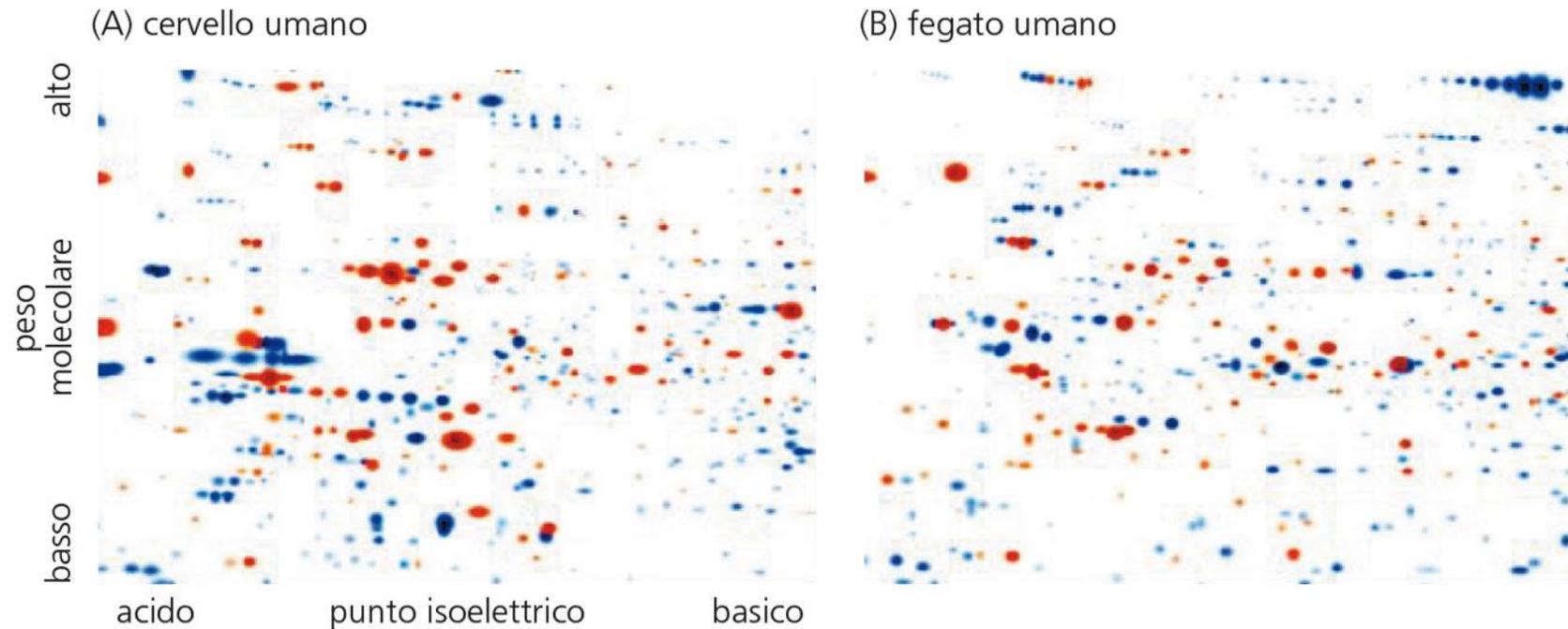


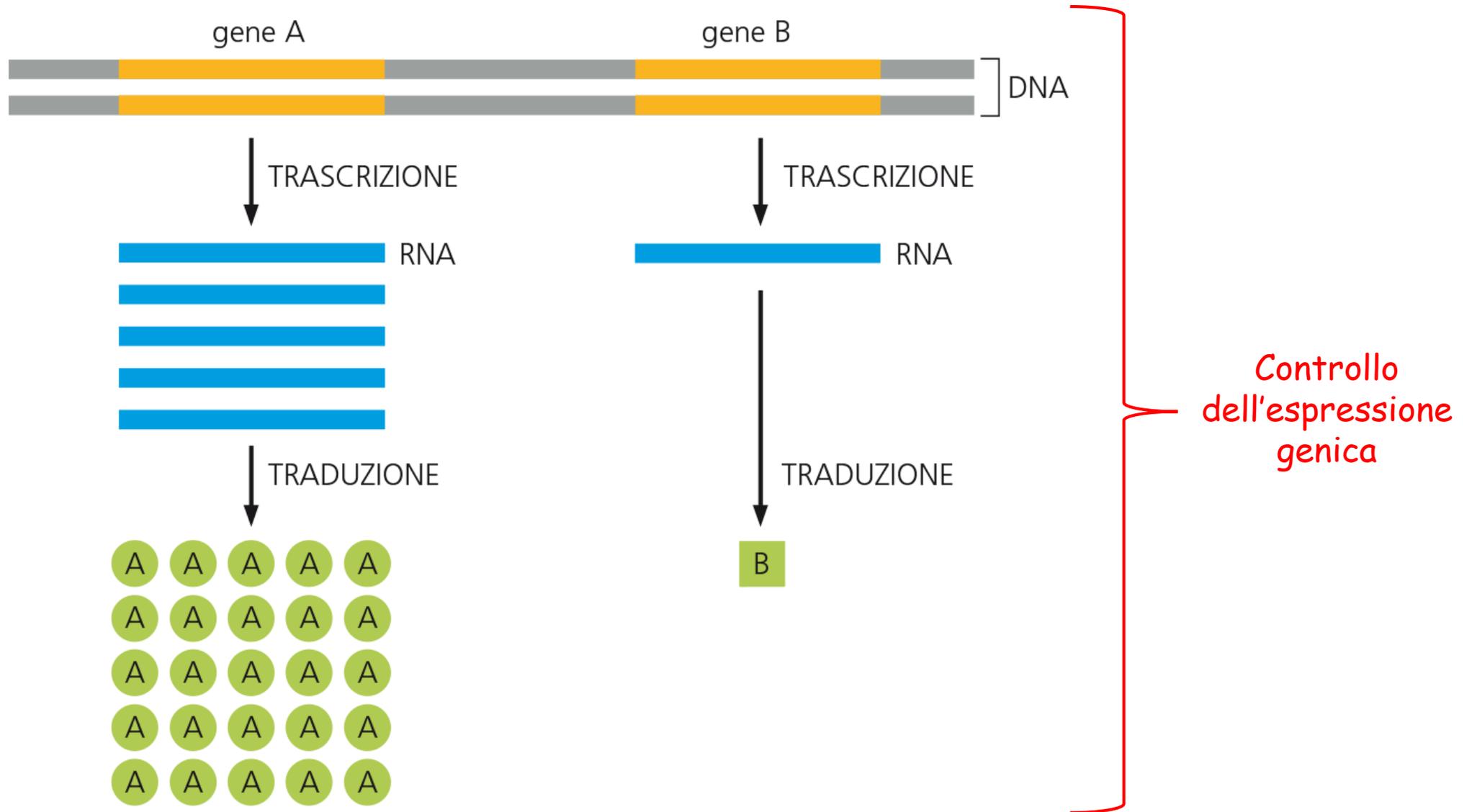
Il controllo dell'espressione genica

Confronto di espressione proteica in due tessuti umani

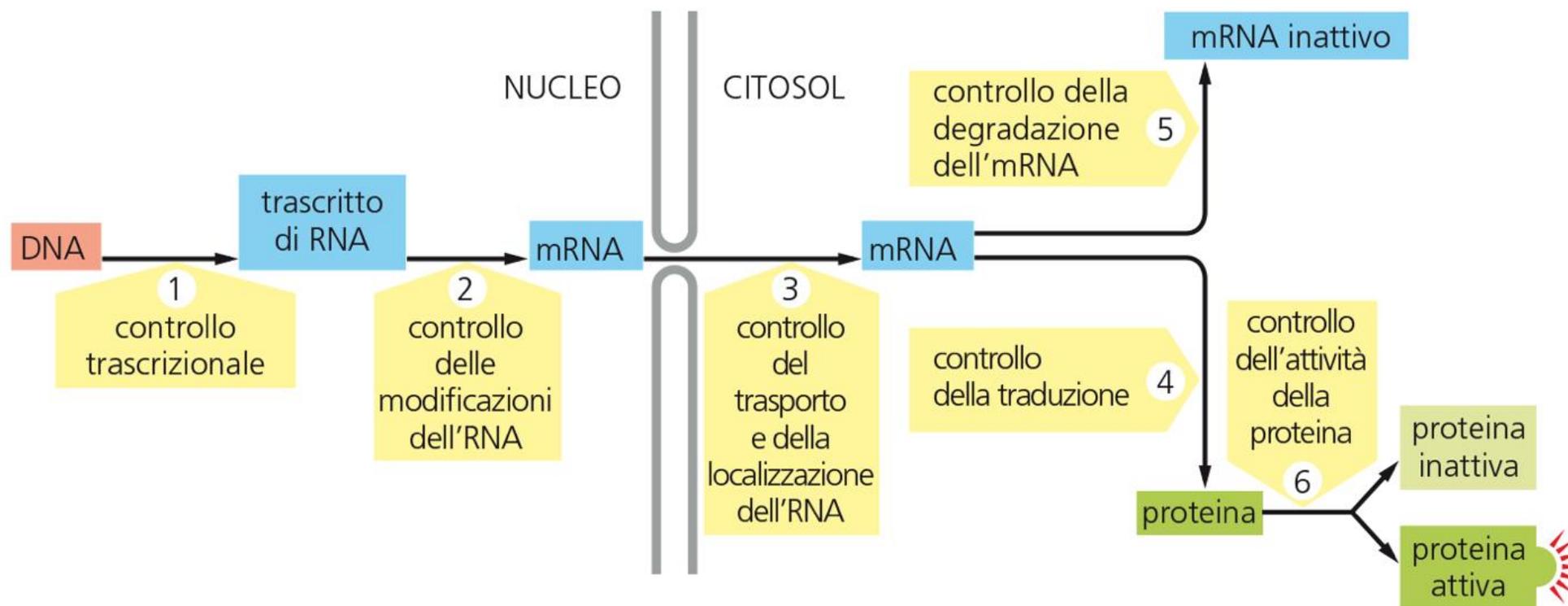


Il genoma è uguale in tutte le cellule.
Perché il profilo di espressione delle proteine è differente?

I geni presenti sul DNA sono espressi con diversa efficienza



Livelli di controllo dell'espressione genica negli eucarioti



Il controllo trascrizionale

1. Meccanismi epigenetici

- Metilazione del DNA
- Modificazione degli istoni

2. Fattori trascrizionali

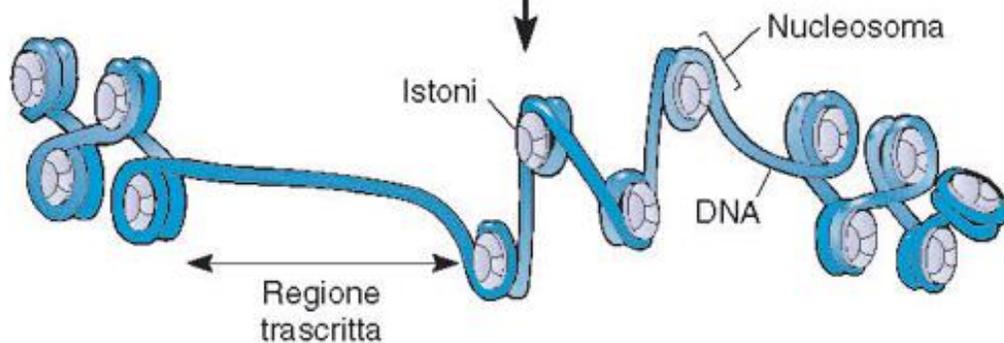
I due stati della cromatina



(a) Una regione di DNA inattiva. L'eterocromatina è organizzata in nucleosomi strettamente associati.

Eterocromatina: geni silenti

Decondensazione
della cromatina

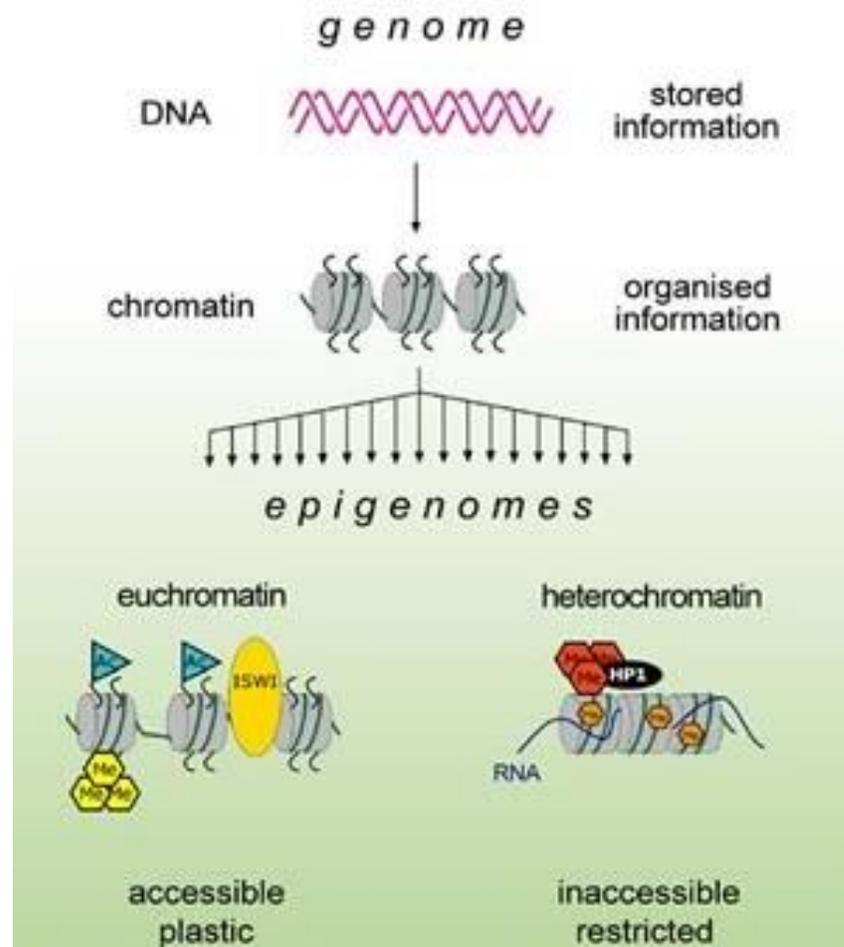


(b) I geni attivi sono associati alla cromatina decondensata (eucromatina). La eucromatina è più accessibile alla RNA polimerasi per la trascrizione di quella regione. Dove avviene la trascrizione, gli istoni sono fisicamente rimossi dal DNA.

Eucromatina: geni attivi

Meccanismi epigenetici

Costituiscono tutte le modifiche che il materiale genetico può subire durante la vita. Le modifiche epigenetiche determinano il rimodellamento della cromatina e quindi una maggiore o minore trascrizione di certe zone del genoma. Sono cambiamenti ereditari del genoma che non dipendono dalla sequenza di nucleotidi.



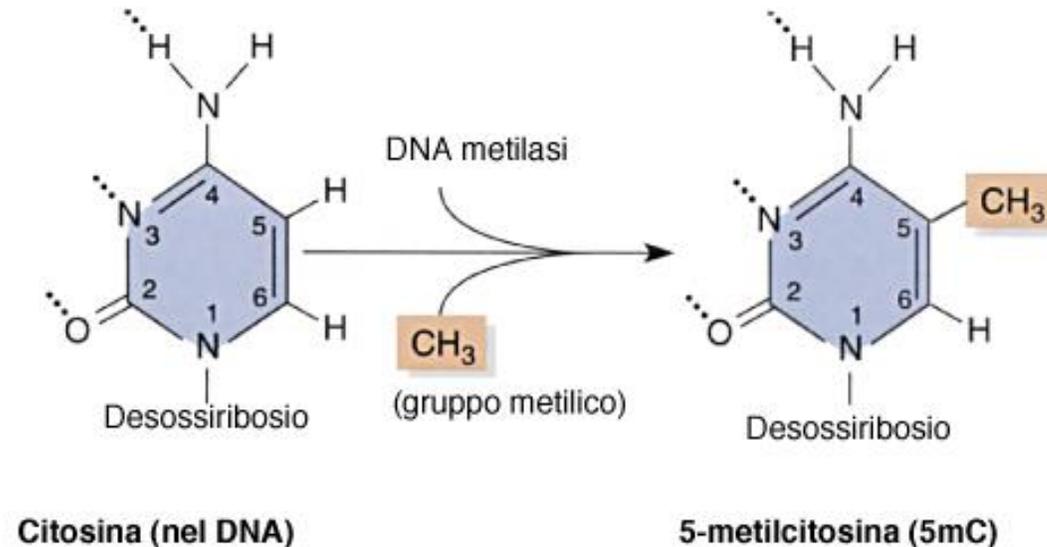
Meccanismi epigenetici:

1. La metilazione del DNA

La metilazione del DNA è un processo post-replicativo. L'estensione delle modificazioni riguardanti la metilazione del DNA è fondamentalmente decisa durante lo sviluppo. La metilazione del DNA è quindi uno dei meccanismi correlati con il differenziamento cellulare, generalmente inibisce l'espressione genica a livello trascrizionale.

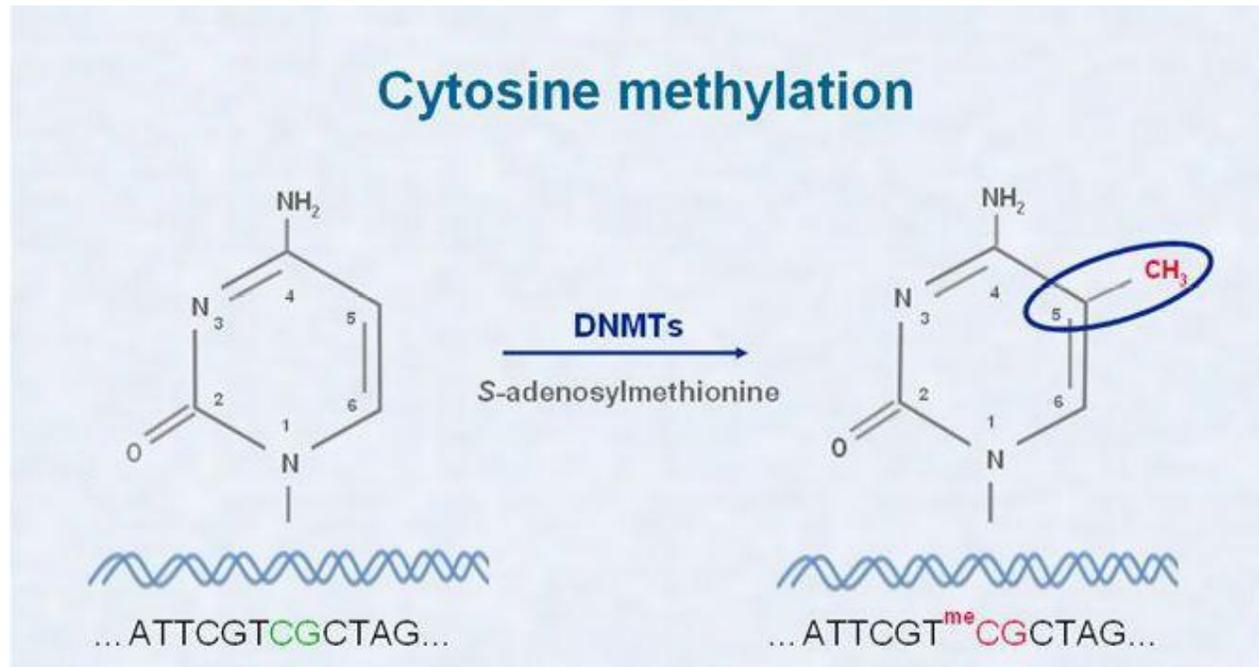
Figura 17.5

Produzione di 5-metilcitosina nel DNA per azione dell'enzima DNA metilasi.

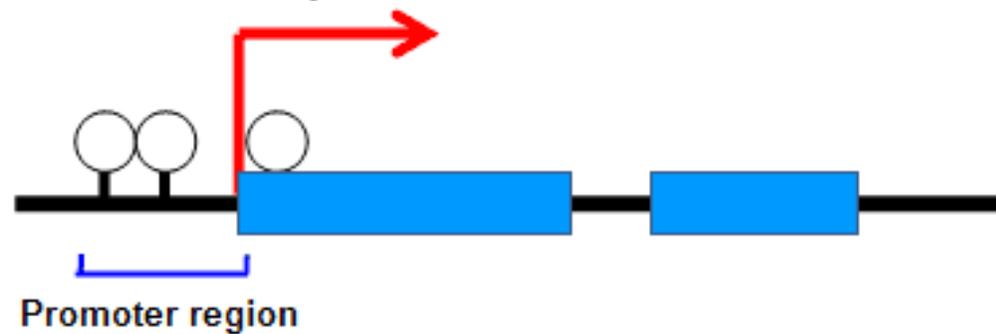


Le isole GpC

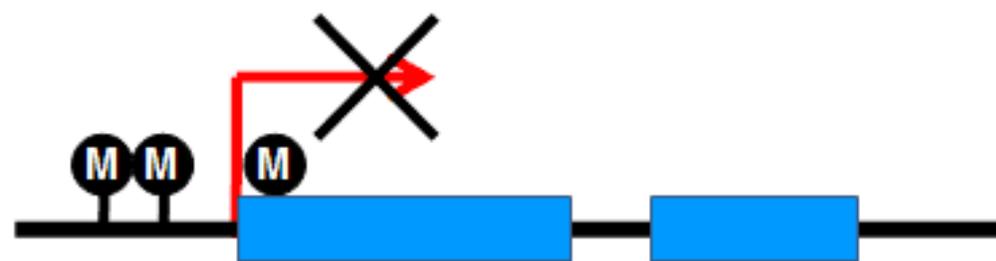
The CG island is a short stretch of DNA in which the frequency of the CG sequence is higher than other regions. It is also called the CpG island. (p è il gruppo fosfato che partecipa al legame fosfodiesterico)



