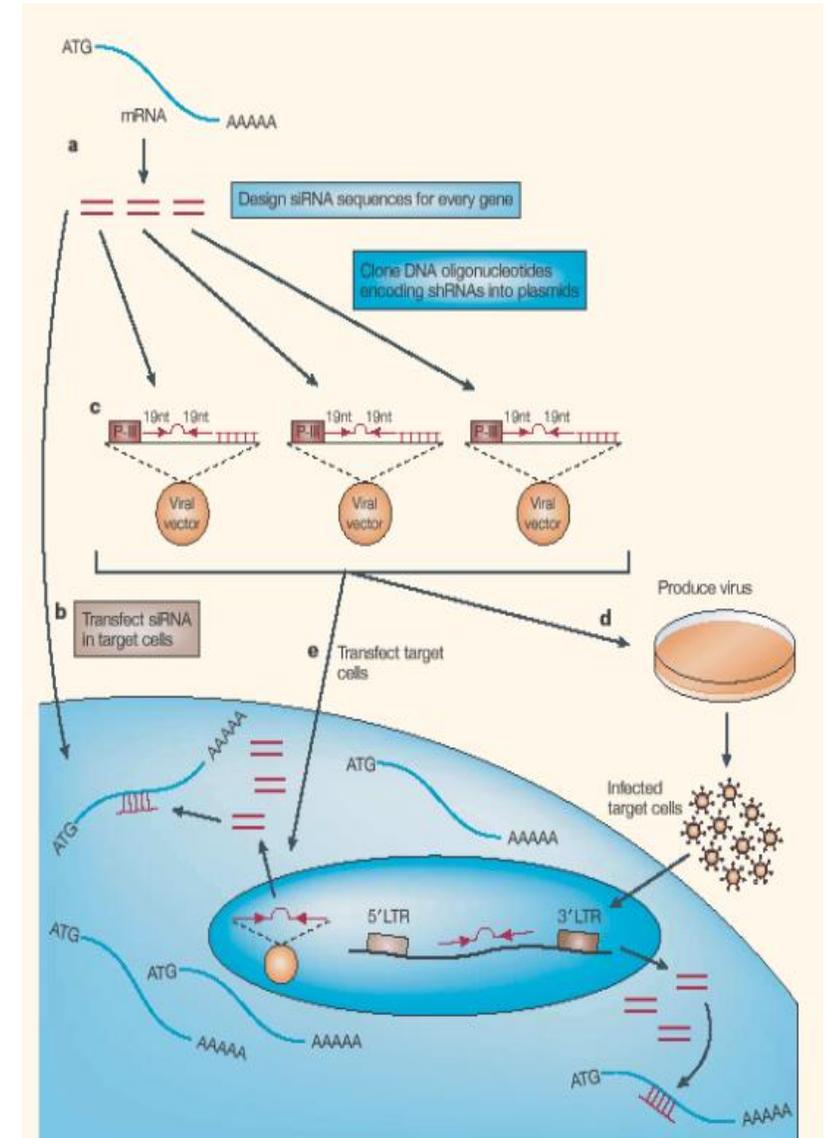
Figure 2 | **The generation of effective siRNA.** A small interfering RNA (siRNA) is a 21–23-nucleotide (nt) dsRNA that contains: a 19-nt duplexed region, symmetric 2–3-nt 3' overhangs, and 5'-phosphate (P) and 3'-hydroxyl (OH) groups. The positions of each nucleotide in the 19-nt duplexed region of the sense strand are shown. On the basis of recently established design criteria, an effective siRNA has high stability at the 5' terminus of the sense strand (blue box), lower stability at the 5' antisense terminus (orange box) and at the cleavage site (purple box). In addition, the sequence-specific preferences at the following positions on the sense strand are important: the presence of an A at position 19, an A at position 3, a U at position 10 (BOX 2 lists other parameters). RISC, RNA-induced silencing complex.

Mittal, Nature Review Genetic, 2004

Screening della perdita di funzione del genoma coi siRNA



1. **Sintesi della libreria di siRNA, specifica per un singolo gene del genoma.** Oggi esistono librerie in grado di coprire la maggior parte dei geni umani (≈ 20.000 siRNA).
2. Trasfezione delle cellule con una libreria di siRNA diretti contro uno specifico gene target
3. Analisi espressione genica rispetto al controllo non trasfettato (Northern blotting; RT-PCR; gene-expression profiling) o ricerca della proteina analisi con saggi cellulari (FACS; ELISA)
4. **Identificazione del vettore con l'inserto in grado di inibire il gene target**



Limitazioni dell'siRNA

Impossibile studiare geni essenziali per la sopravvivenza cellulare (*housekeeping*) e sviluppo



Sviluppo di nuovi vettori per l'espressione condizionale-inducibile dei shRNA

(tet OFF/ON H1 and U6 promoter system)

