

RNA interference

Un interruttore molecolare capace di spegnere i geni come una lampadina

RNA Interference: il processo attraverso il quale un **RNA a doppio filamento** interferisce con l'espressione genica: sia inducendo la degradazione di RNA complementare che bloccandone la traduzione



- 1998 Andrew Fire e Craig Mello (Nobel 2006)
- Fire e Mello scoprirono che un RNA a doppio filamento promuoveva la degradazione dell'RNA messaggero, che dunque non era più in grado di "recapitare" il gene
- L'effetto RNAi è probabilmente un meccanismo molto antico di difesa contro le infezioni da virus a RNA.

Silenziamento Post-trascrizionale (1990)

Jorgensen 1990:

Introduzione di transgeni responsabili della pigmentazione della petunia per ottenere petunie più scure

→ pigmentazione ridotta del 40% nelle petunie transgeniche

→ ridotta espressione sia del gene endogeno che del transgene (cosoppressione)



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.

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**)

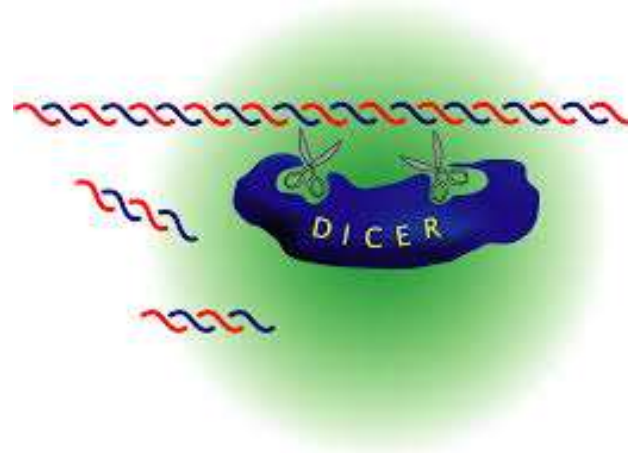
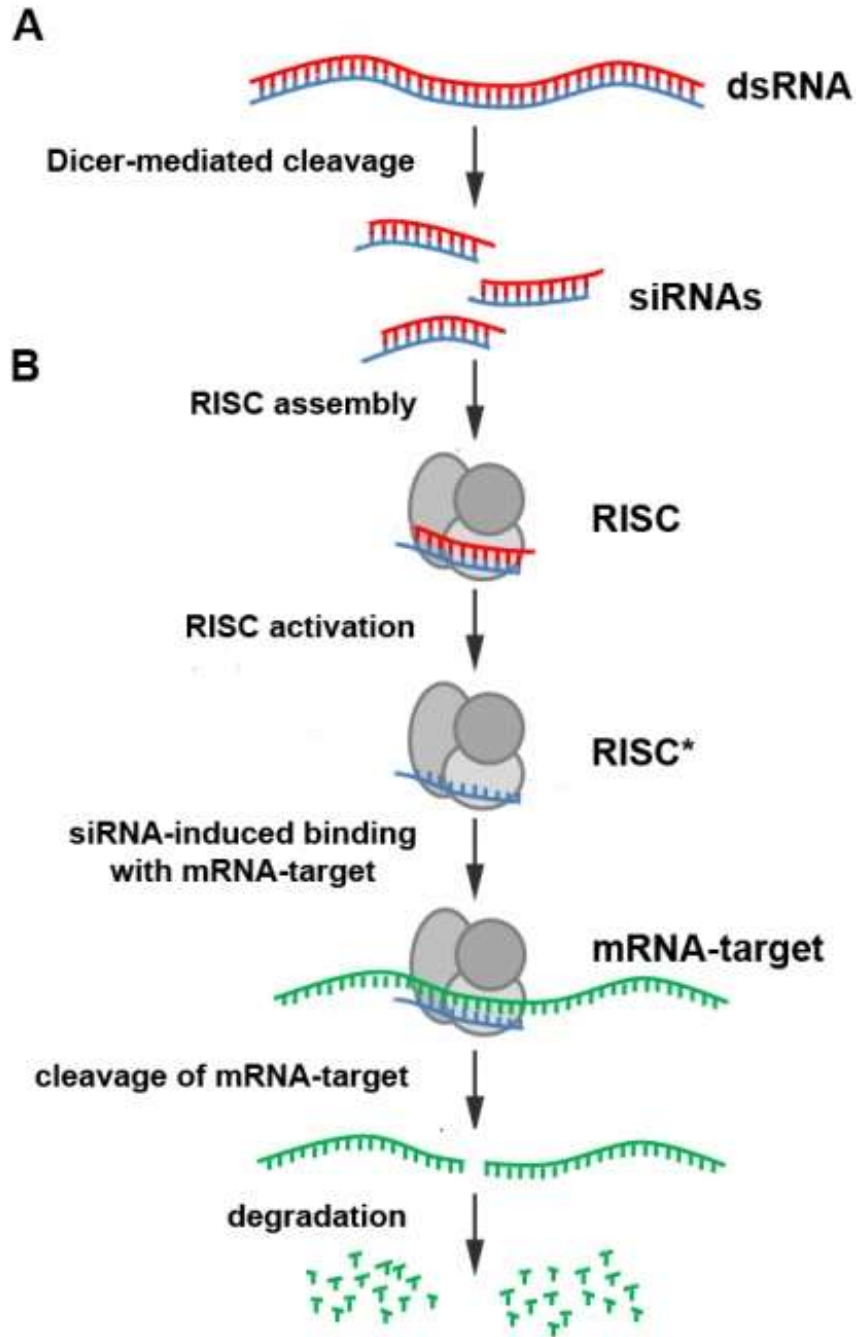
Melo & Co. Hanno visto che piccoli frammenti di RNA a doppio filamento erano più efficaci come silenziatori (dsRNA)