Genes that can be expressed



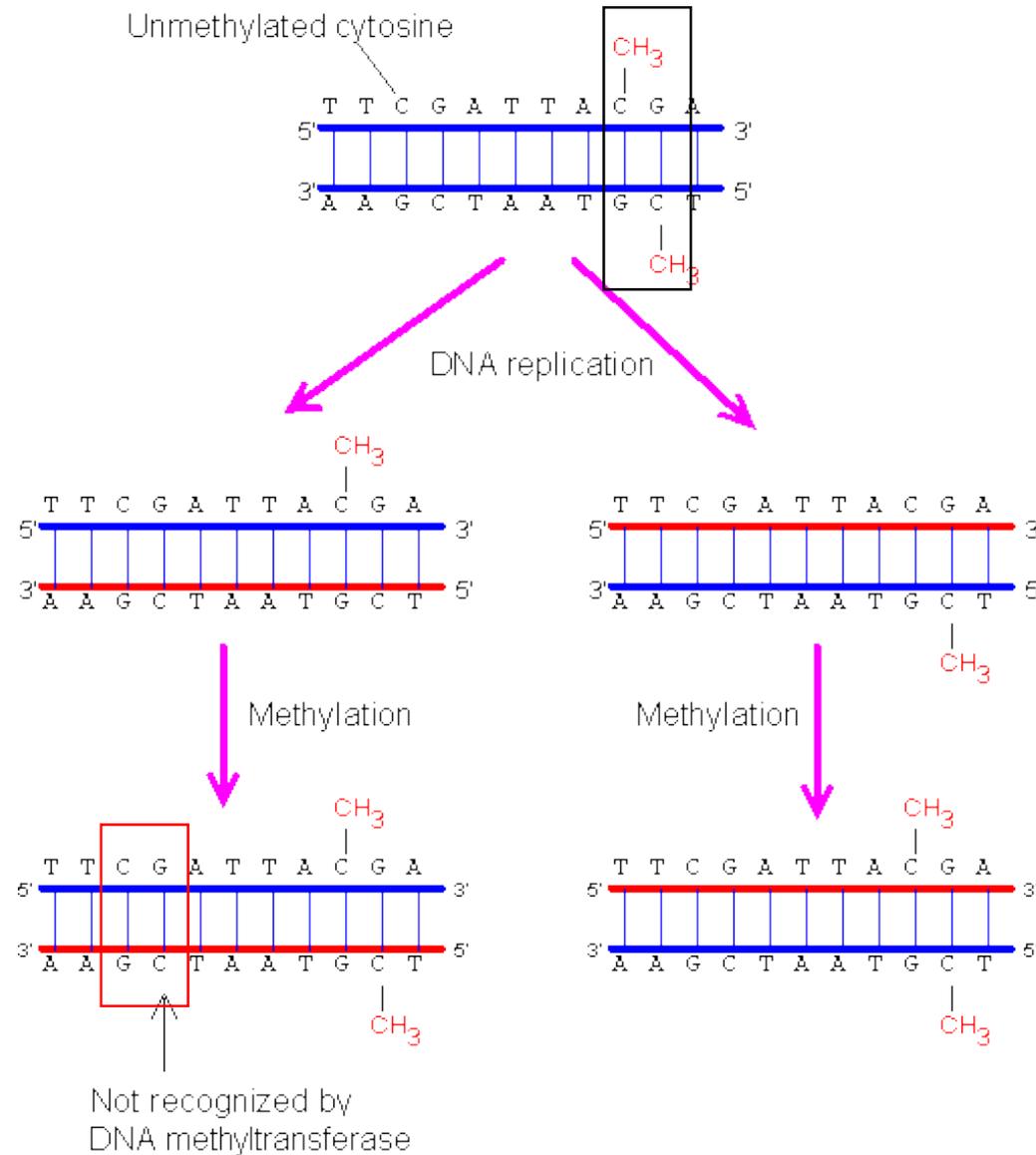
Genes inactivated by DNA methylation



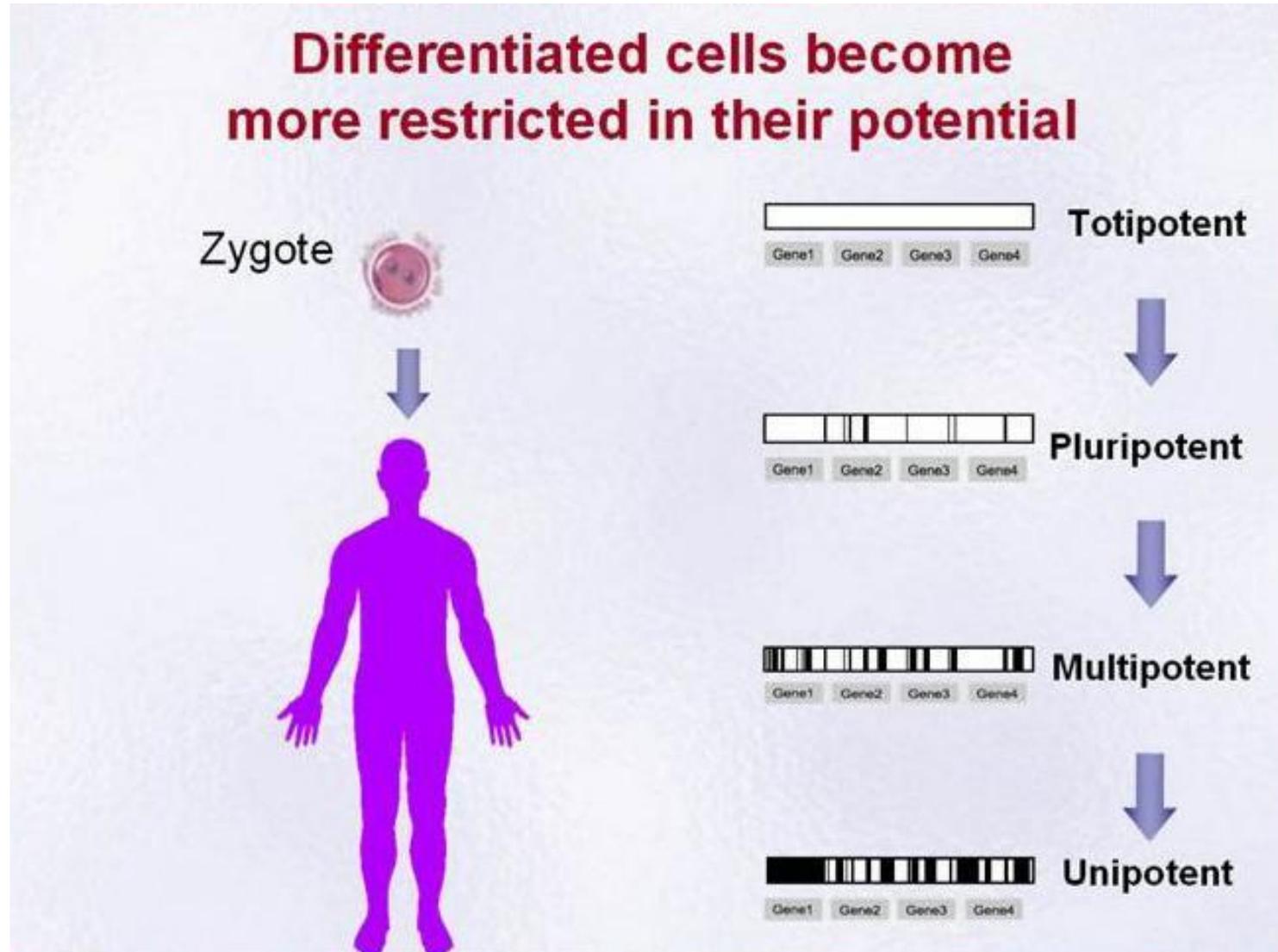
M Methylated

○ Unmethylated

La metilazione del DNA viene ereditata



Methylated DNA from zygote to Adult



DNA Methylation Differentiates Totipotent Embryonic Stem Cells from Unipotent Adult Stem Cells

DNA methylation

Pluripotent cell



```
ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacgggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccgagaggg
tgcagtgccaacaggctttgtggtgogatgggg
catccgagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
acccaaggcaggggtgagaggacctgaaggtt
gaaaatgaaggcctcctgggggtcccgctcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctcgtc
tggagacacaggcagatagcgctcgctcagt
ttctcccacccccacagctctgotcctccacc
accagggggcggggocagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaaccgt
cctaggtgagccgtctttccaccaggcccccg
ctcggggtgccaccttcccacatggctggacac
```

Unipotent cell



```
Ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacgggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccgagaggg
tgcagtgccaacaggctttgtggtgogatgggg
catccgagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
acccaaggcaggggtgagaggacctgaaggtt
gaaaatgaaggcctcctgggggtcccgctcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctcgtc
tggagacacaggcagatagcgctcgctcagt
ttctcccacccccacagctctgotcctccacc
accagggggcggggocagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaaccgt
cctaggtgagccgtctttccaccaggcccccg
ctcggggtgccaccttcccacatggctggacac
```

DNA Methylation Differentiates Totipotent Embryonic Stem Cells from Unipotent Adult Stem Cells

DNA methylation

Pluripotent cell



ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacggggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccgagaggg
tgcagtgccaacaggctttgtggtgcatgggg
catccgagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
accaaggcaggggtgagaggaccttgaagggt
gaaaatgaaggcctcctggggtcccgctcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctccgctc
tggaagacacaggcagatagcgcctcgctcagt
ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
accagggggcggggccagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaaccgt
cctaggtgagccgtctttccaccaggccccgg
ctcggggtgccaccttccccatggctggacac

Unipotent cell

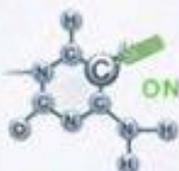


Ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacggggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccgagaggg
tgcagtgccaacaggctttgtggtgcatgggg
catccgagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
accaaggcaggggtgagaggaccttgaagggt
gaaaatgaaggcctcctggggtcccgctcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctccgctc
tggaagacacaggcagatagcgcctcgctcagt
ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
accagggggcggggccagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaaccgt
cctaggtgagccgtctttccaccaggccccgg
ctcggggtgccaccttccccatggctggacac

DNA Methylation Differentiates Totipotent Embryonic Stem Cells from Unipotent Adult Stem Cells

DNA methylation

Cytosine C

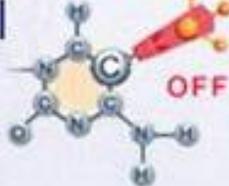


Pluripotent cell



≠

Methyl-Cytosine 5mC



Unipotent cell



ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcct
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacgggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccagagagg
tgcagtgccaacaggctttgtggtggatgggg
catccagcaactggtttgtgaggtgtccgggtg
acccaaggcaggggtgagaggaccttgaagggt
gaaaatgaaggcctcctgggggtcccggtcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctccgtc
tggaaacacaggcagatagcgtccgctcagt
ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
accagggggcggggccagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaacgt
cctaggtgagcgtctttccaccaggccccgg
ctgggggtgccaccttccc**atggctggacac**

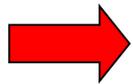
Ctggaggtgcaatggctgtcttgtcctggcct
ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
ctaggactctagacgggtgggtaagcaagaact
gaggagtggccccagaaataattggcacacgaa
cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
ggctgagtgggctgtaaggacaggccagagagg
tgcagtgccaacaggctttgtggtggatgggg
catccagcaactggtttgtgaggtgtccgggtg
acccaaggcaggggtgagaggaccttgaagggt
gaaaatgaaggcctcctgggggtcccggtcctaag
ggttgtcctgtccagacgtccccaacctccgtc
tggaaacacaggcagatagcgtccgctcagt
ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
accagggggcggggccagaggtcaaggctaga
gggtgggattggggagggagaggtgaaacgt
cctaggtgagcgtctttccaccaggccccgg
ctgggggtgccaccttccc**atggctggacac**

L'estensione delle modificazioni riguardanti la metilazione del DNA è fondamentalmente decisa durante lo sviluppo. La metilazione del DNA è quindi uno dei meccanismi correlati con il differenziamento cellulare, generalmente inibisce l'espressione genica a livello trascrizionale.

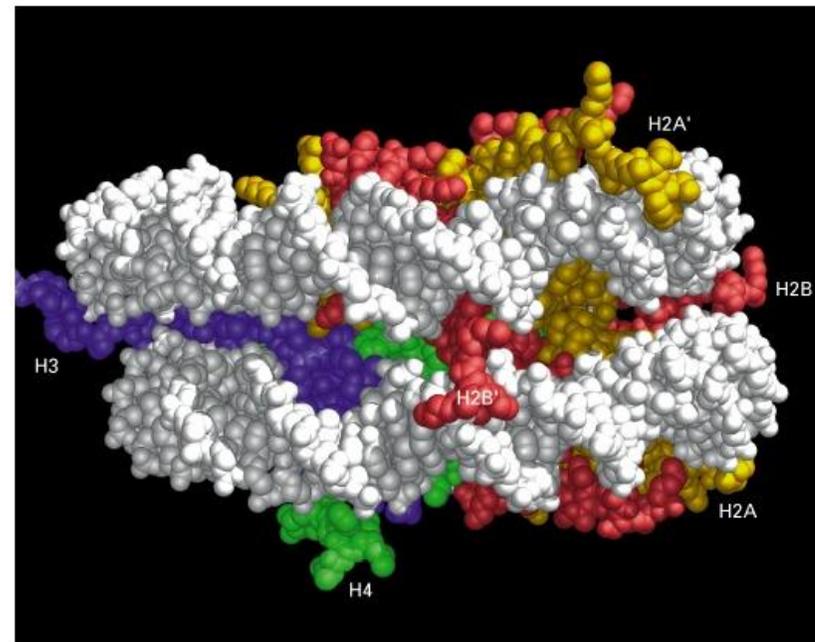
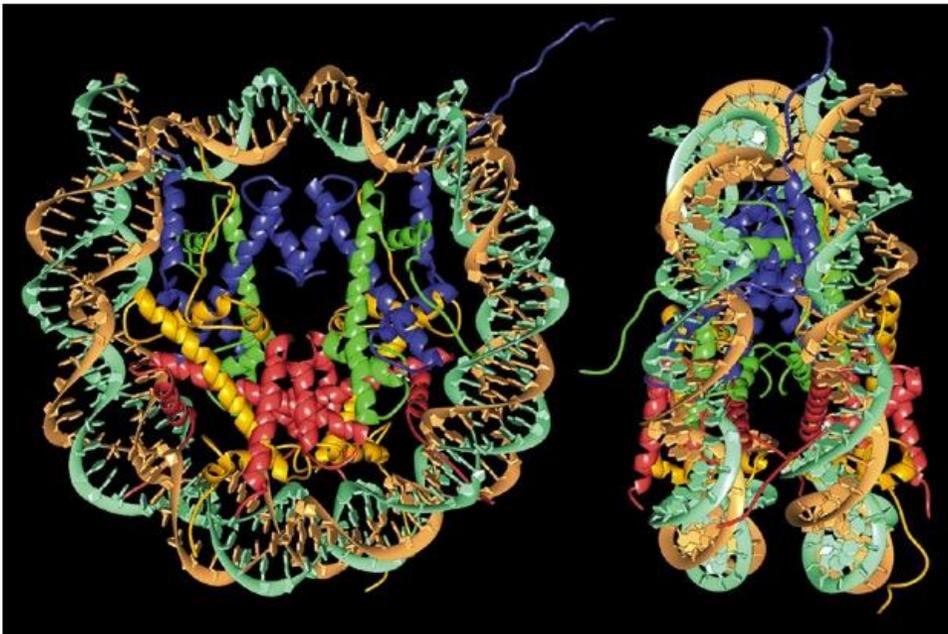
Meccanismi epigenetici:

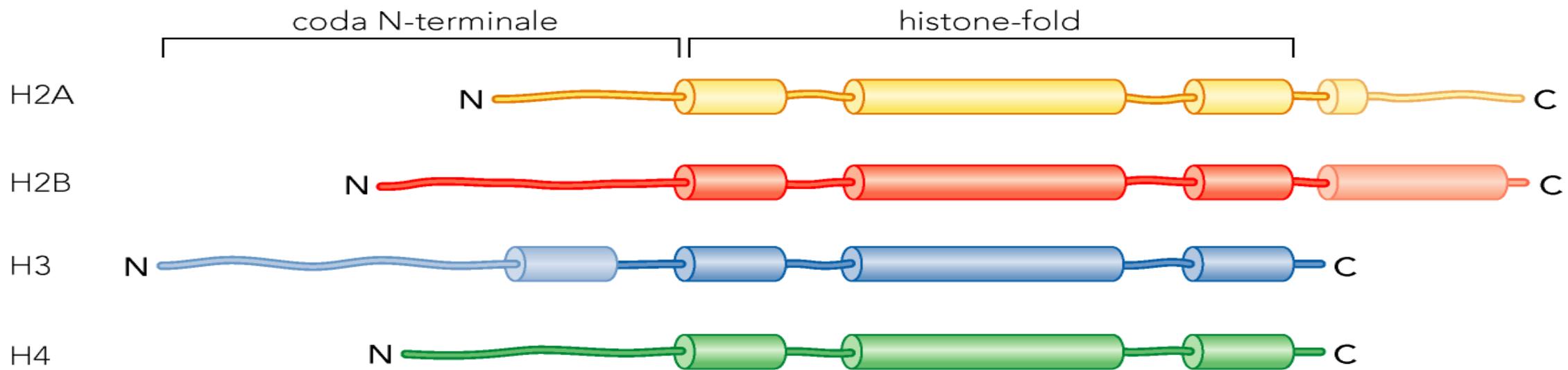
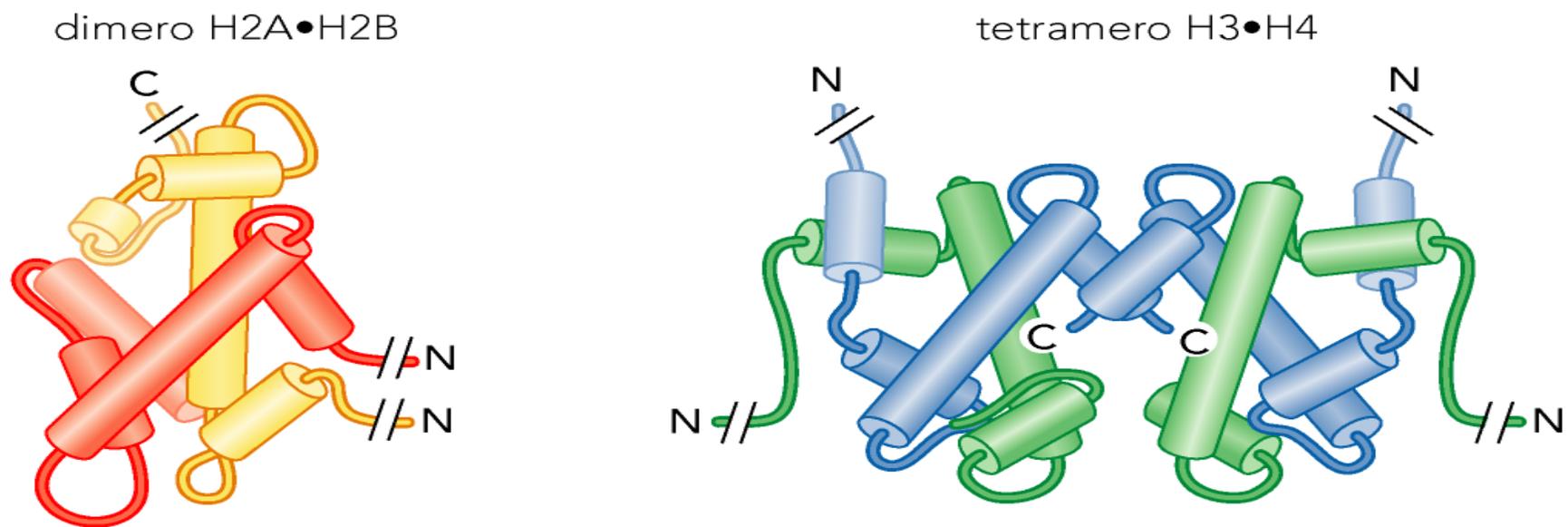
2. Le modificazioni chimiche degli istoni

I residui amminoacidici all'N-terminale di ciascun istone (20-60 residui) si estendono al di fuori della superficie del nucleosoma. Queste regioni possono essere reversibilmente modificate mediante acetilazione, fosforilazione e metilazione.

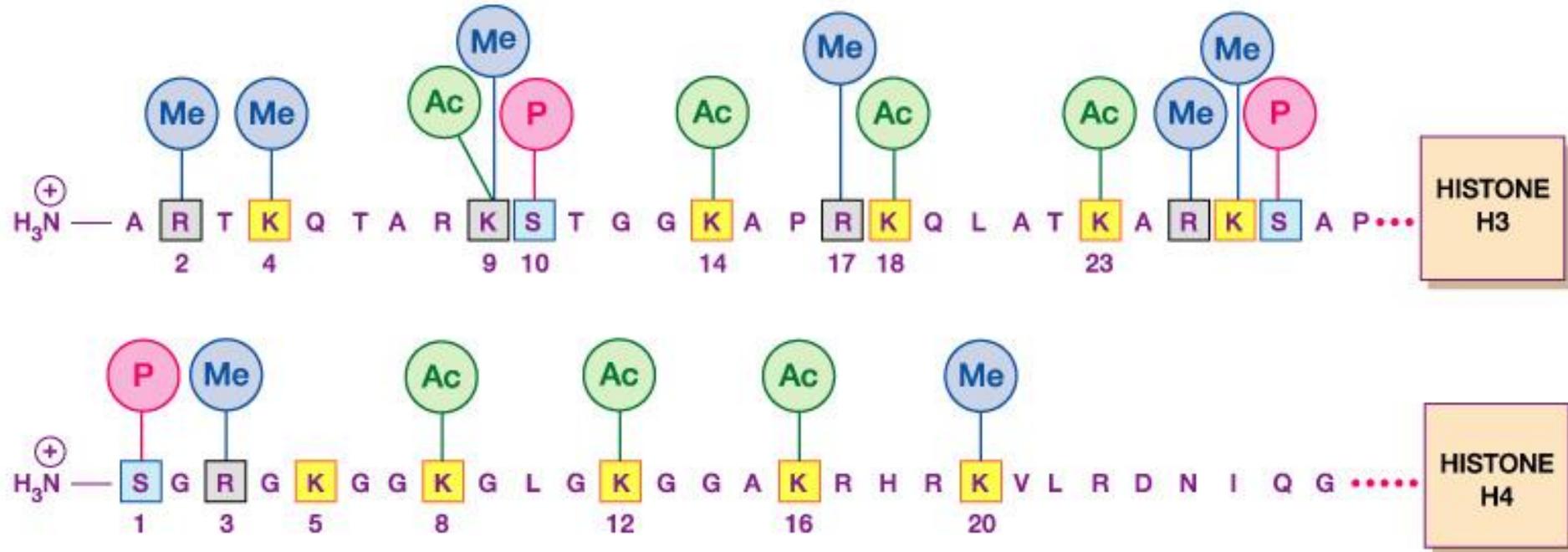


CODICE ISTONICO

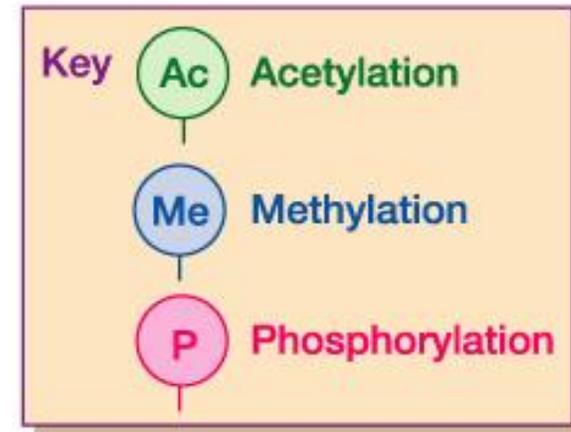


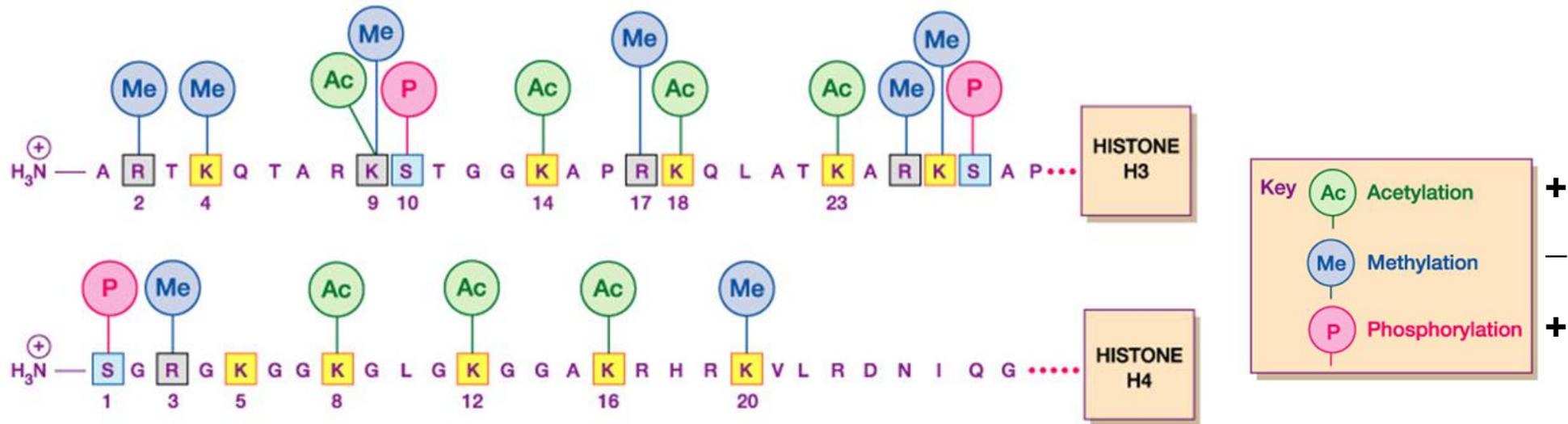
a**b**

Modificazioni degli istoni



R: ariginina
K: lisina
S: serina





Acetilazione avviene su residui di lisina (istone acetil-transferasi), attivano la trascrizione.