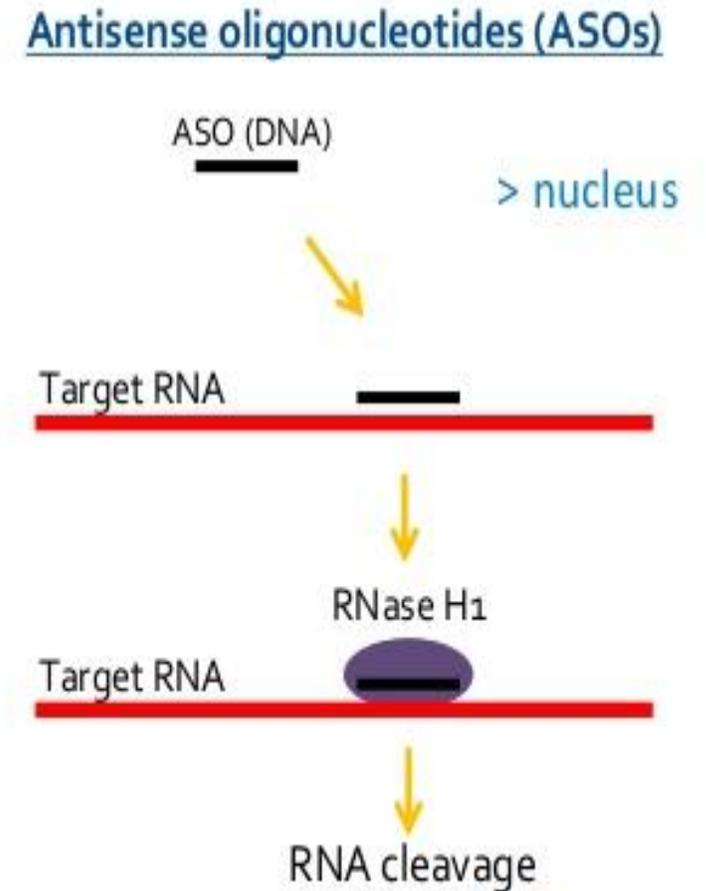
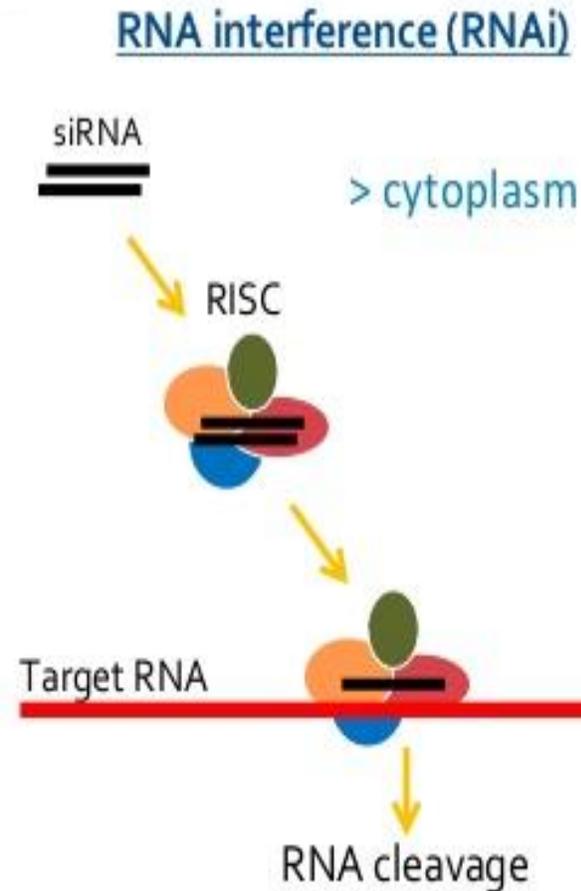
siRNA vs. oligonucleotidi antisenso (a ssDNA)

Similarità

- Lunghezza
- Metodologia di *delivery* comune
- Induzione di silenziamento genico a livello post-trascrizionale
- Digestione di mRNA bersaglio da parte di endonucleasi
- Possibilità di stabilizzare con basi modificate
- Bio-distribuzione simile

Differenze

- Doppio filamento vs. singolo filamento
- Maggiore stabilità del siRNA
- Maggiore efficacia delle molecole in cellule in coltura
- Meccanismo d'azione mediato da RISC



Uso terapeutico di RNAi

- Malattie ematologiche:
 - Alterazione per riduzione, mutazione o assenza della funzione genica
- Oncologia
 - inibire oncogeni
 - Aumentare l'efficacia della chemioterapia e radioterapia
- Biologia della cellula staminale – ricerca sul topo
 - *knock out* soppressione di geni murini come modelli di studio
 - Studio osservazionale del fenotipo tumorale sul topo
- Malattie infettive – colpire Virus (HCV e HIV)
 - Inibire fattori cellulari e virali
 - Colpire l'RNA Reverse Transcriptase, inibire la replicazione virale
 - Indurre la resistenza all'infezione virale negli organismi infettati

Silenziamento Genico Post-Trascrizionale (PTGS)

- **Sono originati in modi diversi:**
 - siRNA→dsRNA, spesso diretti contro bersagli di RNA virale
 - miRNA→ssRNA con struttura secondaria contenente ripiegamenti
- **Complementarietà rispetto al bersaglio:**
 - siRNAs richiedono un **perfetto matching** (100%) con l'mRNA target, che porta alla degradazione dell'mRNA target
 - miRNAs **non necessitano di un matching** perfetto per indurre l'inibizione della traduzione dell'mRNA target
- **La funzione è la regolazione dell'espressione genica**
 - siRNA post-trascrizionale
 - miRNA post-trascrizionale, ma anche pre-trascrizionale *down*-regolando i geni specifici bersaglio, che stanno per essere trascritti direttamente nel nucleo durante l'induzione della formazione dei complessi di eterocromatina