Iniettarono dsRNA all'interno di *Caenorhabditis elegans*, un verme nematode, individuando un potente effetto di silenziamento. Il termine RNA interference fu coniato in questa occasione.

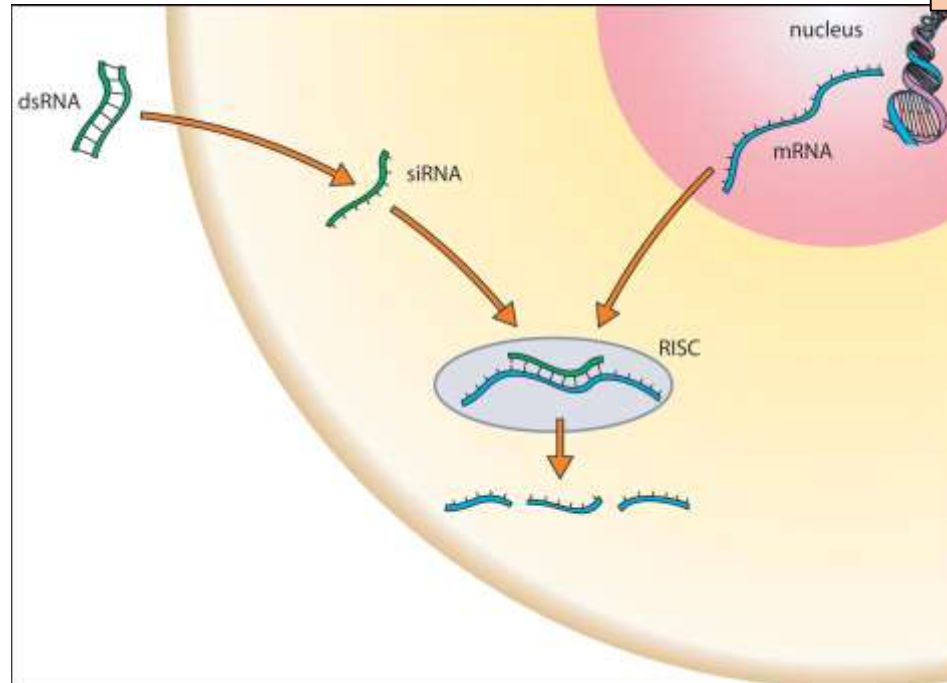
L'RNAi è un **processo naturale** usato dalle cellule per regolare l'espressione genica.

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).