Rimozione acetilazione (istone deacetilasi), inibiscono la trascrizione

Metilazione (metil-transferasi) avviene su residui di lisina ed arginina, inibiscono la trascrizione

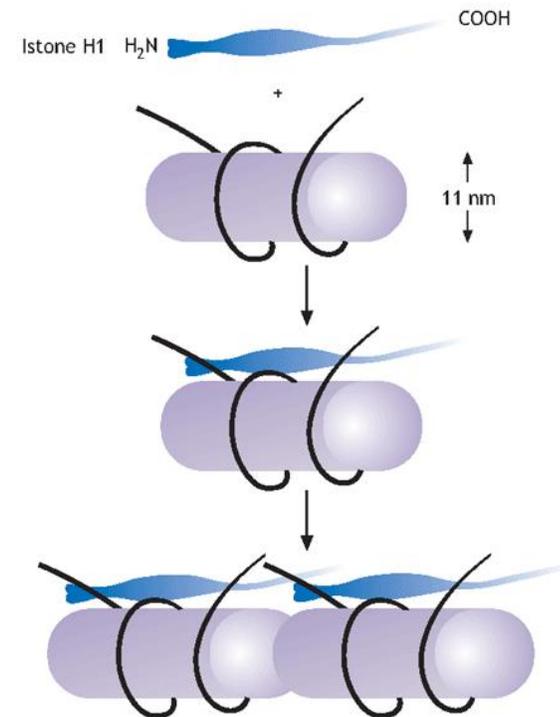
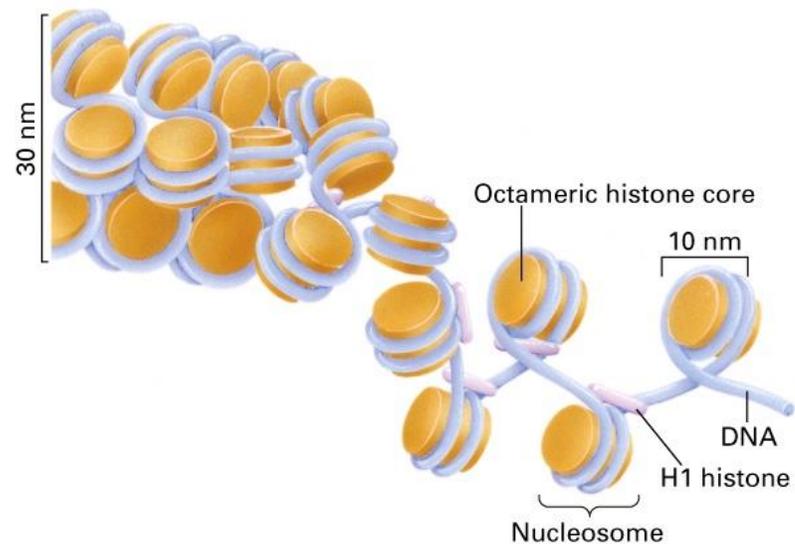
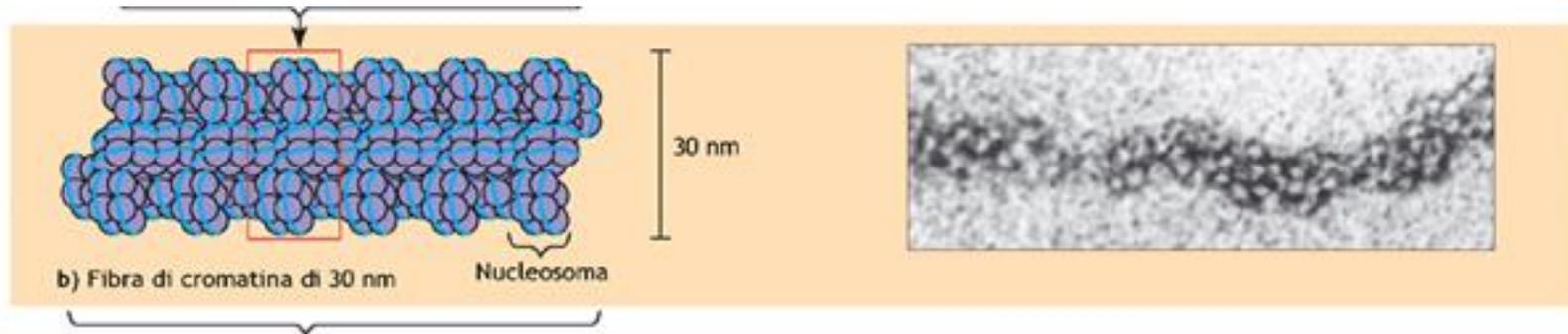
Fosforilazione (cinasi) avviene su residui di serina, favorisce l'acetilazione, cromatina altamente trascritta (per esempio durante la stimolazione mitogenica)

CARATTERISTICHE DELLA CROMATINA

Caratteristica	Cromatina attiva	Cromatina inattiva
Conformazione della cromatina	Estesa, aperta	Condensata
Metilazione del DNA	Poco metilata specialmente nelle regioni del promotore	Metilata
Acetilazione degli istoni	Istoni acetilati	Istoni non acetilati

Inoltre.....

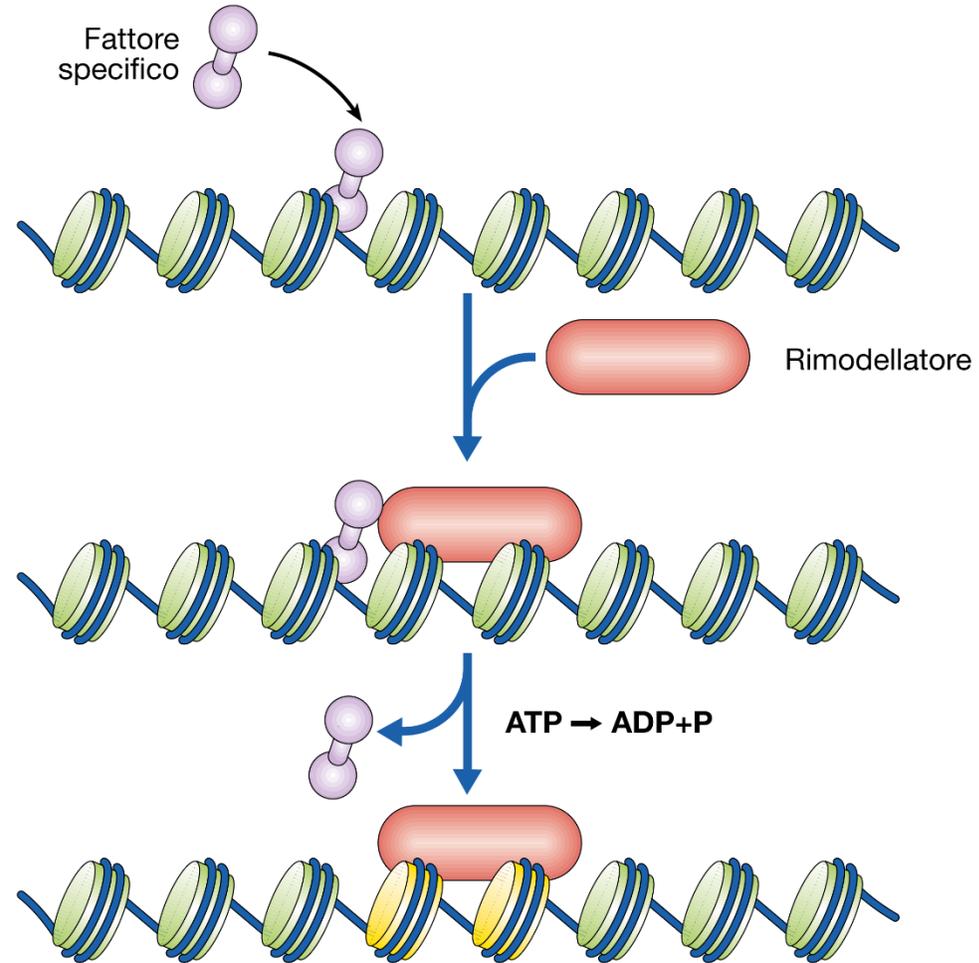
L'istone H1 necessario per l'organizzazione della fibra di 30nm è generalmente assente nella cromatina trascrizionalmente attiva



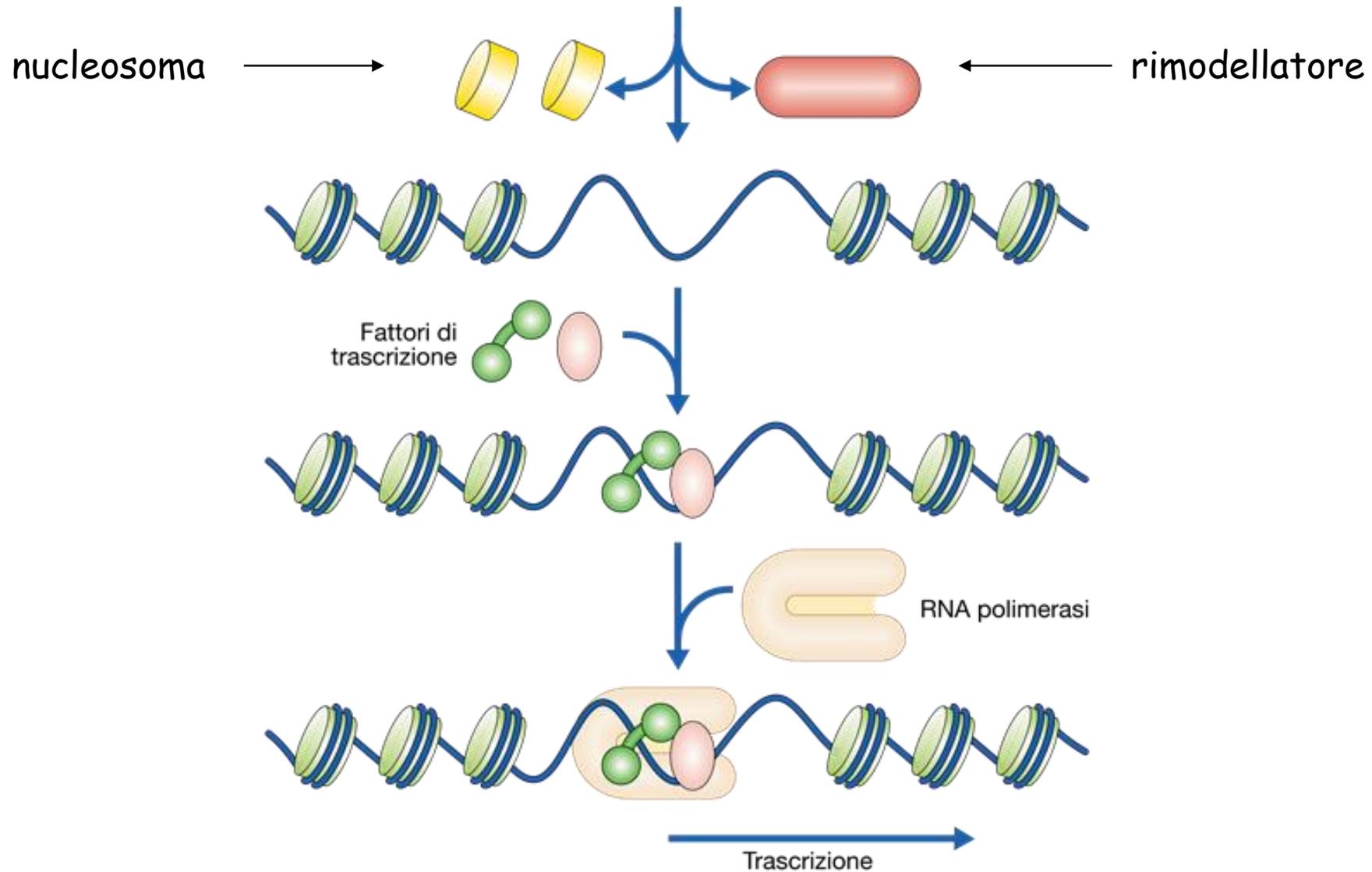
Complessi di rimodellamento ATP-dipendenti

I rimodellatori possono agire in due modi:

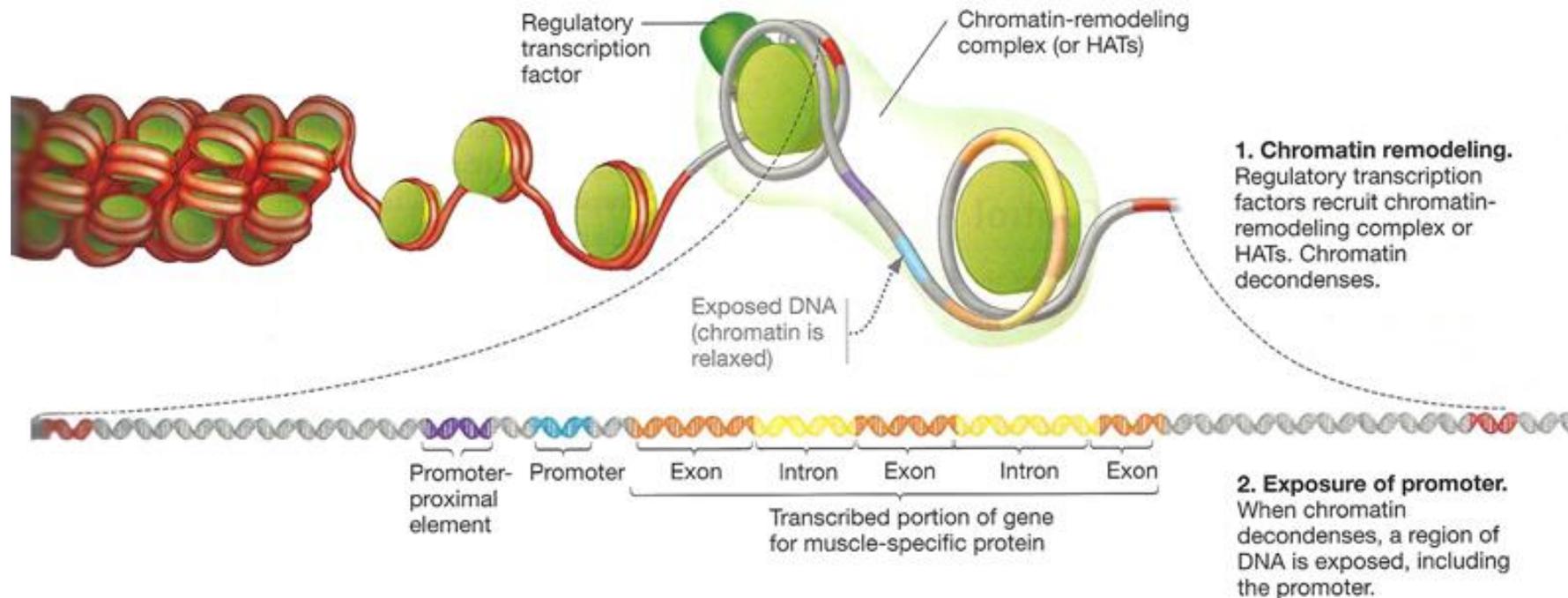
1. indurre il distacco tra il DNA e gli istoni
2. provocare uno scivolamento dell'istone sul DNA



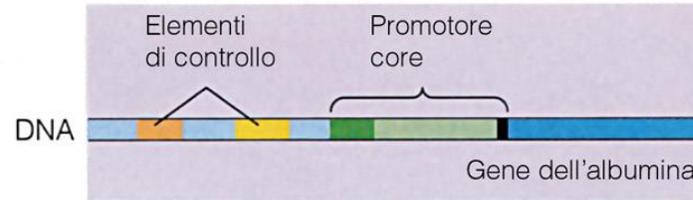
Complessi di rimodellamento ATP-dipendenti



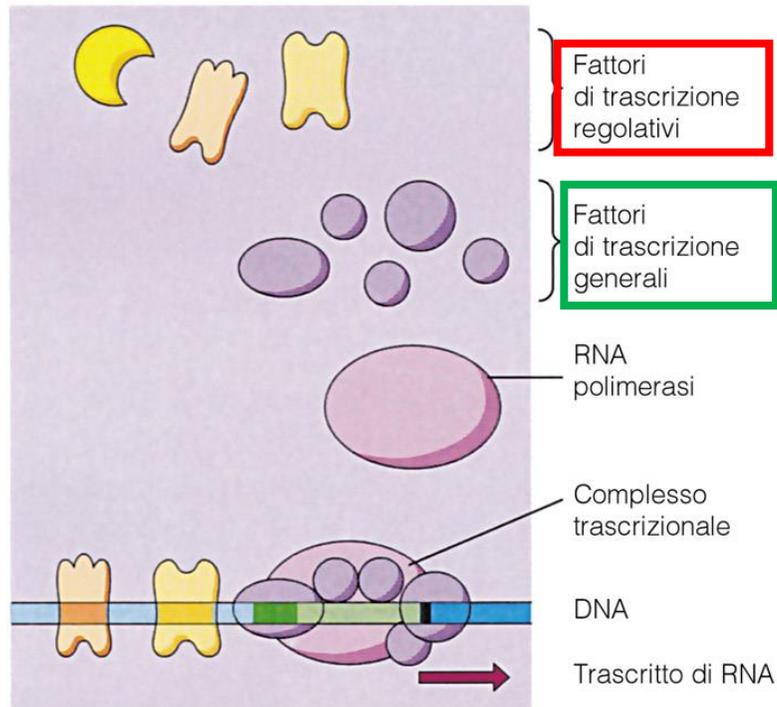
Il rimodellamento della cromatina espone il promotore di un gene che prima era complessato con gli istoni e quindi inaccessibile



I fattori trascrizionali

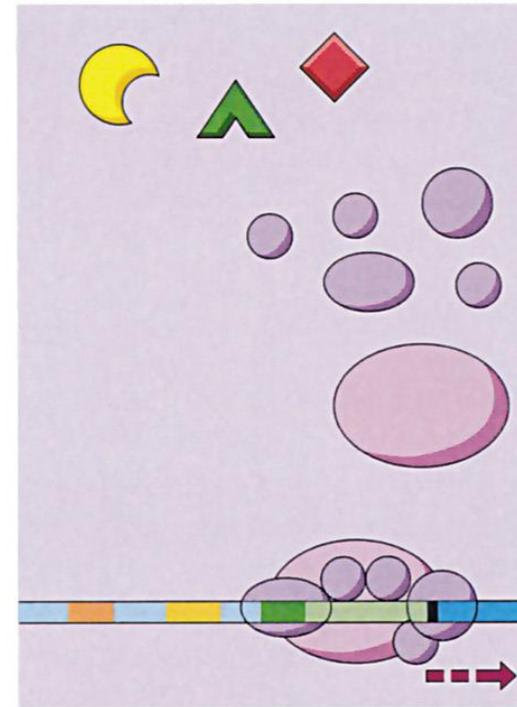


(a) Nucleo della cellula di fegato



Trascrizione del gene dell'albumina ad un livello alto

(b) Nucleo della cellula di cervello



Trascrizione del gene dell'albumina ad un livello molto basso (basale)

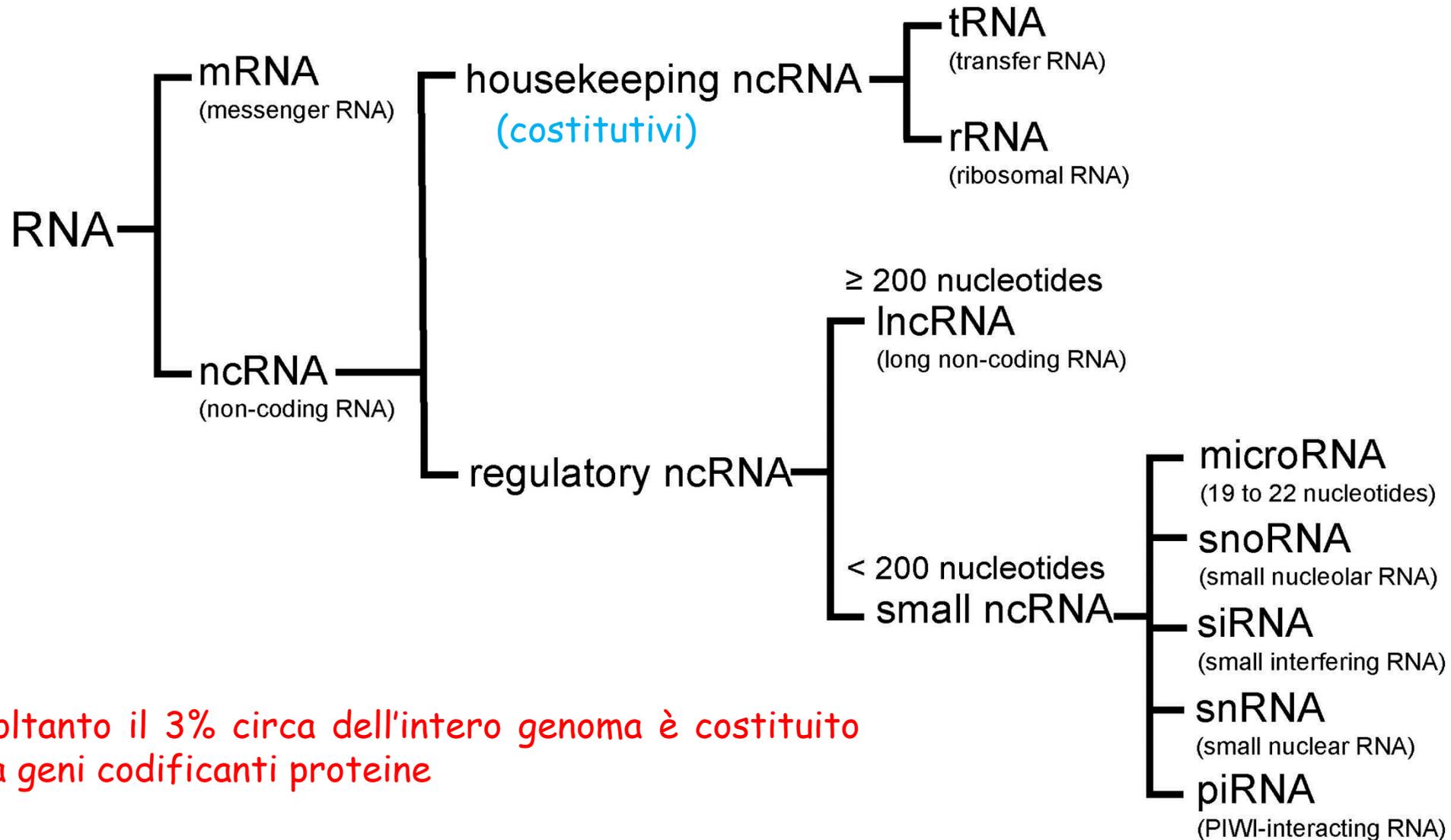
Fegato:

Alto livello di trascrizione

Cervello:

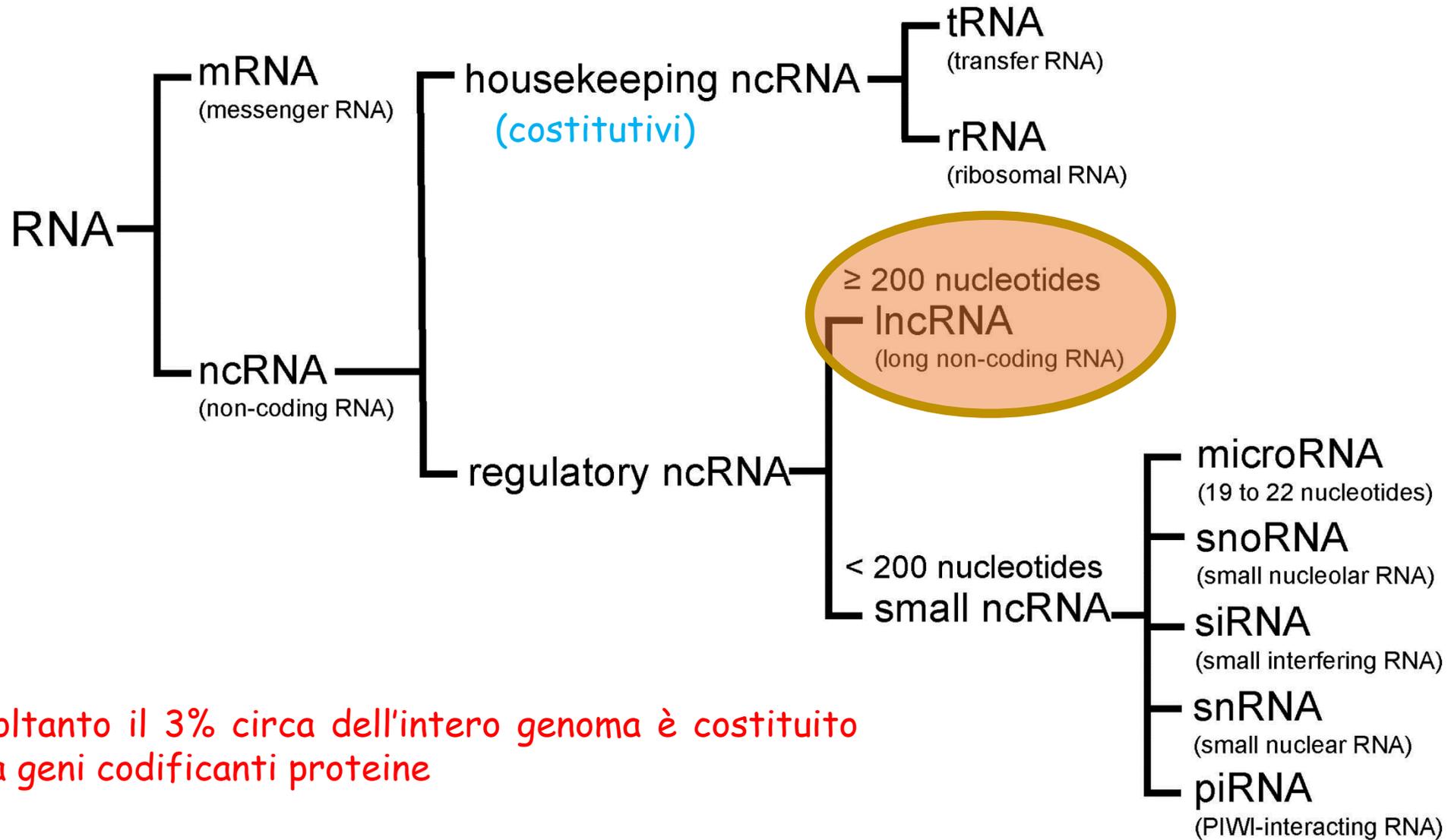
Basso livello di trascrizione

Il mondo a RNA



Soltanto il 3% circa dell'intero genoma è costituito da geni codificanti proteine

Il mondo a RNA



Soltanto il 3% circa dell'intero genoma è costituito da geni codificanti proteine

Caratteristiche dei LncRNA :

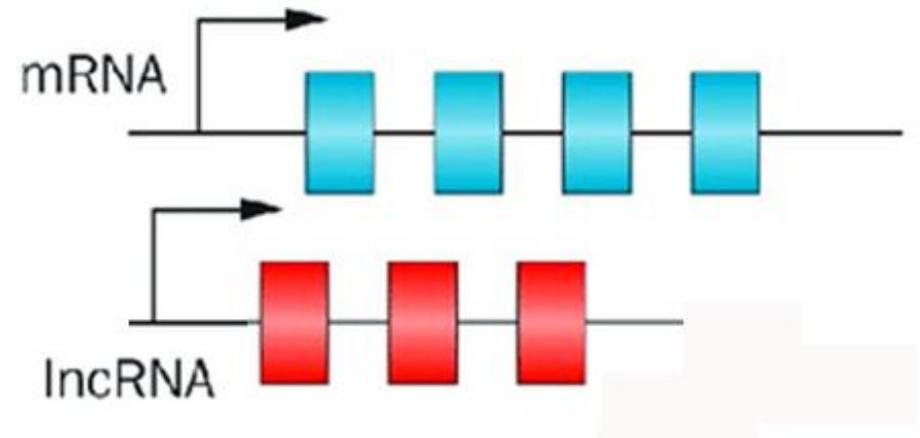
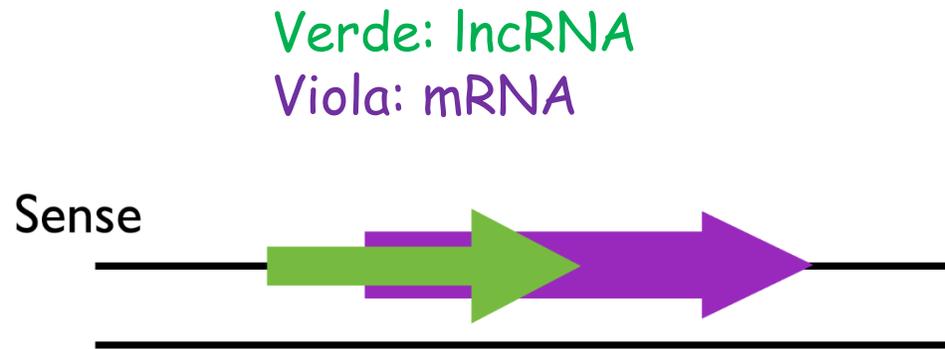
- Sono formati da piu' di 200 nucleotidi
- Sono trascritti dall'RNA polimerasi II
- Non contengono la regione codificante ma hanno il capping, sono poliadenilati
- Sono presenti ad un livello piu' basso degli mRNA
- Le sequenze nucleotidiche dei LncRNA non sono conservate tra le specie
- Le sequenze nucleotidiche del promotore di LncRNA sono molto ben conservate
- Sono tessuto specifici

Biogenesi dei lncRNA

Sono classificati sulla base della loro posizione nel DNA:

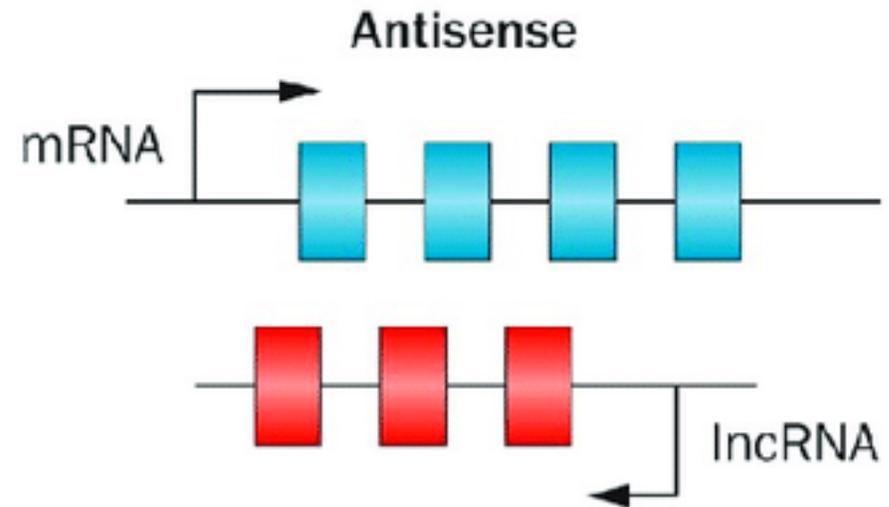
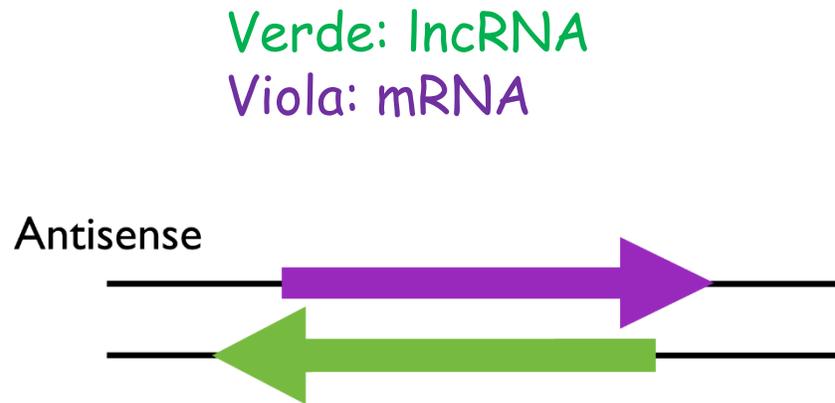
1. Senso
2. Antisenso
3. Intronici
4. Intergenici
5. Bidirezionali o divergenti
6. Enhancer

1. lncRNA senso



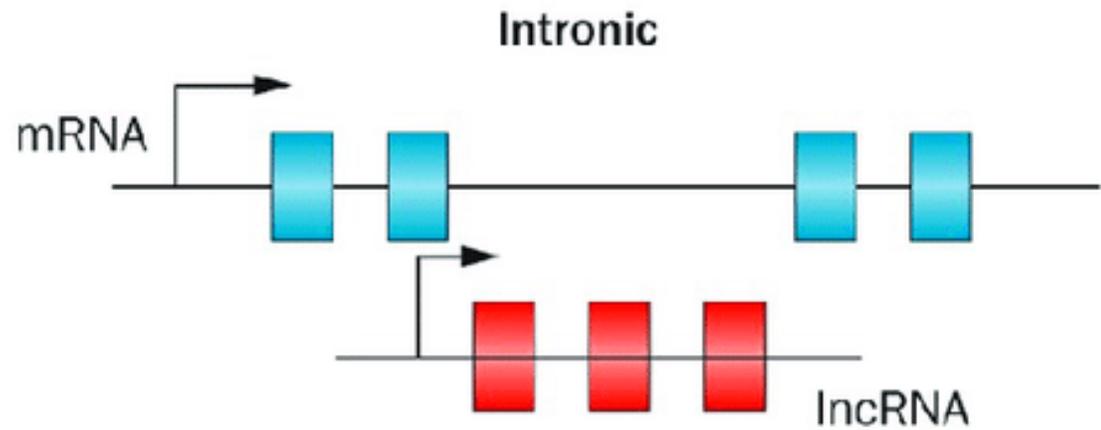
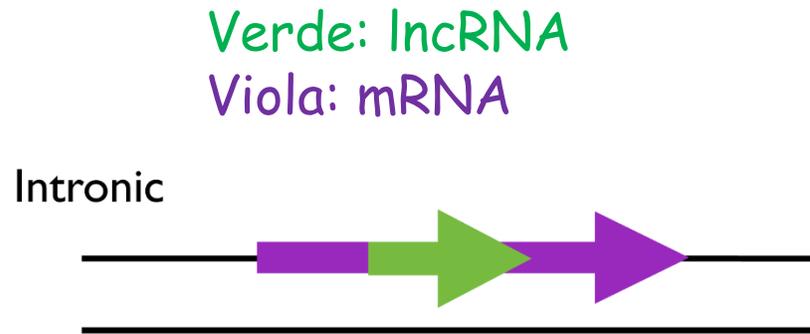
Il lncRNA si sovrappone alla sequenza codificante di un mRNA

2. lncRNA antisense



Il lncRNA coincide con il filamento antisense di un mRNA

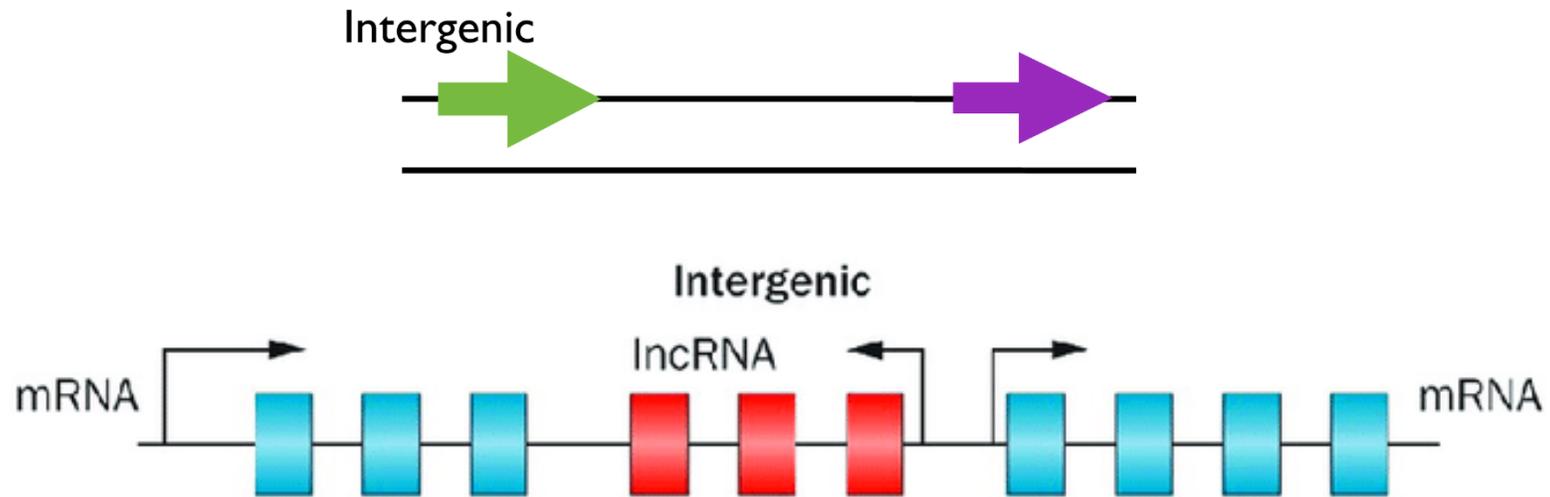
3. lncRNA intronici



Il lncRNA deriva da un introne di un mRNA

4. lncRNA intergenico

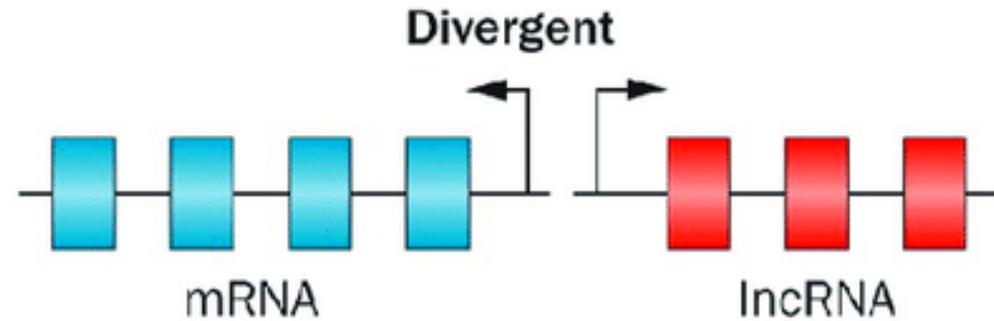
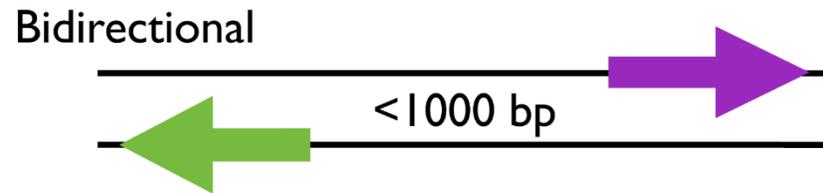
Verde: lncRNA
Viola: mRNA



Il lncRNA è lontano da qualsiasi sequenza codificante

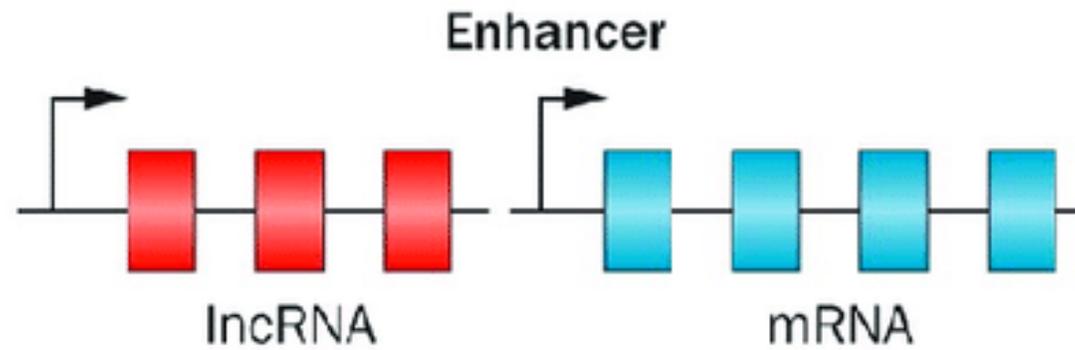
5. lncRNA divergente o bidirezionale

Verde: lncRNA
Viola: mRNA



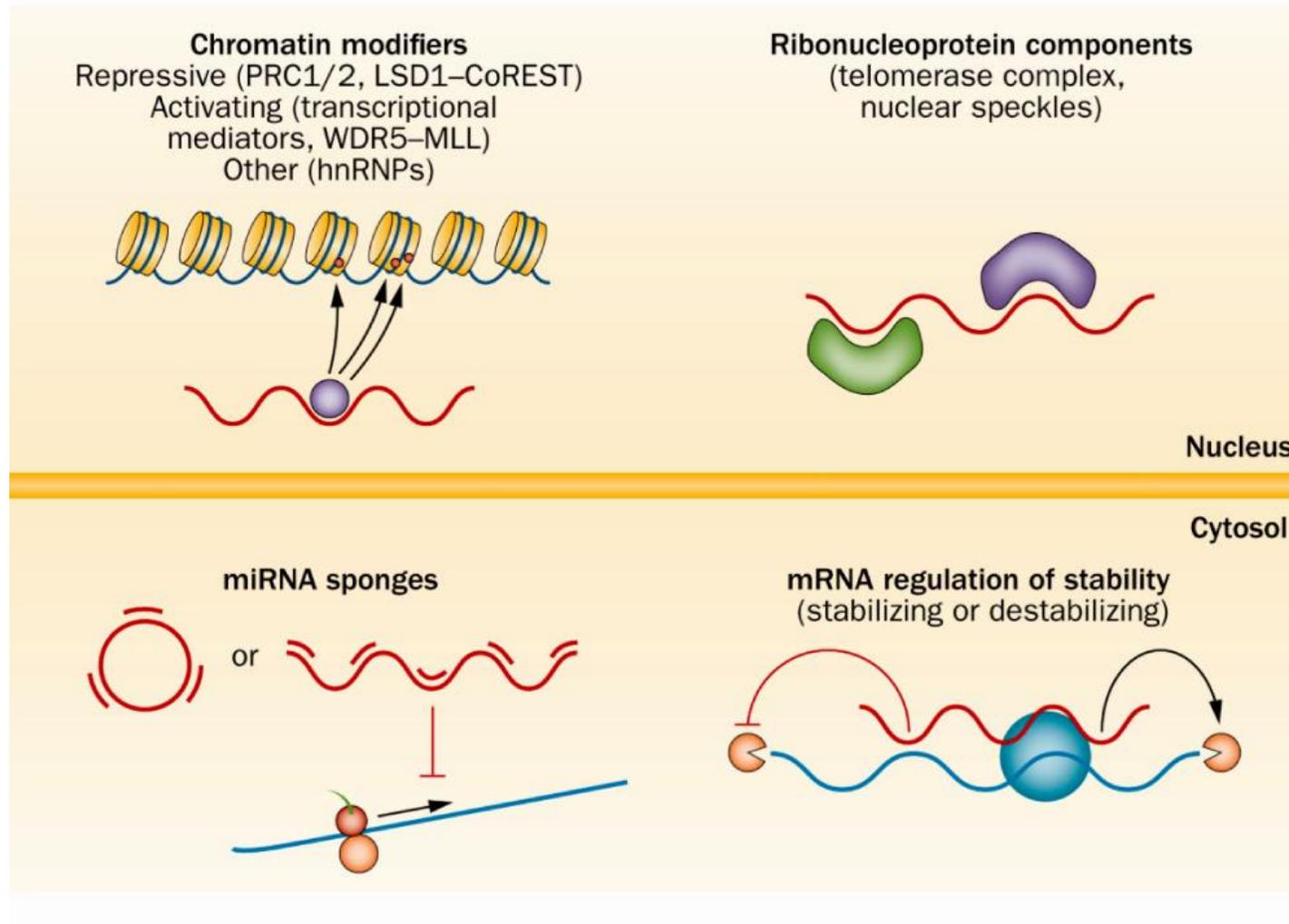
Il lncRNA è trascritto in senso opposto a quello di un mRNA. lncRNA e mRNA sono distanziati.

6. lncRNA enhancer



Il lncRNA deriva da una regione di DNA con funzione di enhancer

Sulla base della loro localizzazione cellulare i lncRNA sono suddivisi in **nucleari** e **citosolici**. Alcuni lncRNA sono stati trovati in entrambi i compartimenti.



Nucleo

1. I lncRNA **reclutano e guidano gli enzimi coinvolti nelle modifiche epigenetiche degli istoni** in un sito genico specifico. La modulazione dello stato della cromatina dovuto all'azione di questi enzimi porta all'attivazione o all'inibizione della trascrizione di quel determinato gene.
2. I lncRNA si legano a proteine che sono coinvolte nella trascrizione. Il legame dei lncRNA può:
 - **Attivare** la trascrizione di un determinato gene: sono reclutate proteine che permettono il legame dei fattori trascrizionali al promotore del gene
 - **Inibire** la trascrizione di un determinato gene
3. I lncRNA si legano ai **fattori trascrizionali** bloccando il loro legame al promotore del gene da trascrivere.

Citoplasma

- modifica la stabilità del mRNA
- regolano la traduzione di un mRNA
- Interagiscono con i miRNA e cooperano con loro nella regolazione post-trascrizionale

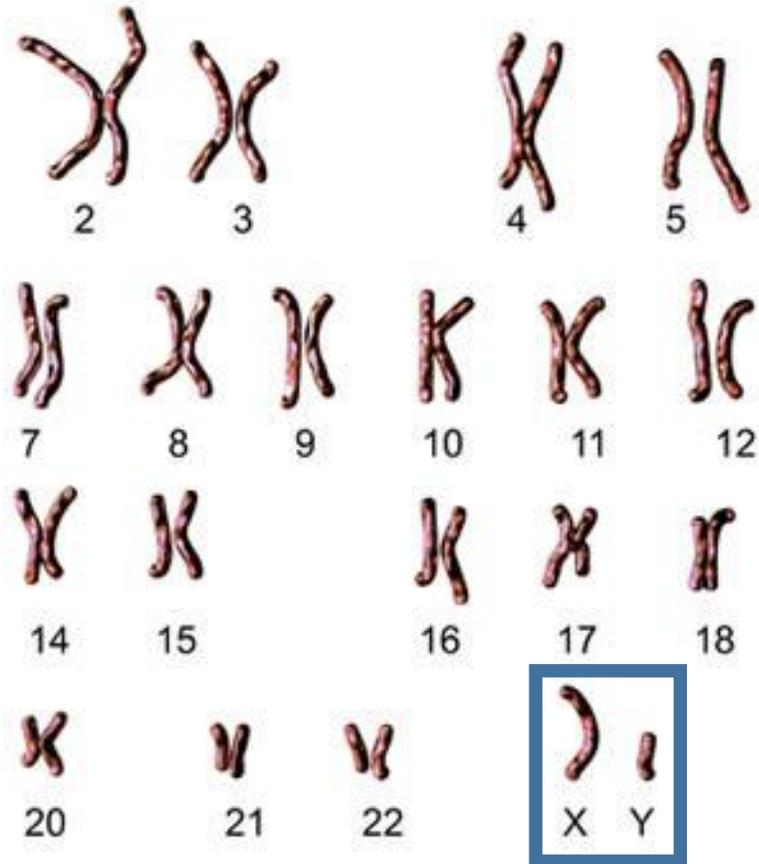
La funzione della maggior parte dei lncRNA scoperti non è nota, mentre la funzione di altri è molto studiata e ben conosciuta.

I lncRNA piu' noti sono:

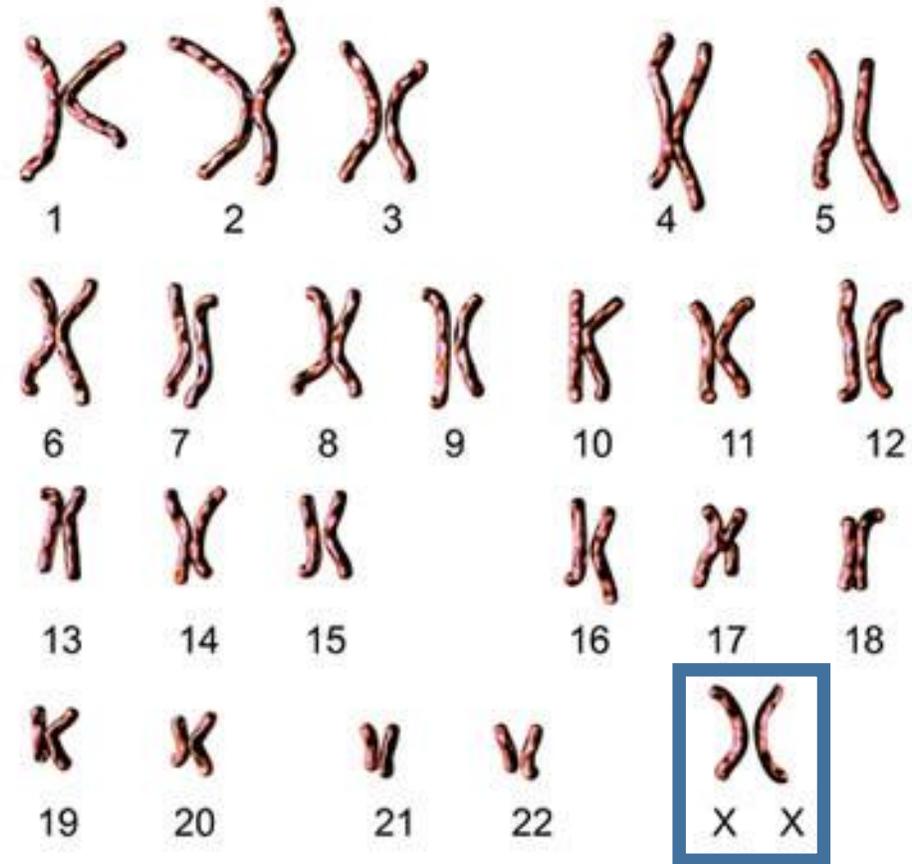
1. **XIST** (lncRNA coinvolto nell'inattivazione di un cromosoma X)
2. **HOTAIR** (lncRNA antisenso del gene HOX)
3. **TERRA** (lncRNA contenente regioni ripetute telomeriche)

Il cariotipo umano

(assetto cromosomico umano)



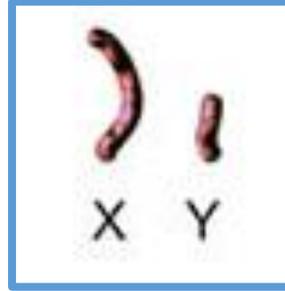
Cariotipo Normale Maschile



Cariotipo Normale Femminile

1. L'inattivazione di un cromosoma X

Differenze tra il cromosoma X ed il cromosoma Y



1. Hanno differente lunghezza, quindi contengono un numero di geni differenti
2. Il cromosoma Y presenta per lo più i geni codificanti per il differenziamento dei caratteri sessuali maschili primari (gonadi maschili, apparato riproduttore) e secondari (barba, tono di voce, ecc.)
3. Il cromosoma X presenta geni codificanti per i caratteri sessuali primari e secondari e geni necessari alla sopravvivenza cellulare.