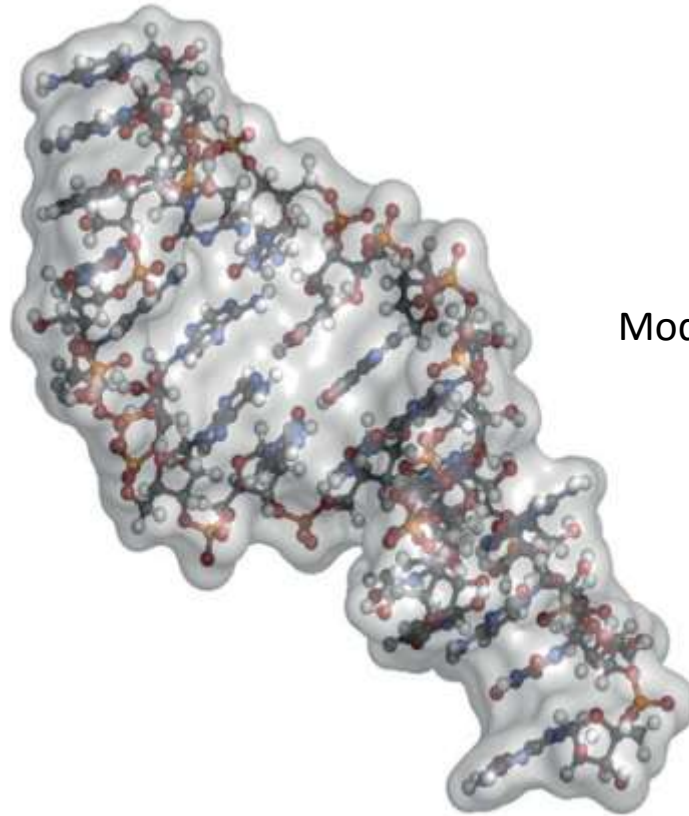
Ciascun siRNA è complementare alla sequenza di un mRNA. Il suo appaiamento porta alla **degradazione** specifica dell'mRNA **prima che venga tradotto**.



Micro RNA (miRNA) precursori a forcina
Small interfering RNA (Si)
Ribonucleasi DICER
RISC (RNA driven interference silencing complex) che comprende: Argonaute, la proteina che srotola il doppio filamento e la ribonucleasi che taglia la sequenza



Analoghi ai siRNA sono i **micro RNA (miRNA)** che inibiscono l'espressione genica anche a livello della traduzione (ribosomi).



Modello computerizzato di un miRNA

Interferenza a RNA: applicazioni (I)

Grazie ai siRNA è possibile **silenziare uno alla volta** tutti i geni di un organismo.

Una tipica applicazione consiste **nell'identificare quali geni** sono coinvolti in un certo processo (per esempio la crescita di cellule tumorali o l'infezione di un virus).

Il punto di partenza è una **libreria di siRNA**, ciascuno specifico per un singolo gene del genoma. Oggi esistono librerie in grado di coprire la maggior parte dei geni umani (≈ 20.000 siRNA).

Interferenza a RNA: applicazioni (II)

I diversi siRNA (ciascuno specifico per un gene) vengono **immobilizzati nei micropozzetti** di un array.

Gli array vengono messi in contatto con le cellule e opportuni reagenti che consentono l'ingresso degli siRNA (**trasfezione**).

Dopo un certo tempo (24 – 48 ore) gli array vengono analizzati per determinare **l'effetto dei siRNA** sulle cellule (ad es. il blocco della crescita o la resistenza all'infezione).

Interferenza a RNA: applicazioni (III)

Dato che ciascun pozzetto dell'array corrisponde a un **singolo siRNA**, l'identificazione del pozzetto i cui le cellule mostrano l'effetto atteso consente immediatamente di sapere **quale gene è stato silenziato**.

È anche possibile esporre le cellule ai siRNA e poi sottoporle ad un **trattamento** (ad es. agenti genotossici). In questo caso è necessario in parallelo sottoporre a silenziamento anche cellule non trattate (**gruppo di controllo**).

Il **confronto** tra gruppo trattato e controllo consente di individuare geni specificamente coinvolti nella risposta al trattamento utilizzato (es. danno al DNA).

Mode of administration	Potential organ target	Potential disease target	Refs
Topical	Eye	Macular degeneration	102
	Skin	Atopic dermatitis	25
	Vagina	Herpes simplex virus	27
	Rectum	Inflammatory bowel disease	105
Local/direct	Lung	SARS	32
	Brain	Huntington's disease	23
	Spinal cord	Chronic pain	90
	Isolated tumour	Glioblastoma multiforme	28
Systemic	Liver	Hypercholesterolaemia	57
	Heart	Myocardial infarction	106
	Kidney	Kidney disease	61
	Metastasized tumours	Ewing's sarcoma	97

SARS, severe acute respiratory syndrome; siRNA, small interfering RNA.