Richiede pertanto un cosiddetto **meccanismo di compensazione del dosaggio**



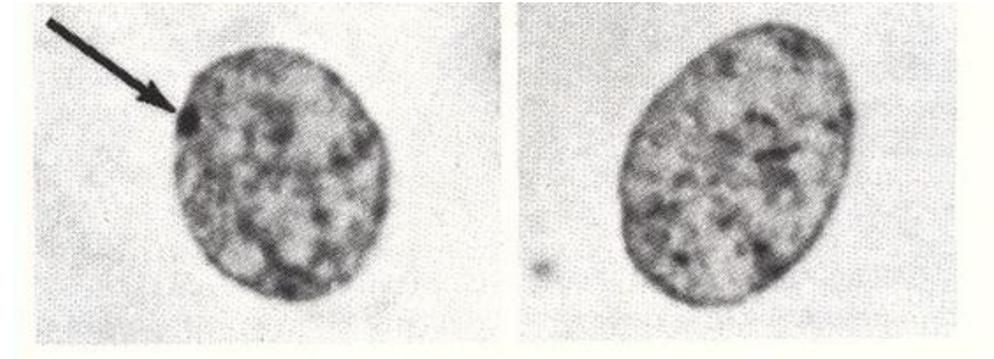
Inattivazione di uno dei due cromosomi X nelle femmine

L'inattivazione di un cromosoma X

Fenomeno scoperto da Mary Lyon nel 1961 (da cui il nome di effetto Lyon o Lyonizzazione)

Mary Lyon individuò nelle cellule di provenienza femminile, una caratteristica istologica: un corpo denso all'interno del nucleo. Questo era il cromosoma X inattivo (corpo di Barr).

Il corpo di Barr è visibile nel nucleo interfase di cellule di un individuo femminile come una massa scura addossata alla membrana nucleare



femmina

maschio

L'inattivazione del cromosoma X è esclusivamente somatico: nei tessuti germinali, per una corretta gametogenesi si esprimono entrambi i cromosomi X.

Quale dei due cromosomi X rendere inattivo è una scelta **casuale**

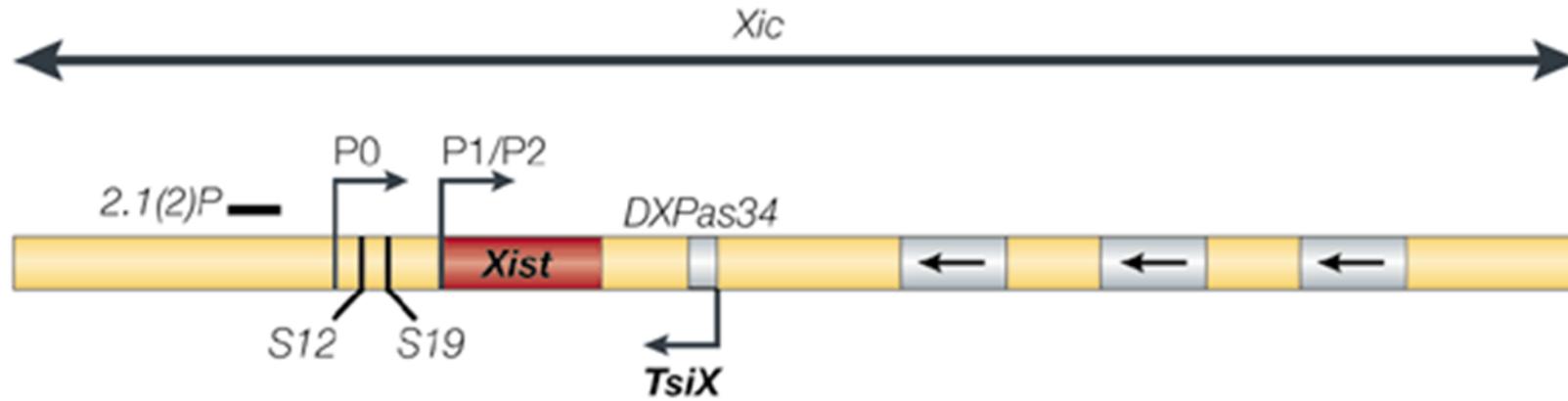
Quando lo zigote si trova allo stato di morula (circa venti cellule) entra in funzione il meccanismo di inattivazione. In ciascuna cellula viene inattivato casualmente uno dei due cromosomi. Ogni cellula agisce **indipendentemente** da tutte le altre, e questo crea appunto l'assetto a mosaico di ciascun individuo di sesso femminile. Una volta che queste cellule avranno inattivato un cromosoma X, tutte le cellule figlie avranno lo stesso X inattivato.



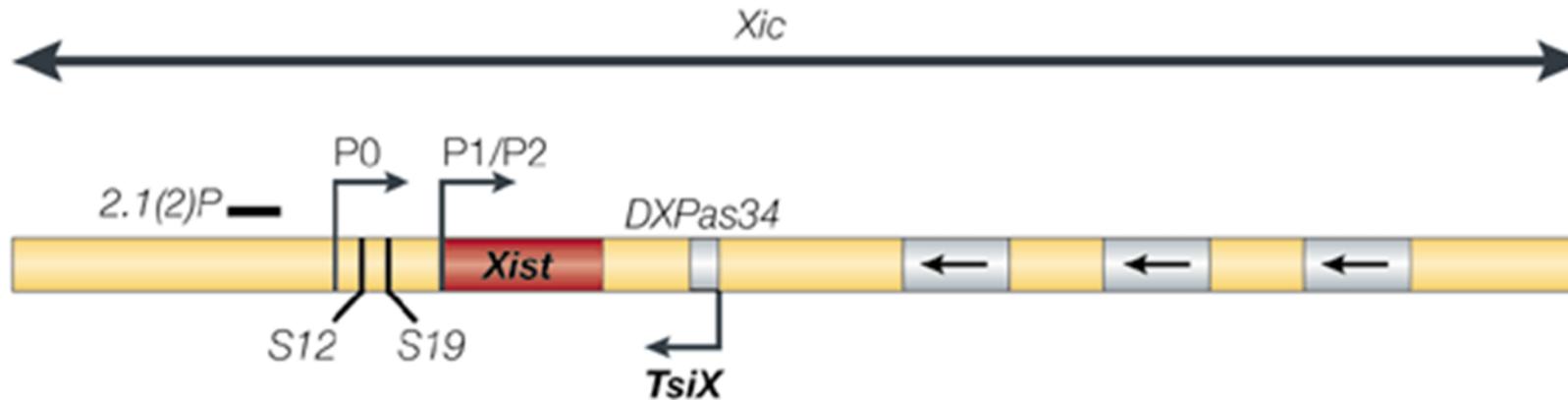
Questo fenomeno si può osservare in ogni mammifero di sesso femminile ed è particolarmente evidente nelle gatte caliche che hanno una diversa espressione del gene "colore del pelo" a seconda di quale dei due cromosomi X è attivo in una determinata cellula, dando così il tipico pelo a macchie, caratteristico di queste gatte.

Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X

Nei mammiferi l'inattivazione del cromosoma X è controllata da un **gruppo di lncRNA** trascritti dal cosiddetto **centro di inattivazione dell'X** (Xic) presente sul cromosoma X.



Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X



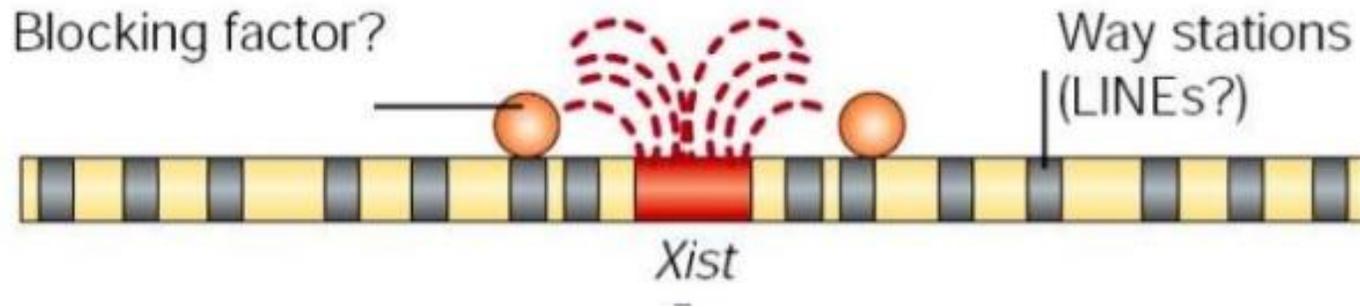
Xic contiene due geni:

- Il gene **Xist**, detto inattivo, che produce un trascritto detto **Xist**
- Il gene **TsiX**. TsiX è trascritto con un orientamento antisenso rispetto a Xist.
- TsiX è presente quando Xist è assente, quindi TsiX ha un profilo di espressione opposto a Xist. **Mediante un meccanismo ancora non molto chiaro, TsiX non permette l'espressione del gene Xist.**

Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X

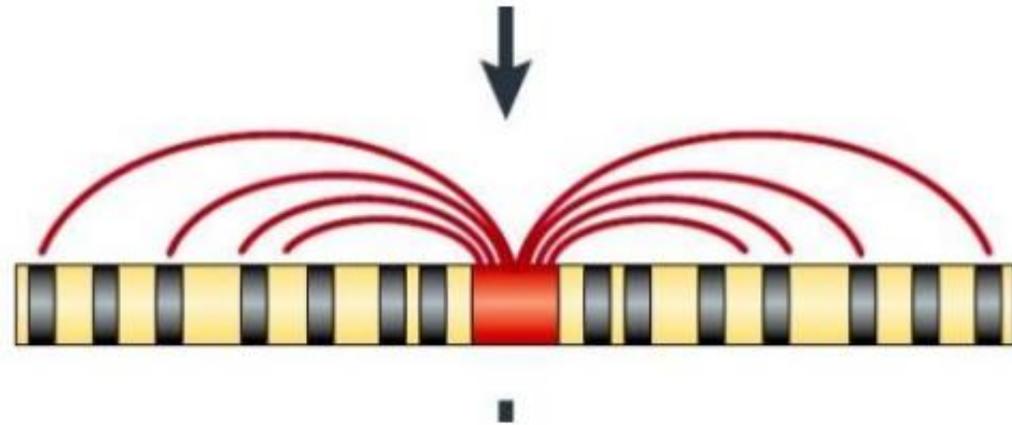
XIST transcripts remains in the nucleus.

While *Xist* is being transcribed, blocking factors prevent the association with X chromosome.



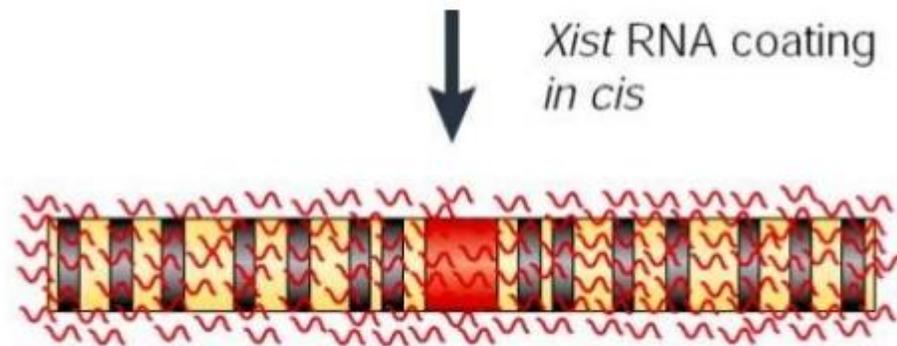
Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X

Blocking factors are released, Xist RNA is stabilized and upregulated.



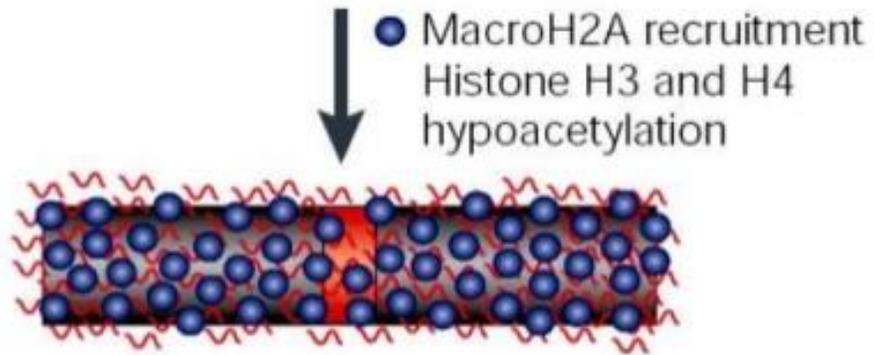
Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X

Before inactivation the X chromosome coated with stabilized Xist RNA.



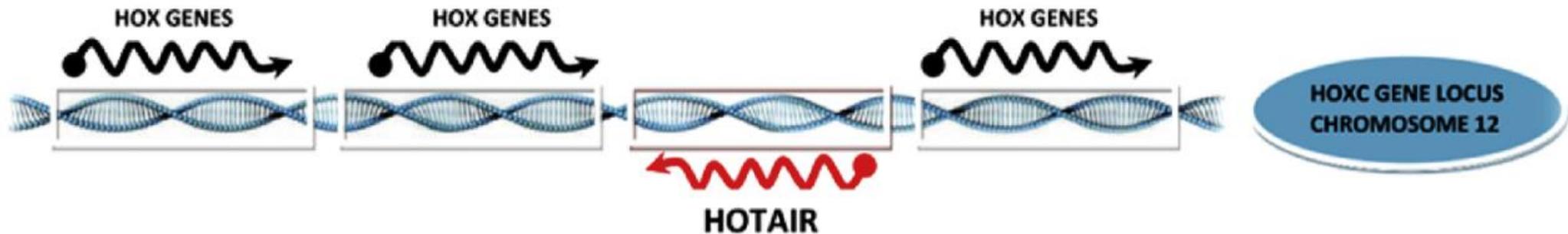
Il meccanismo molecolare alla base dell'inattivazione del cromosoma X

Chromatin modifications, including histone deacetylation and methylation of promoters of X-linked.



2. HOTAIR

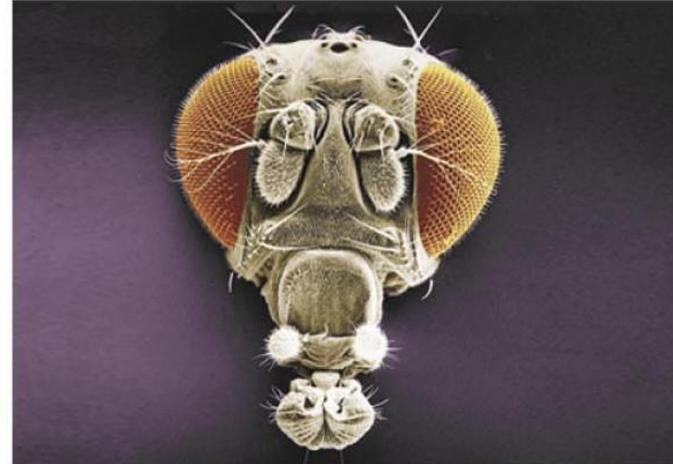
Sul cromosoma 12 sono localizzati i geni HOX responsabili del corretto orientamento testa-coda di un organismo durante lo sviluppo embrionale. Codificano fattori trascrizionali contenenti un dominio detto homeobox con cui si legano al DNA. I geni HOX sul DNA si trovano in cosiddetti «clusters» (a gruppi).



Sullo stesso cromosoma, tra il gruppo dei geni HOX è situato il gene HOTAIR. HOTAIR è un gene per un **lncRNA antisense** ben conosciuto.



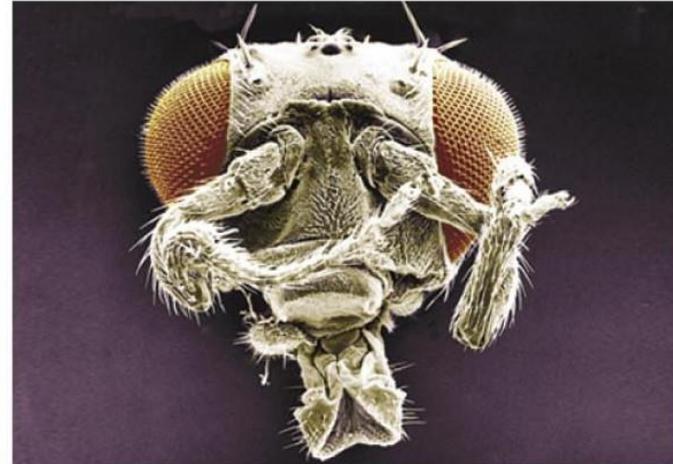
Normal fruit fly



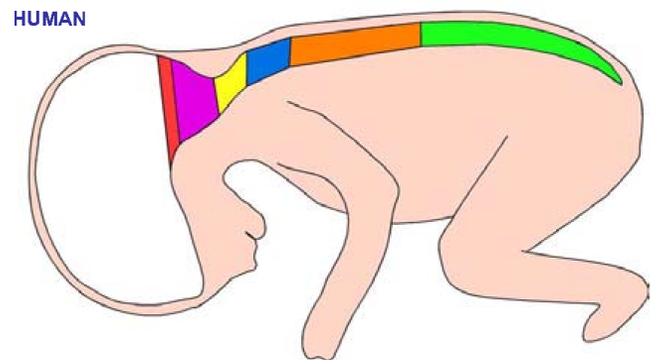
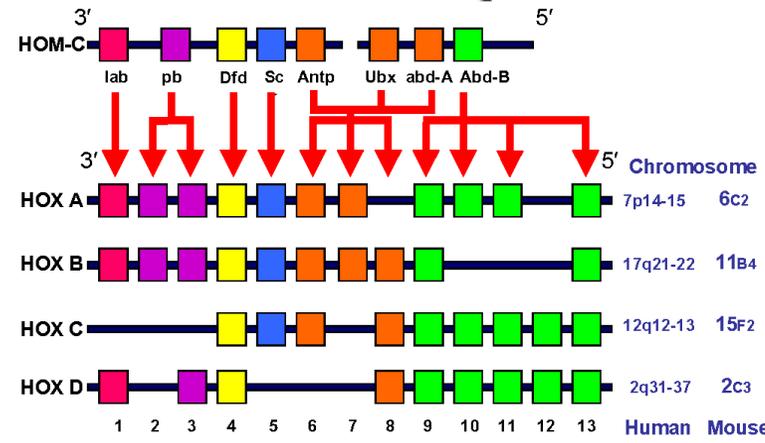
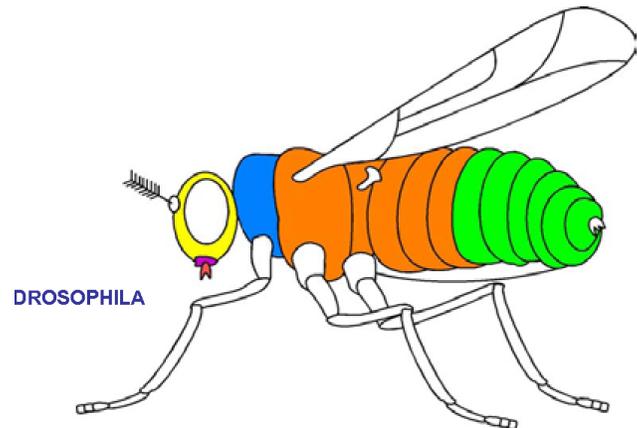
Normal head



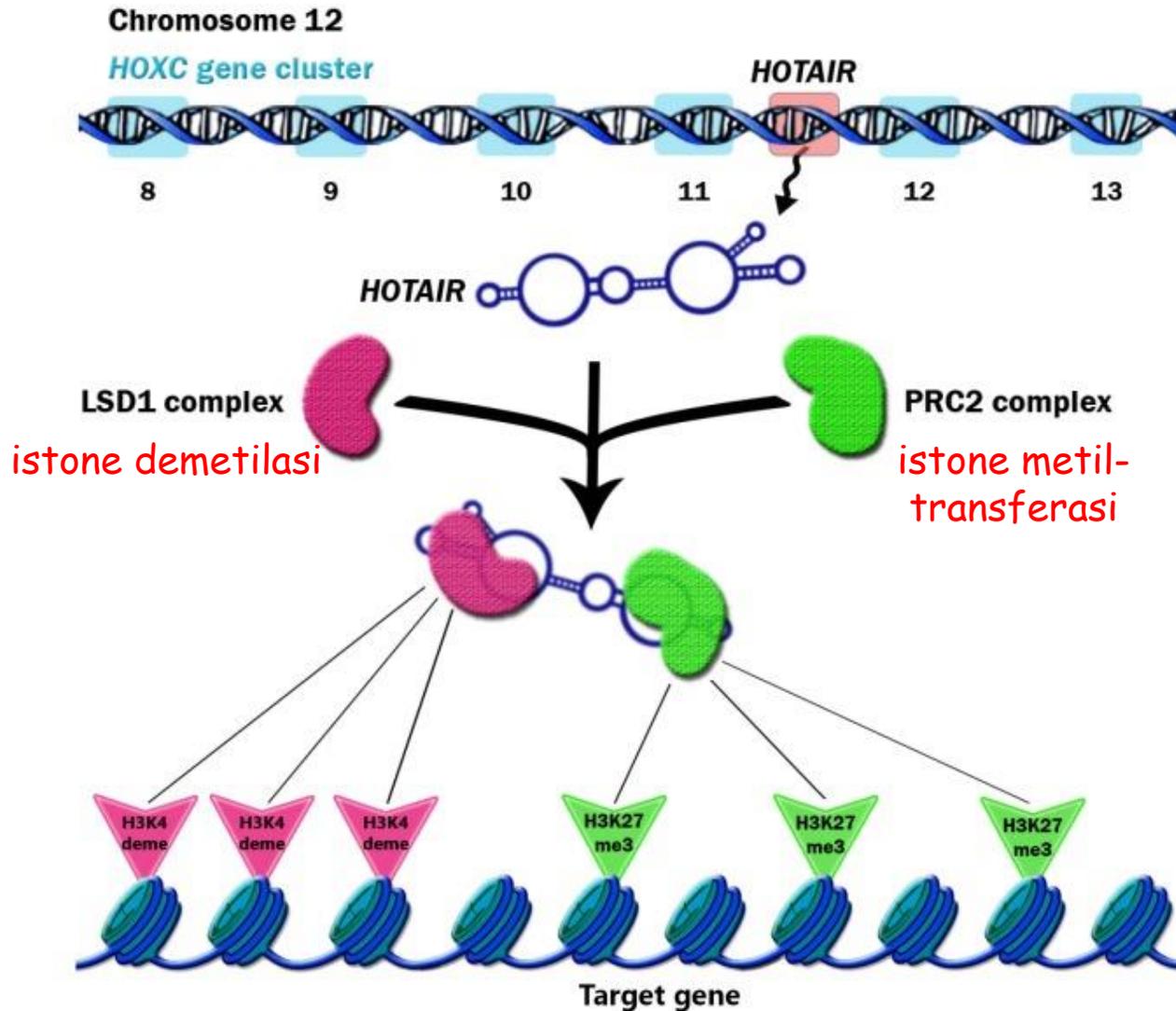
Mutant fly with extra wings



Mutant fly with extra legs growing from head



2. HOTAIR



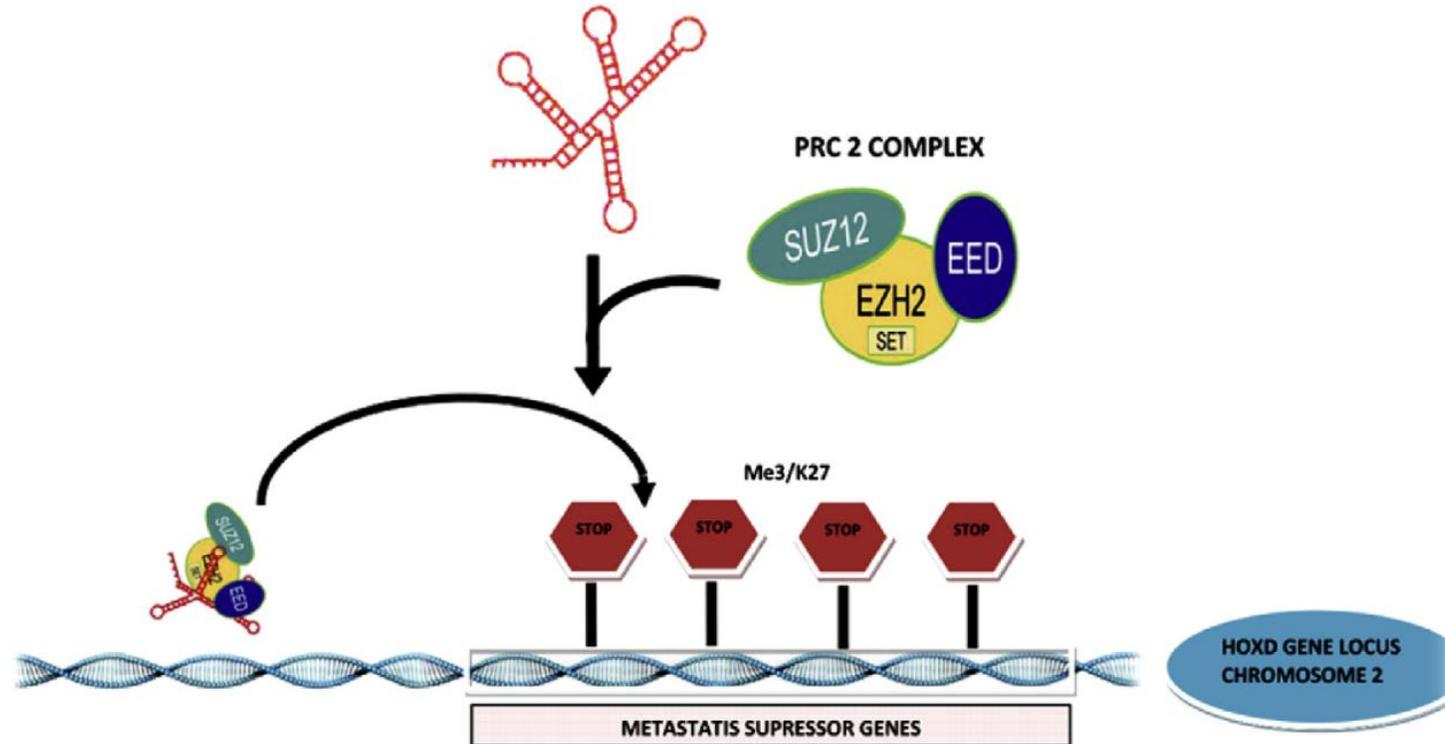
HOTAIR funziona da ponte tra il complesso PRC2 (istone metil-transferasi) ed il complesso LSD1 (istone demetilasi).



HOTAIR induce il silenziamento dei geni bersaglio

2. HOTAIR

La sua concentrazione è aumentata in alcuni tipi di tumori (fino a 200 volte rispetto alle cellule sane). E' stato dimostrato che HOTAIR è coinvolto nell'invasione tumorale e nella formazione delle metastasi poiché **inibisce la trascrizione di geni che reprimono questi processi**.



HOTAIR lncRNA è un fattore oncogenico in differenti tipi di tumore

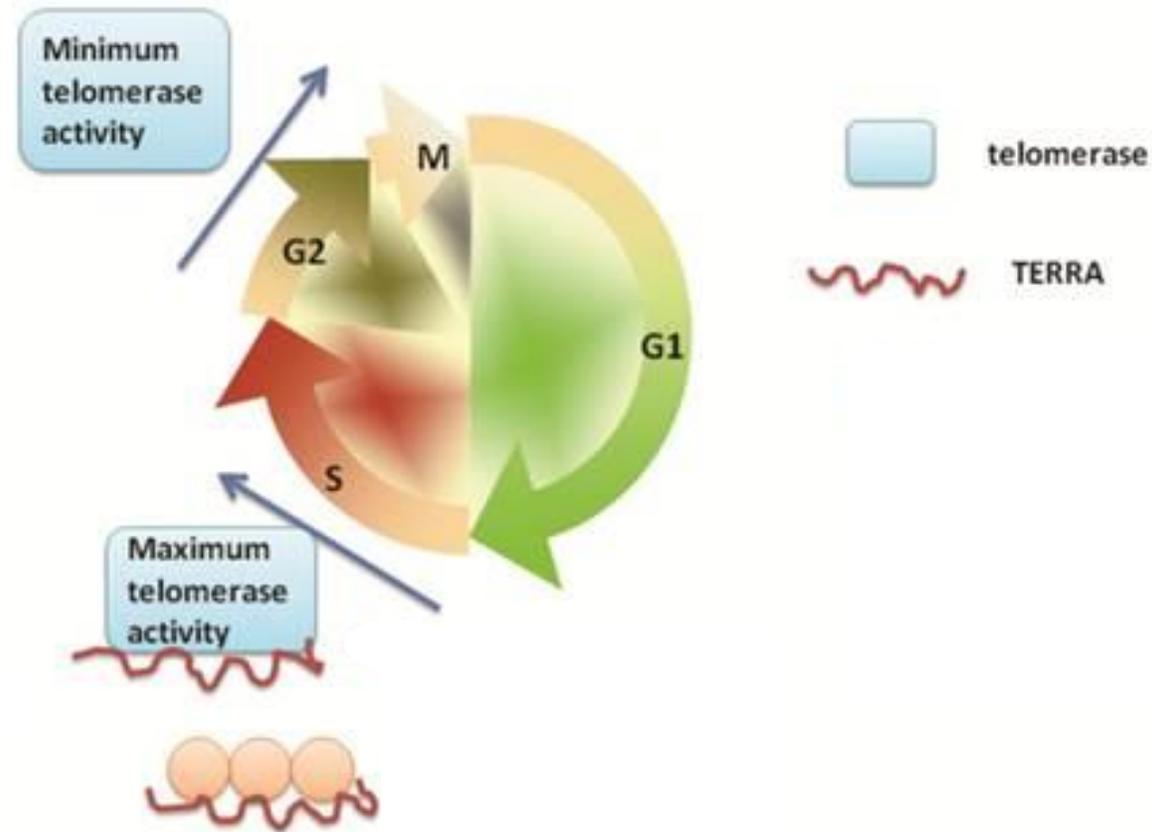
Table 1 Overexpression of *HOTAIR* in different cancers

Type	Overexpression of <i>HOTAIR</i>
Breast cancer	Poor prognosis, metastasis, invasion, and short overall survival
Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)	Poor prognosis, high TNM stage, invasion, metastasis, and short overall survival
Gastric cancer	Tumor staging, venous infiltration, and lymph node metastasis
Hepatocellular carcinoma	Invasion of HCC cells, possibility of recurrence
Colorectal cancer	Poor prognosis, low survival, and metastasis promotion
Gallbladder cancer (GBC)	Promoting carcinogenesis
Bladder cancer (BC)	Poor prognosis and high recurrence rate
Renal carcinoma	Proliferation, invasion, and promotion of tumor growth
Cervical cancer	FIGO stage, aggression, and lymph node metastasis
Epithelial ovarian cancer	Poor prognosis, FIGO stage, lymph node metastasis, overall survival, and metastatic stage of EOC
Endometrial carcinoma	Poor prognosis, lymph node metastasis, EC grade, and overall survival
Lung cancer	Invasion and metastasis
Non-small cell lung cancer	Promotion of lymph node metastasis
Small-cell lung cancer	Poor prognosis, proliferation and invasion
Nasopharyngeal carcinoma	Poor prognosis, overall survival, proliferation, invasion, and promotion of tumor stage
Melanoma	Invasion and metastasis
Glioma	Poor prognosis, cell cycle progression, and glioma grade
Pancreatic cancer	Proliferation and aggression of tumors

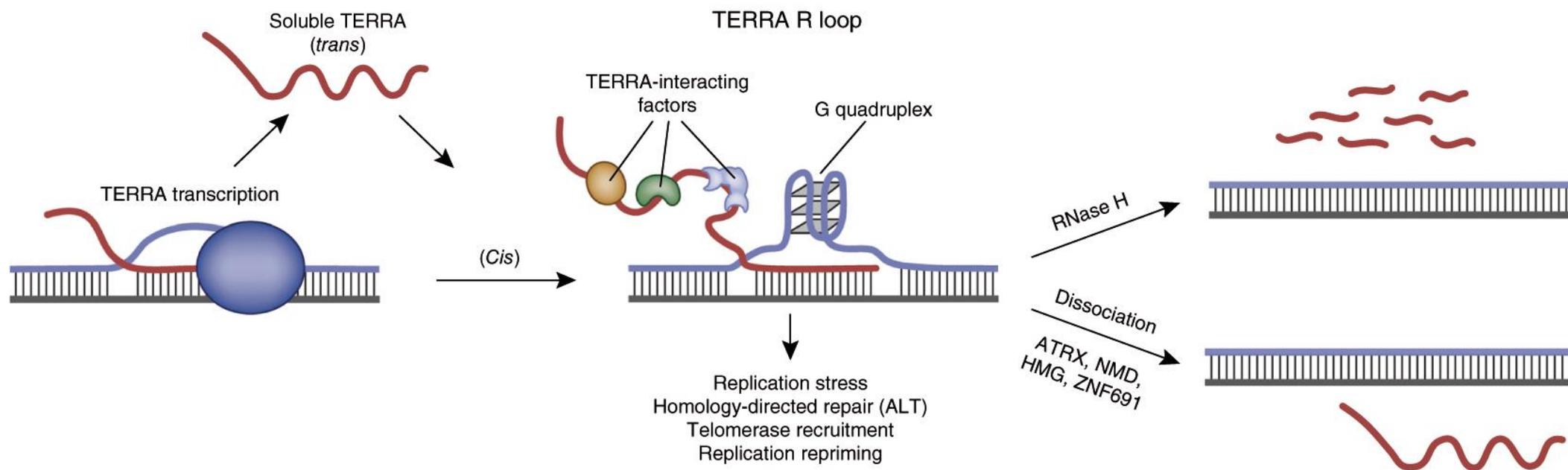
3. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA)

È un lncRNA trascritto dall'RNA polimerasi II sul DNA telomerico a livello di zone telomeriche o subtelomeriche ed è presente dal lievito all'uomo.

TERRA è espresso in modo diverso durante il ciclo cellulare.

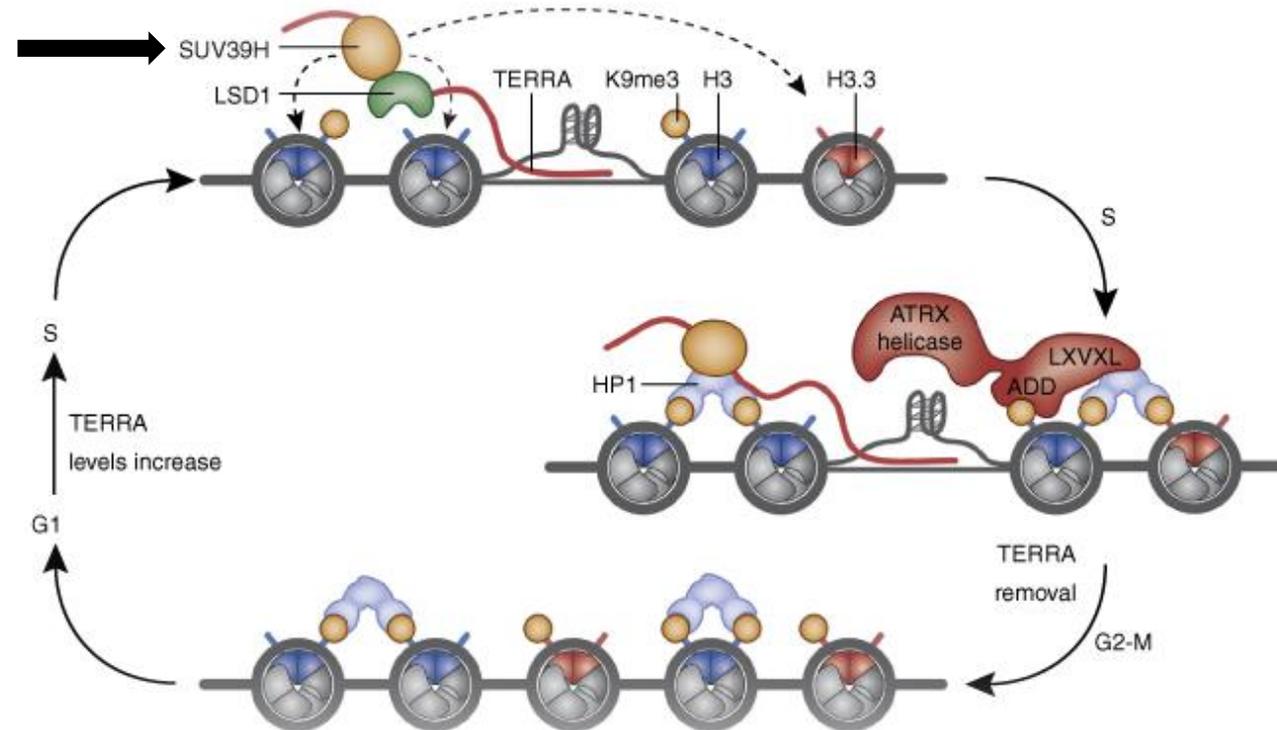


TERRA forma degli ibridi RNA-DNA a livello dei telomeri chiamati R-loops.



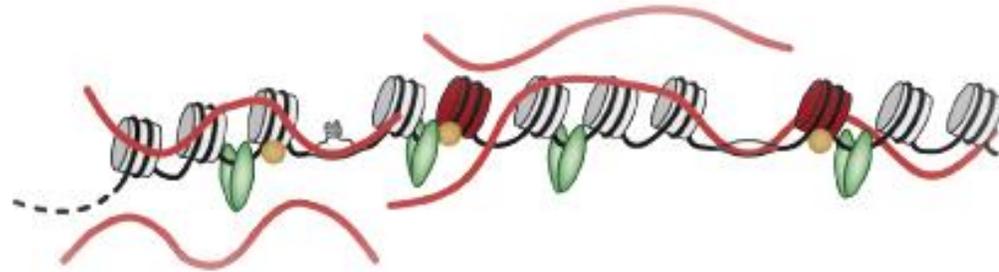
TERRA promuove la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 inducendo il silenziamento genico durante la fase S del ciclo cellulare.

Istione metiltransferasi



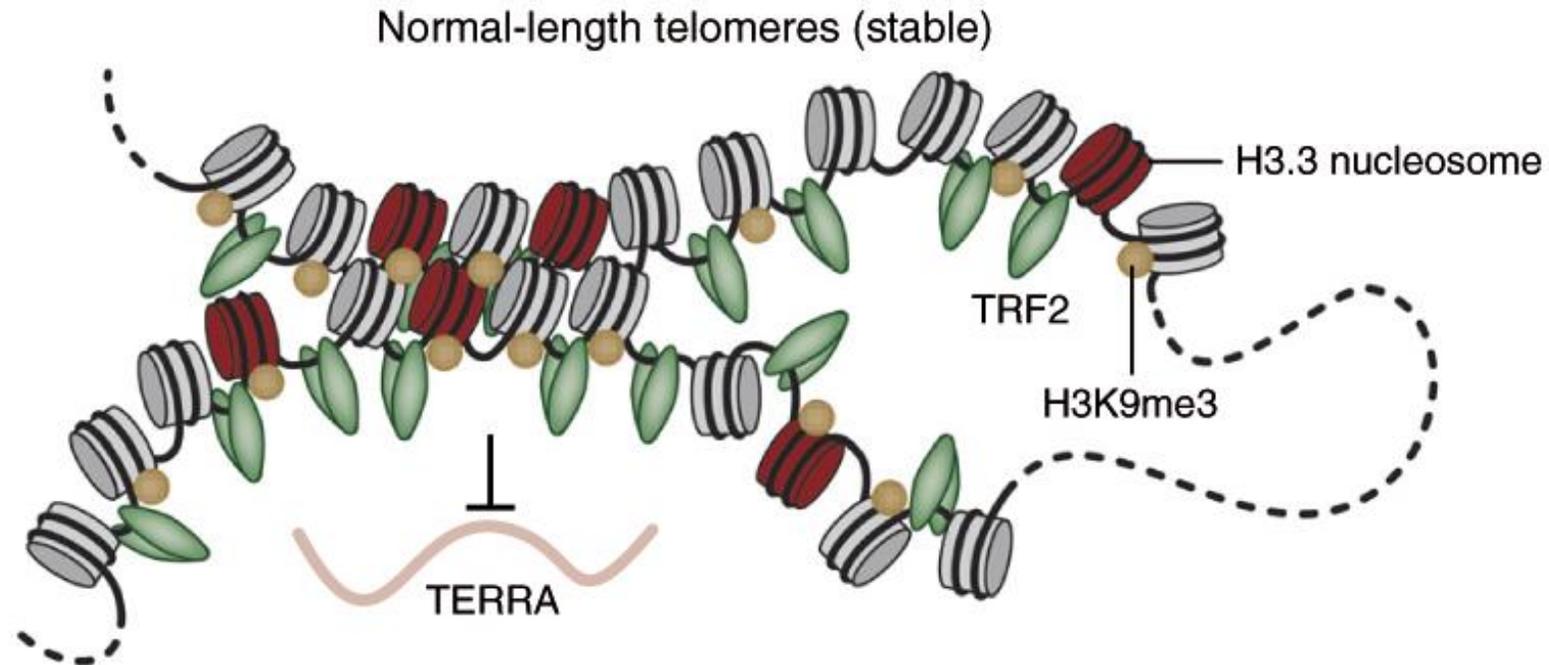
Telomeri corti o danneggiati

L'accorciamento dei telomeri porta ad un aumento del livello di TERRA.
Questo promuove l'associazione della telomerasi ai telomeri.



Telomeri della giusta lunghezza

L'associazione di TERRA ai telomeri di giusta lunghezza promuove il legame di fattori coinvolti nel silenziamento genico mediante la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3. In queste condizioni la trascrizione di TERRA è inibita.



Il controllo post-trascrizionale

L'interferenza a RNA

Come si faceva a bloccare la traduzione di un mRNA in laboratorio

RNA antisenso



5' P  3' OH

mRNA bersaglio

1998: la scoperta di un meccanismo naturale di regolazione genica post-trascrizionale



Interferenza a RNA
(RNA interference)

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire*, SiQun Xu*, Mary K. Montgomery*, Steven A. Kostas*†, Samuel E. Driver‡ & Craig C. Mello‡

* *Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA*

† *Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA*

‡ *Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA*

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene^{1,2}. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression^{3,4}. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous

RNA senso



RNA antisenso



RNA a
doppio filamento



5' P

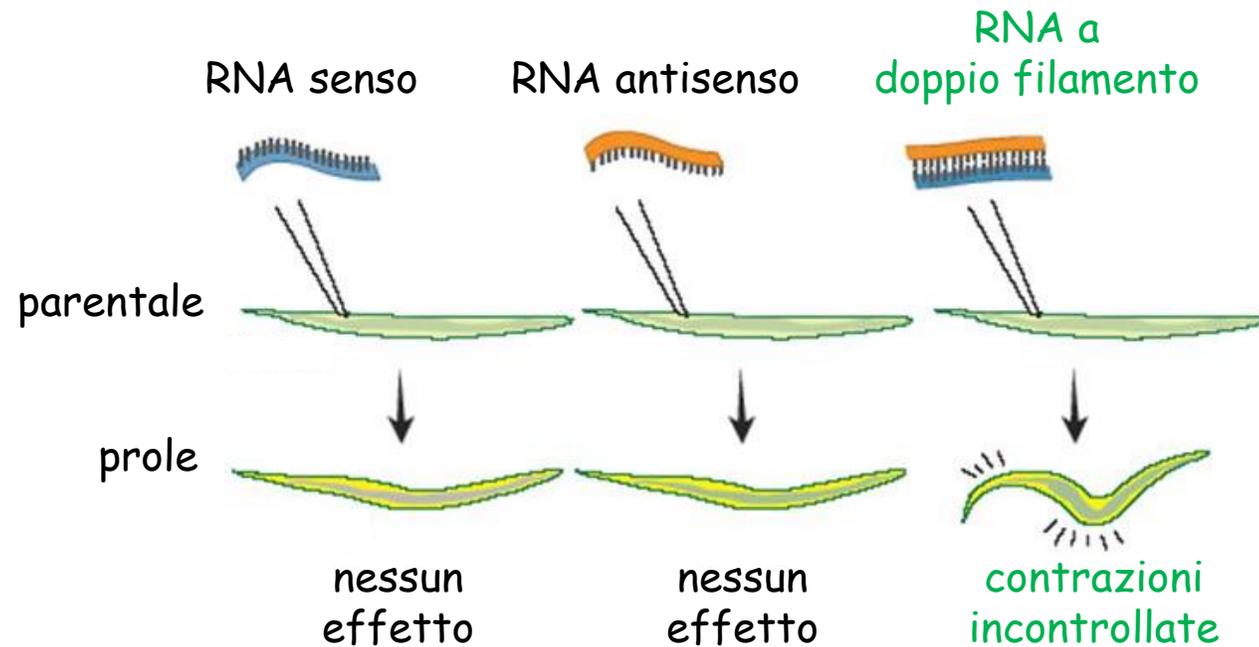


3' OH

mRNA bersaglio

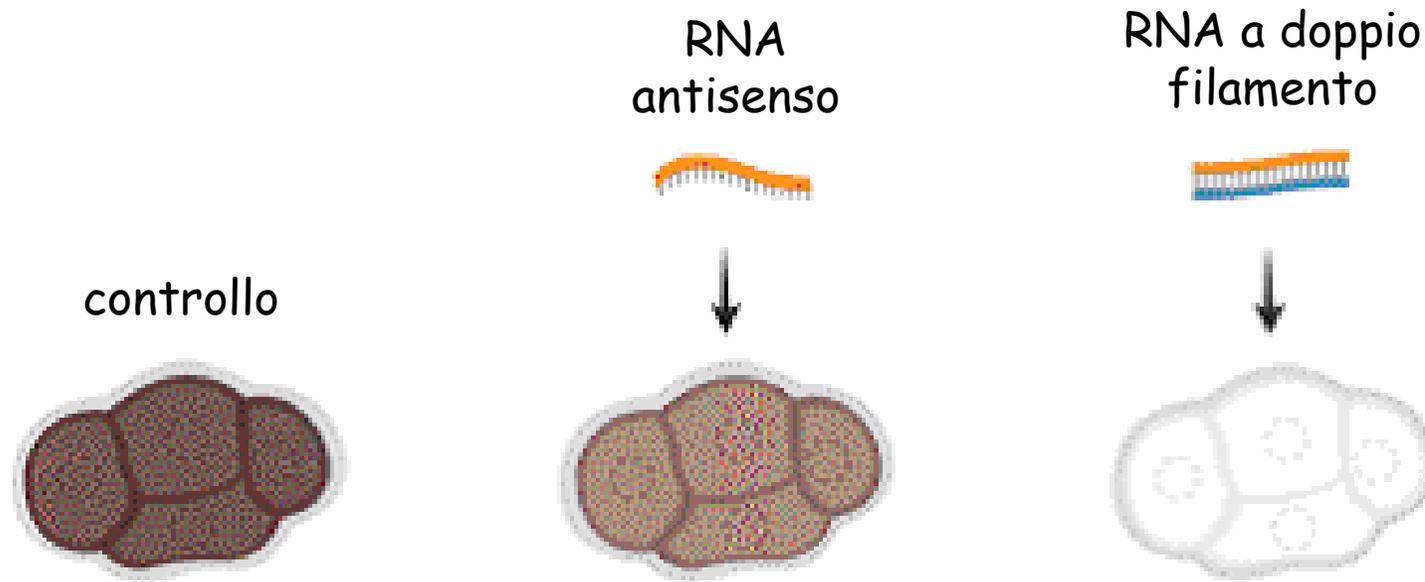
Gli esperimenti di Fire and Mello

Compiuti sul nematode *Caenorhabditis elegans*



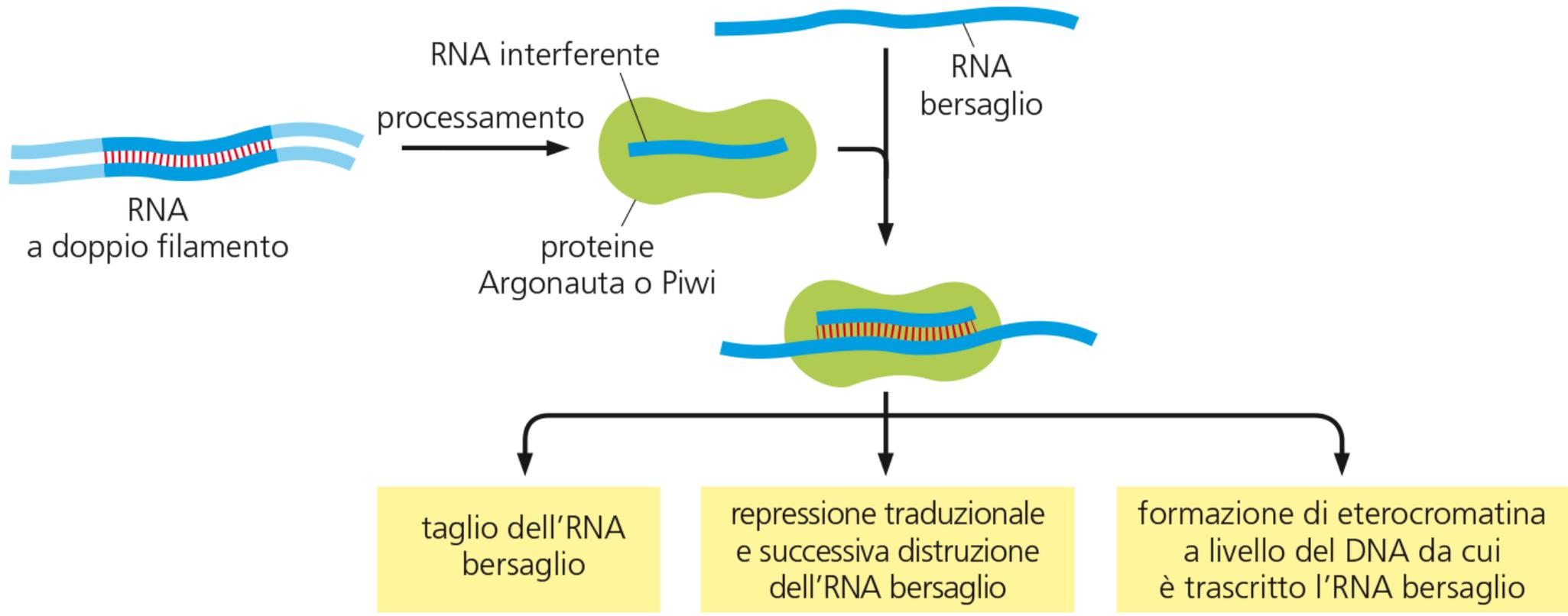
RNA carrying the code for a muscle protein is injected into the worm *C. elegans*. Single-stranded RNA has no effect. But when double-stranded RNA is injected, the worm starts twitching in a similar way to worms carrying a defective gene for the muscle protein.

Gli esperimenti di Fire and Mello



Embrioni di *Caenorhabditis elegans*

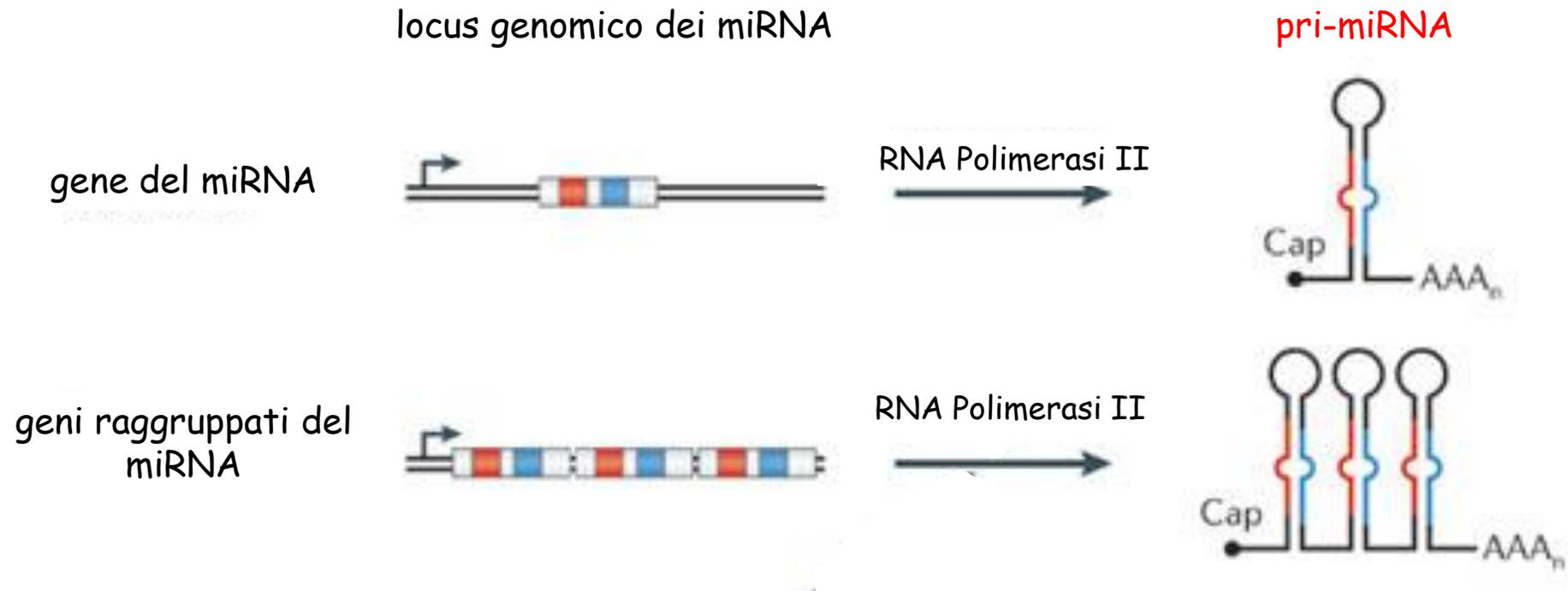
Tipo di RNA	
miRNA (microRNA)	Prodotti endogeni Regolazione dell'espressione genica inducendo la degradazione dell'mRNA o inibendo la traduzione
siRNA (small interfering RNA)	Prodotti endogeni o estranei alla cellula Agiscono su un solo mRNA bersaglio Funzione di difesa verso elementi genetici estranei (come nelle piante)



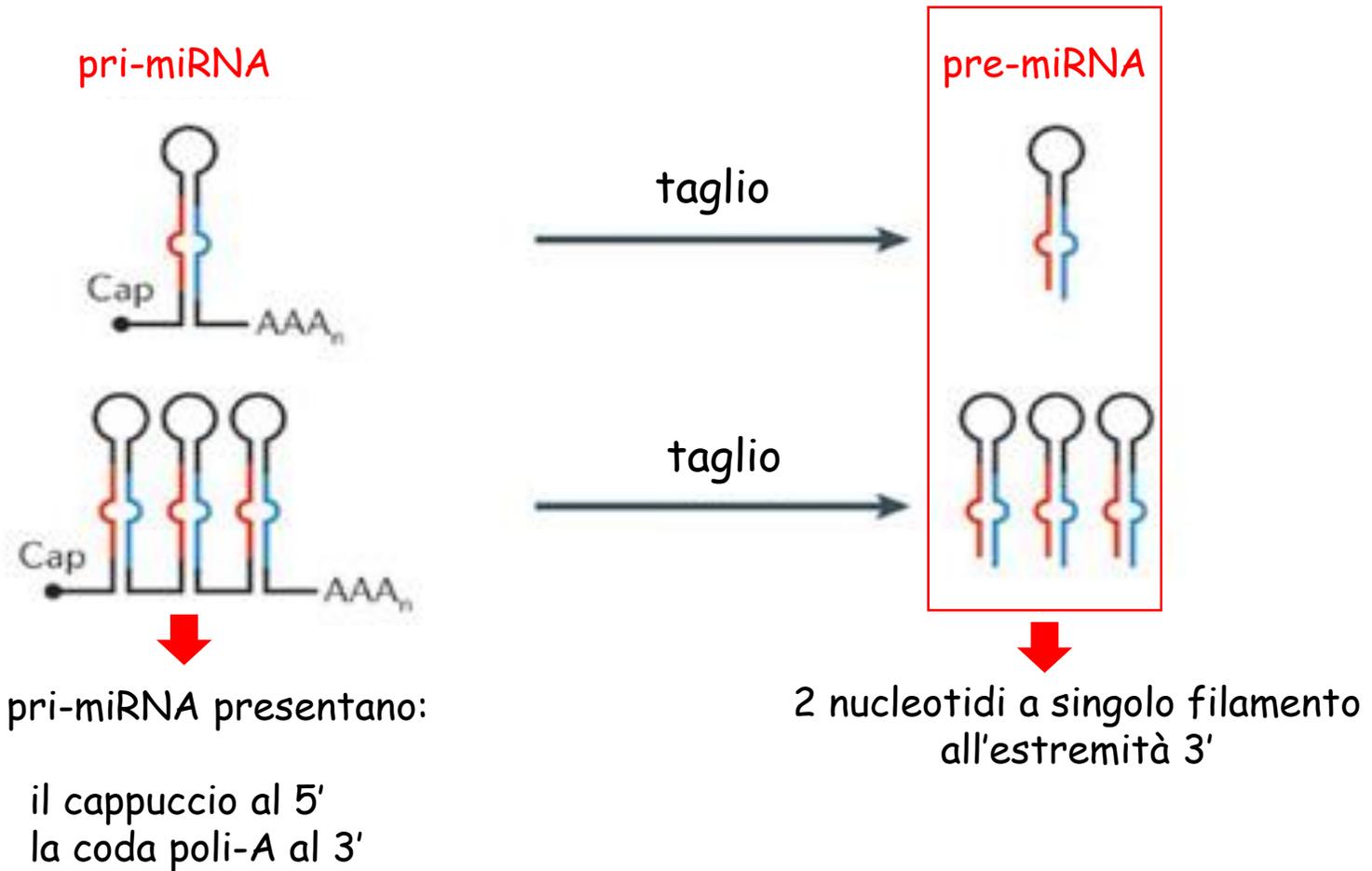
Biogenesi dei micro RNA (miRNA)

1. Biosintesi (nucleo)
 - canonica
 - non canonica (mirtroni)
2. Ulteriore processamento e funzione (citoplasma)

Biogenesi canonica dei miRNA



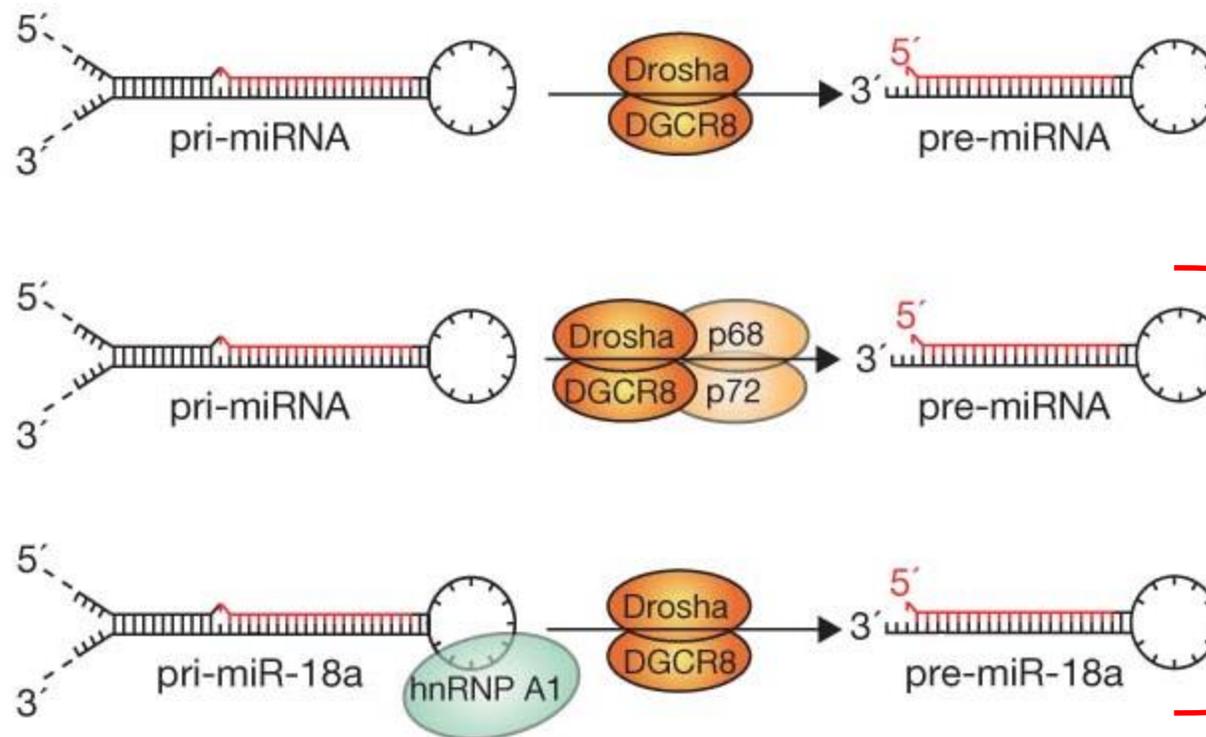
Biogenesi dei miRNA



La formazione dei pre-miRNA

Avviene grazie al **complesso microprocessore** costituito da:

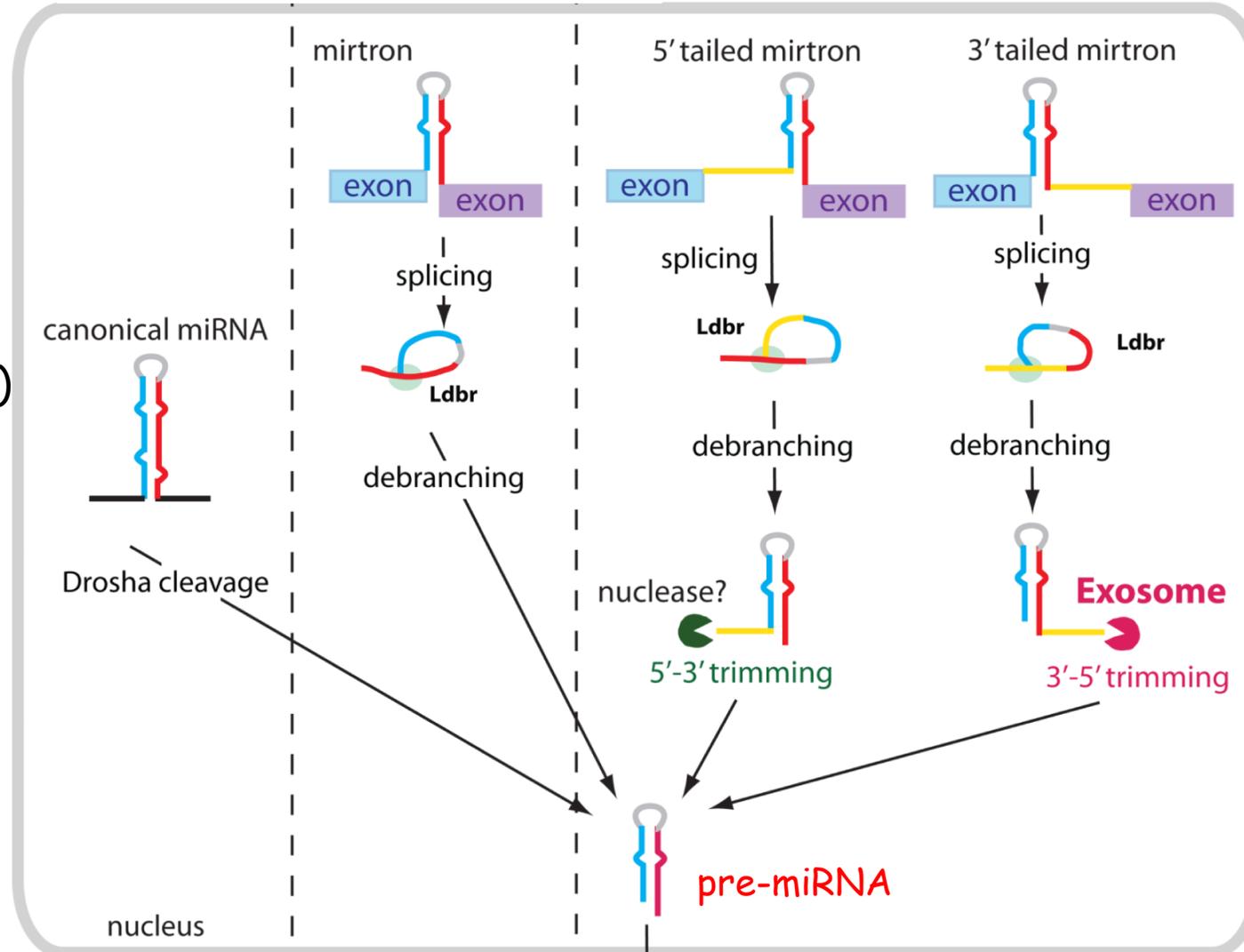
- **DGCR8**, una proteina che lega l'RNA a doppio filamento, che riconosce e si lega alla struttura a forcina del pri-miRNA
- **Drosha**, una RNasi che taglia il pri-miRNA formando un pre-miRNA costituito da 60-70 nucleotidi



alcuni pri-miRNA necessitano di proteine accessorie per avere un taglio specifico

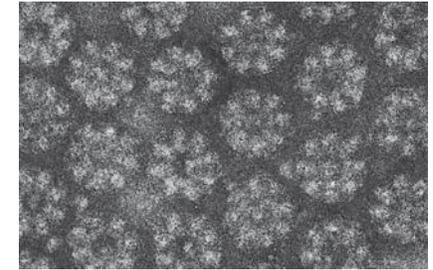
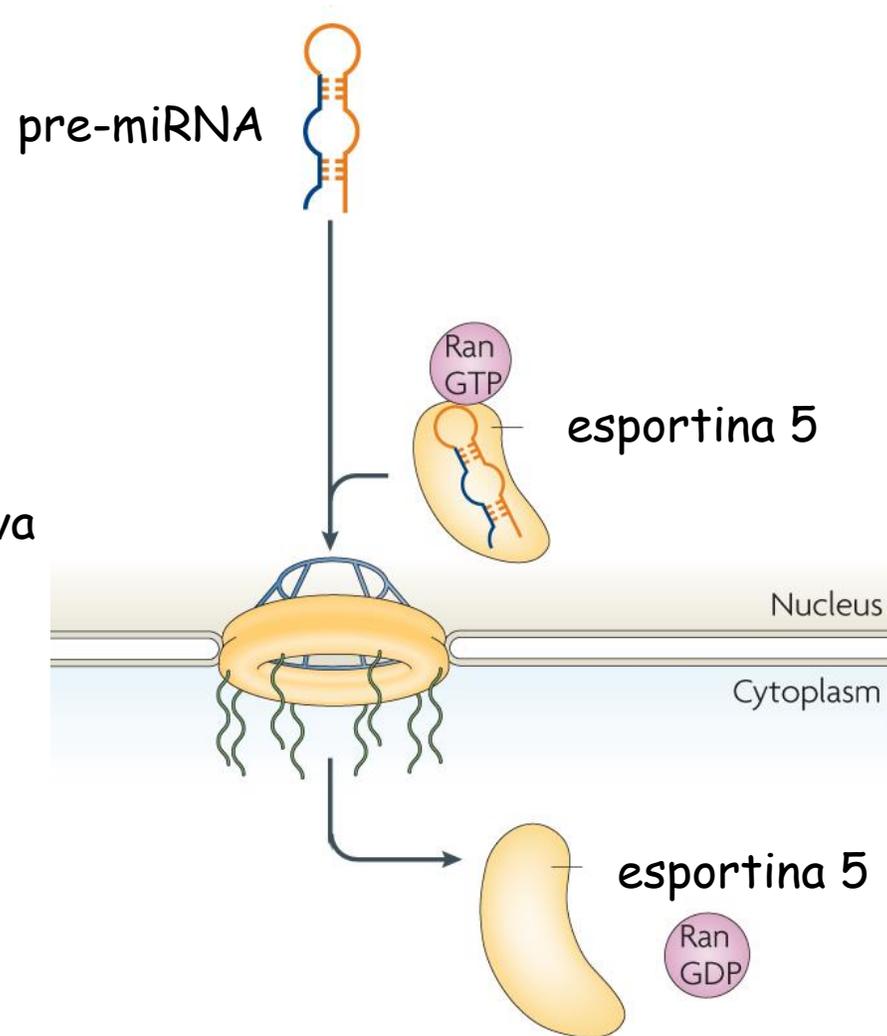
Biogenesi non canonica di miRNA: i mirtroni i pre-miRNA si formano mediante splicing

Ldbr: (enzima
deramificante del cappio)

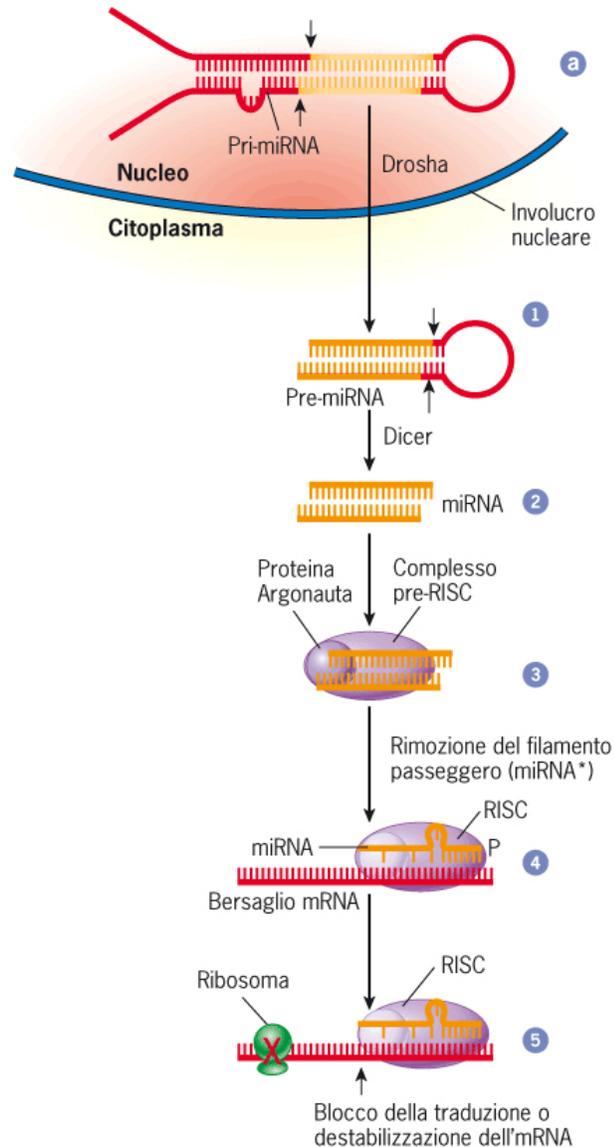


I pre-miRNA sono trasportati nel citoplasma attraverso i pori nucleari

- Ran:** piccola G proteina monomerica.
Si trova in due forme:
- RanGTP: forma attiva
 - Ran GDP: forma inattiva



Nel citoplasma i pre-miRNA sono ulteriormente modificati



La ribonucleasi Dicer taglia il pre-miRNA formando un miRNA a doppio filamento sporgente al 3'. Dicer agisce in associazione con altre proteine che sono importanti nella formazione del successivo complesso RISC.

Il mRNA si lega alla proteina argonata

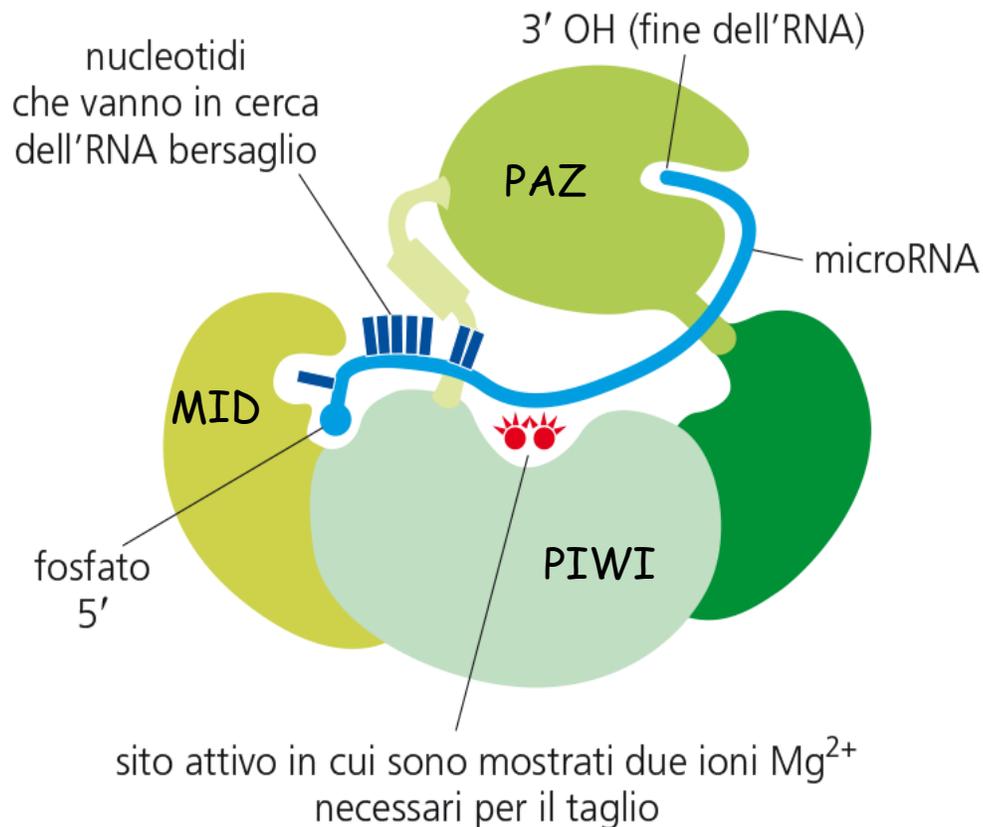
Si forma il complesso proteico pre-RISC (RNA-induced silencing complex)

Rimozione del filamento passeggero

Formazione del complesso RISC con il filamento guida del miRNA

La proteina Argonauta

Proteine in grado di legare i frammenti di *small interfering RNA* (in particolare il filamento detto *guida/antisense*) e di svolgere **attività endonucleasica contro gli mRNA complementari allo stesso filamento guida**.



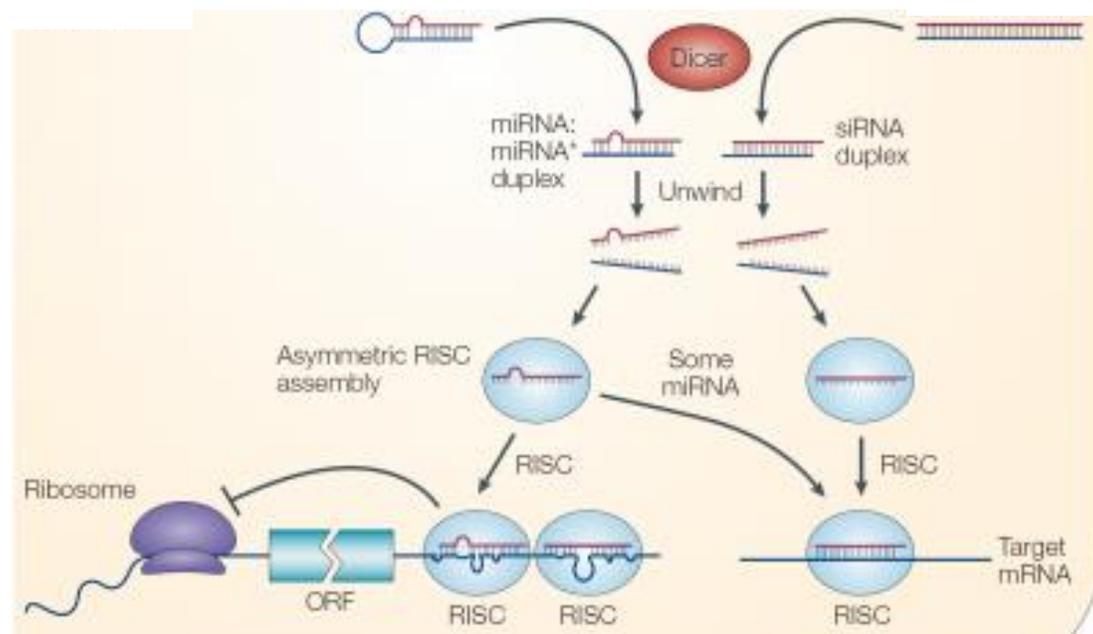
Il **dominio PAZ** è coinvolto nel legame all'estremità 3' OH dell'RNA.

Il **dominio PIWI** consiste di un canale carico positivamente, che gli conferisce le caratteristiche di RNA-binding protein, dal momento che l'acido ribonucleico è carico negativamente.

Il **dominio MID** riconosce la regione 5'UTR del filamento guida.

Meccanismo di inibizione dell'espressione genica

Viene definito dal grado di complementarietà fra il miRNA e l'mRNA bersaglio

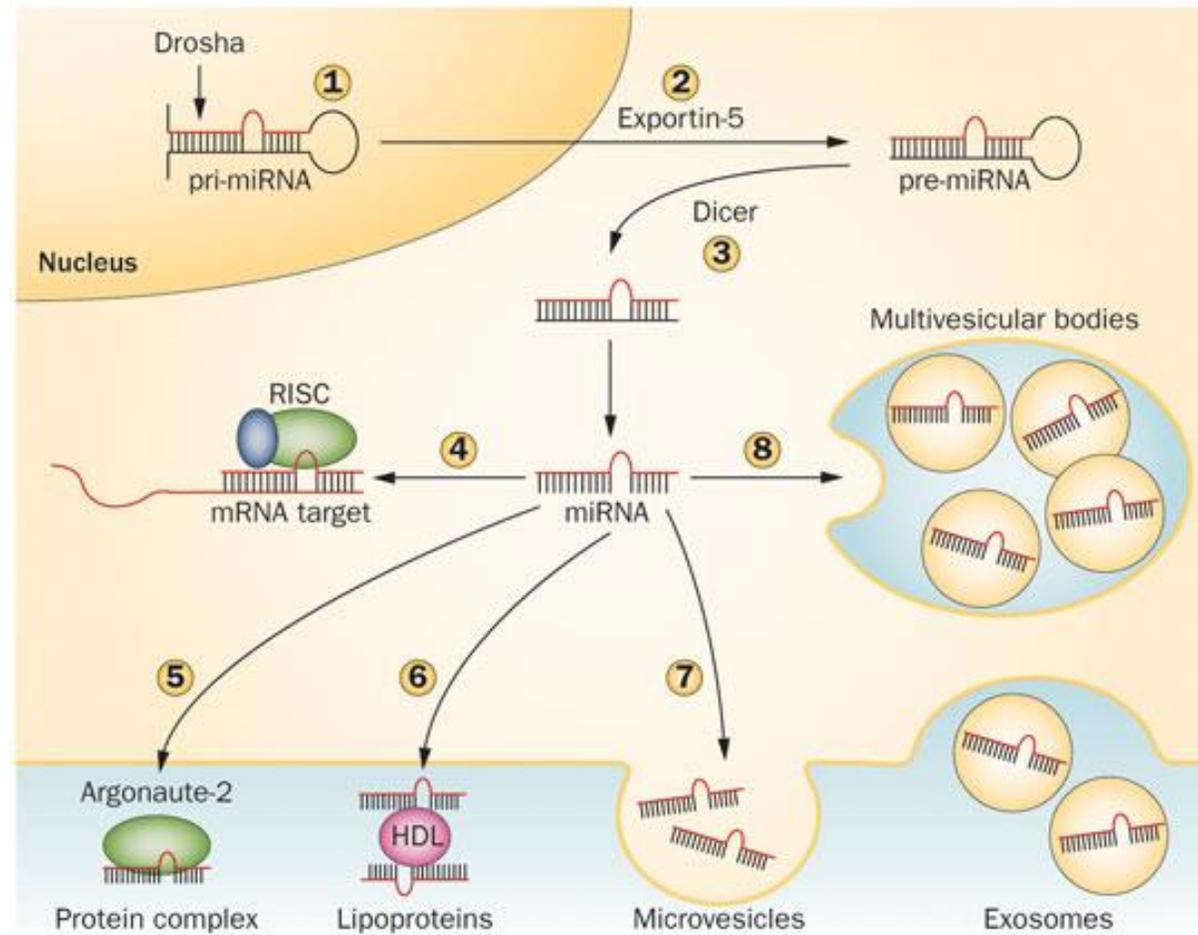


Complementarietà imperfetta:
blocco della traduzione

Complementarietà perfetta:
degradazione dell'mRNA

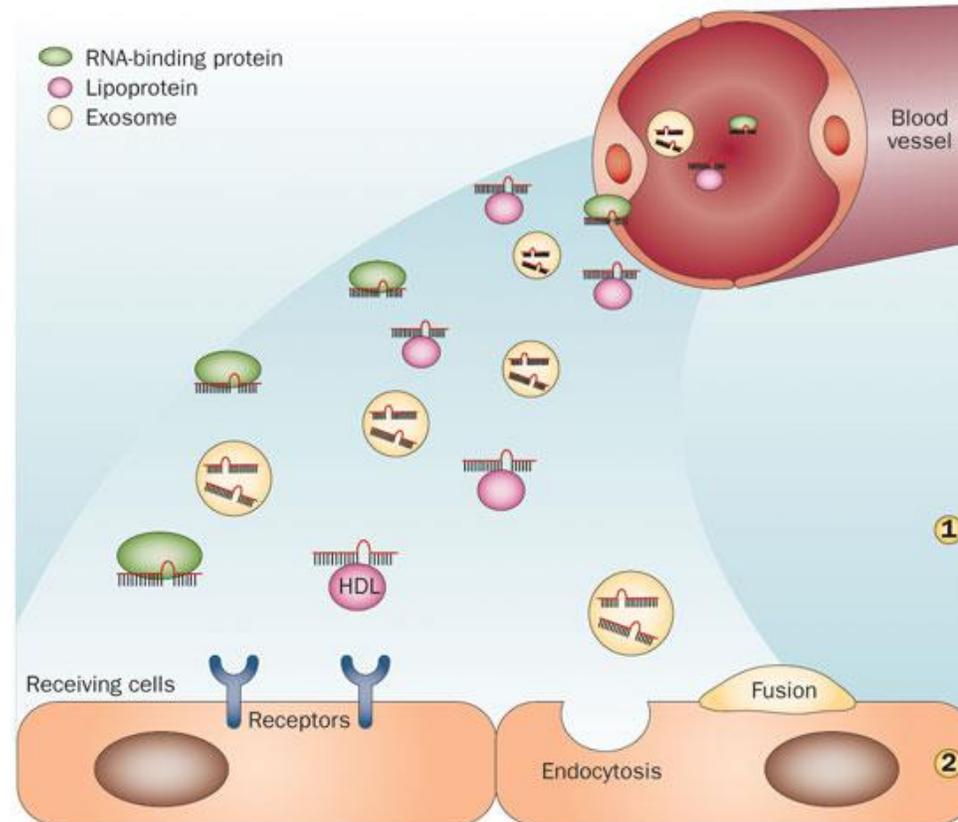
I miRNA circolanti

Cellula che produce e secerne i miRNA



I miRNA circolanti

i miRNA possono entrare nel flusso sanguigno: possibile loro utilizzo come biomarker di specifiche patologie



Cellule che acquisiscono i miRNA circolanti



I miRNA regolano l'espressione genica di cellule diverse da quelle che li hanno prodotti

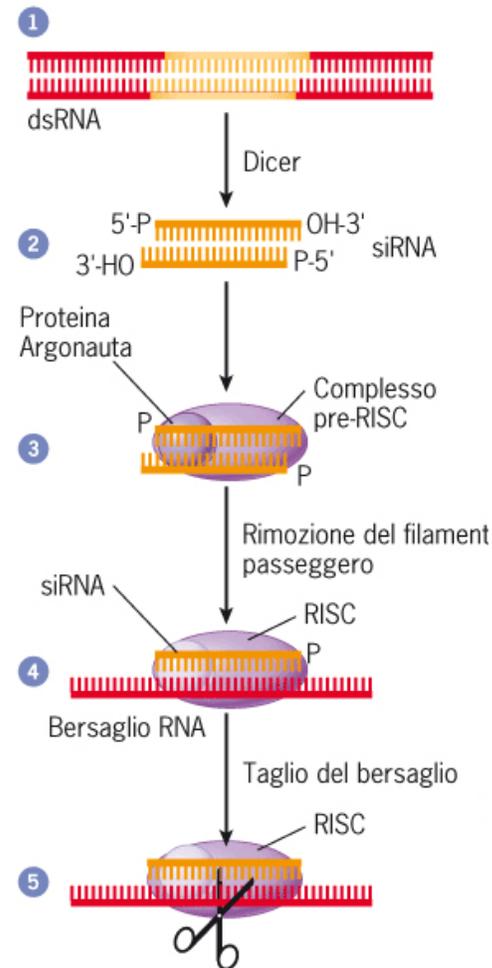
I siRNA (small interfering RNA)

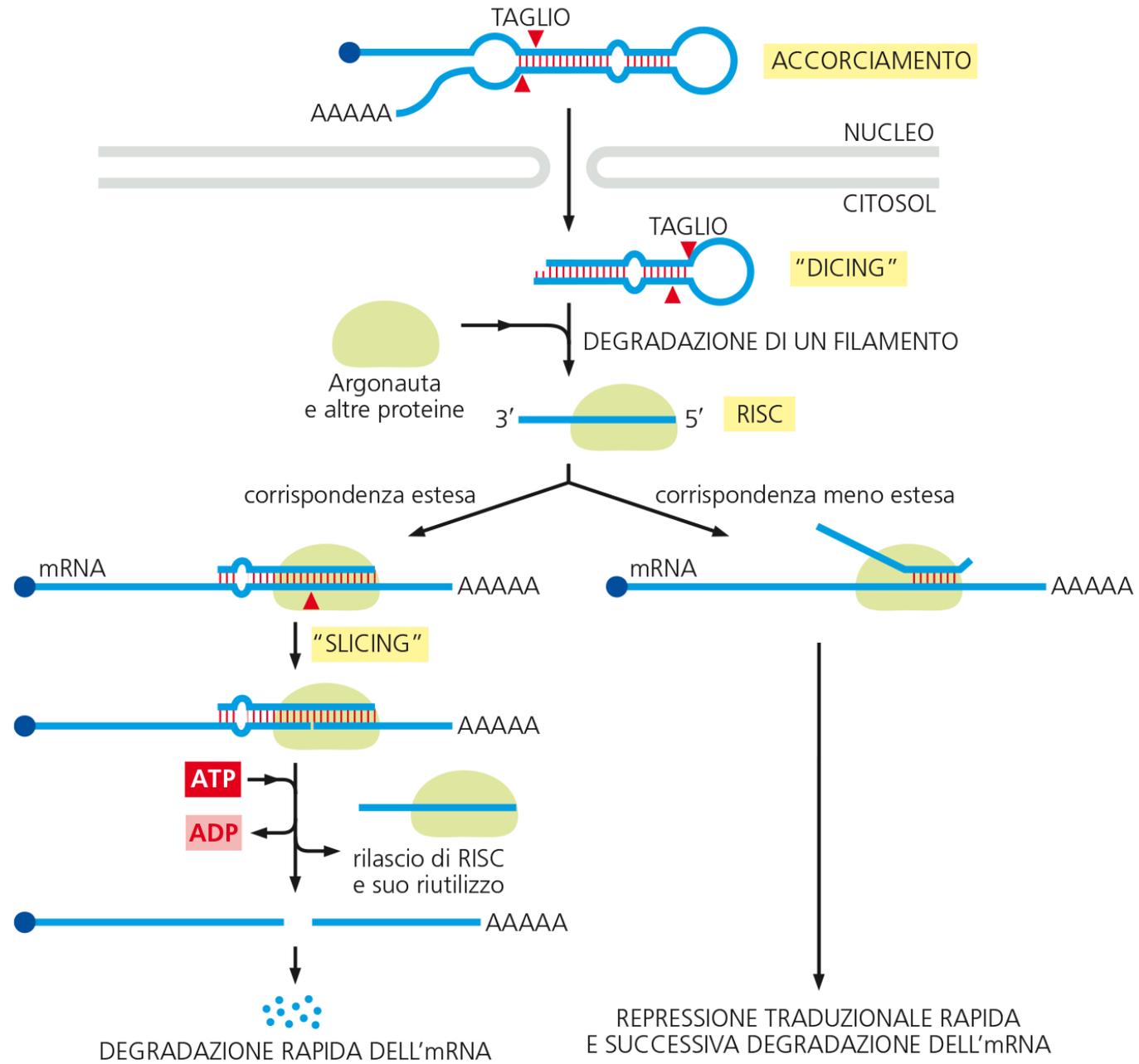
Molecole di siRNA si producono a partire da lunghe molecole di RNA prodotte da elementi genetici normalmente silenti o estranei alla cellula, quali trasposoni, virus o transgeni.

RNAi perciò rappresenta un sistema di difesa contro l'invasione di elementi genetici estranei e di conservazione della stabilità del genoma.

Nematodi, insetti e piante

Complementarietà completa:
degradazione dell'mRNA

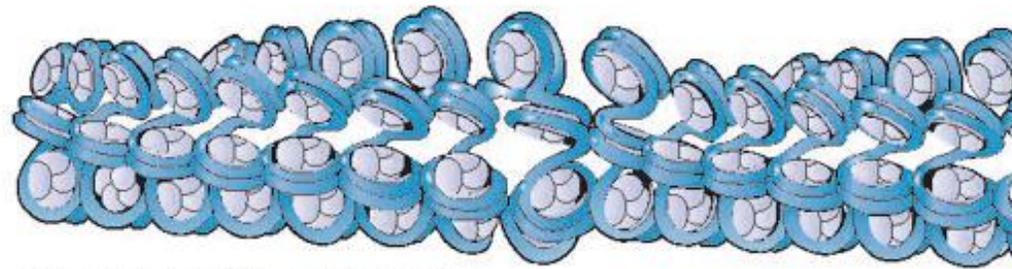




L'RNA interference puo' dirigere la formazione di eterocromatina

Transcriptional gene silencing (TGS)

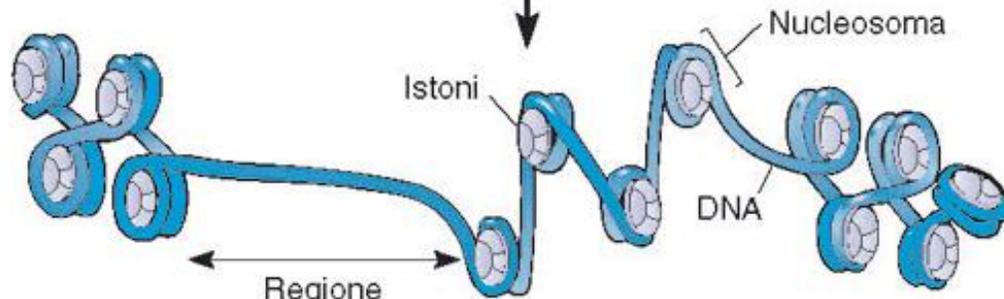
I due stati della cromatina



(a) Una regione di DNA inattiva. L'eterocromatina è organizzata in nucleosomi strettamente associati.

Eterocromatina: geni silenti

Decondensazione della cromatina

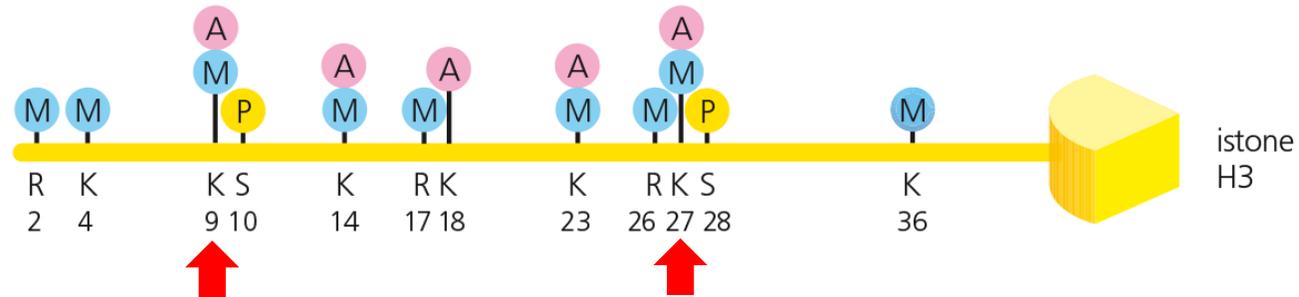


(b) I geni attivi sono associati alla cromatina decondensata (eucromatina). La eucromatina è più accessibile alla RNA polimerasi per la trascrizione di quella regione. Dove avviene la trascrizione, gli istoni sono fisicamente rimossi dal DNA.

Eucromatina: geni attivi

L'RNA interference puo' dirigere la formazione di eterocromatina

Coinvolge la metilazione sulla lisina 9 e 27 dell'istone H3



stato di modificazione

"significato"

trimetile



formazione di eterocromatina,
silenziamento genico

trimetile



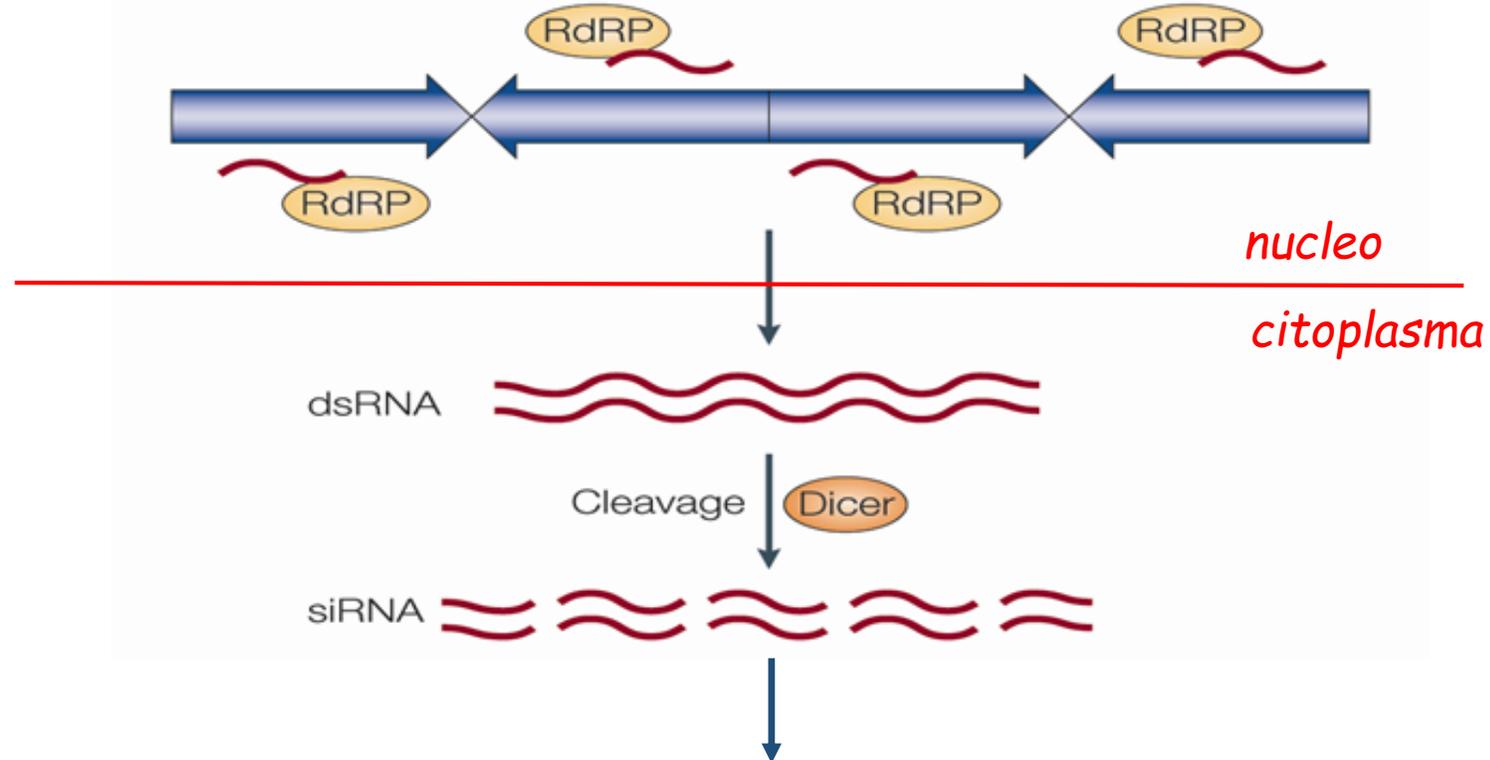
silenziamento genico
(complesso repressore Polycomb)

L'RNA interference puo' dirigere la formazione di eterocromatina

I piccoli RNA trascritti (siRNA) che promuovono la formazione dell'eterocromatina sono situati nelle ripetizioni eterocromatiniche dei centromeri

1. Vengono trascritti il primo filamento di siRNA mediante una normale trascrizione

2. RdRP: RNA polimerasi RNA-dipendente



I siRNA rientrano poi nel nucleo con un meccanismo ad oggi sconosciuto

L'RNA interference puo' dirigere la formazione di eterocromatina

Dopo che sono rientrati nel nucleo, i siRNA guidano le **istoni metiltransferasi (HMT)** sulla cromatina a livello della **lisina 9 dell'istone H3** che viene cosi' metilata. A questa si associano altre proteine (la proteina HP1 o Swi6) che mantengono lo stato eterocromatinico.

